



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 328 811**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04714617 .0**
⑨6 Fecha de presentación : **25.02.2004**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1611238**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

⑤4 Título: **Compuestos moduladores del transporte de glutamato y métodos.**

③0 Prioridad: **26.02.2003 US 450227 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2009

⑦3 Titular/es: **The John Hopkins University**
3400 N. Charles Street
Baltimore, Maryland 21218, US

⑦2 Inventor/es: **Rothstein, Jeffrey, D.**

⑦4 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

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

Compuestos moduladores del transporte de glutamato y métodos.

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/450.227, presentada el 26 de febrero del 2003. Todo el contenido de esta solicitud se incorpora en este documento como referencia.

10 **Ayuda gubernamental**

Este trabajo descrito en este documento se respaldó por una subvención del Instituto Nacional de Salud (Subvención N° NS33958). Por lo tanto, el Gobierno de Estados Unidos puede tener ciertos derechos en la invención.

15 **Antecedentes de la invención**

Los trastornos neurológicos pueden afectar significativamente al sistema nervioso central (SNC) y las unidades de neurona motora. Por ejemplo, se conoce que ciertos trastornos neurológicos del SNC afectan de forma adversa al cerebro y las estructuras asociadas. Los trastornos neurológicos que afectan a las unidades de neurona motora se han agrupado en enfermedades de neurona motora y neuropatías periféricas. Véase de forma general Kandel, E. R. *et al.*; (1991) en *Principles of Neuroscience*, Appleton & Lange, Norwalk, CT; y Rowland, L. P. (ed.) (1982) en *Human Motor Neuron Diseases*. Nueva York. Raven Press.

Una enfermedad de neurona motora ilustrativa es la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Se ha descrito que la ALS es un trastorno neuromuscular crónico que tiene manifestaciones clínicas reconocidas. Por ejemplo, se ha sugerido que la degeneración de las neuronas motoras corticales y espinales/bulbares puede desempeñar un papel clave en el trastorno. La ALS prácticamente siempre es mortal. Aproximadamente el 95% de todos los casos de ALS son esporádicos, mostrando muchos de los casos remanentes una heredabilidad autosómica dominante. Véase, por ejemplo, Kuncel R. W. *et al.*, (1992) *Motor Neuron Diseases In Diseases of the Nervous System*, Asbury *et al.* eds. (Philadelphia W. B. Saunders) págs. 1179-1208; Brown, R. H., (1996) *Amer. Neurol.* 30: 145; Siddique, T. y Deng., H. X. (1996) *Hum. Mol. Genetics* 5: 1465).

También se han descrito trastornos específicos del SNC. En particular, algunos se han atribuido a deficiencias colinérgicas, dopaminérgicas, adrenérgicas, serotoninérgicas o combinaciones de las mismas. Los trastornos del SNC de impacto grave incluyen demencia pre-senil (denominada en ocasiones enfermedad de Alzheimer (AD) o enfermedad de Alzheimer de aparición temprana), demencia senil (demencia del tipo Alzheimer), enfermedad de Parkinson (PD) y enfermedad Huntington (HD), denominada en ocasiones corea de Huntington). Tales trastornos del SNC están bien representados en la población humana. Véase de forma general; Gusella, J. F. *et al.* (1983) *Nature* 306: 234; Borlauer, W. y Jprmulowoca. P. (eds.) (1976); Adv. in Parkinsonism: Biochemistry, Physiology, Treatment. Fifth International Symposium on Parkinson's Disease (Viena) Basilea: Roche; y referencias citadas en los mismos.

Se ha dirigido una atención significativa hacia la comprensión de la etiología de las enfermedades de neurona motora. Por ejemplo, se ha descrito que los niveles anormales de ciertos neurotransmisores excitotóxicos contribuyen de forma adversa a muchas enfermedades de neurona motora. En particular, se reconoce que la excitotoxicidad mediada por glutamato tiene un papel crítico en ALS. Véase, por ejemplo, Rothstein J. D. *et al.*, (1990) *Ann. Neurol.* 28: 18; Rothstein J. D. *et al.* (1992) *N. Engl. Med.* 326: 1464; Rothstein J. D., *et al.* (1993) *PNAS (USA)* 90: 6591; y Lacomblez, L. *et al.*, (1996) *Lancet* 347: 1179.

Los transportadores astrogliales GLAST (EAAT1) y GLT-1 (EAAT2) son responsables del mayor porcentaje de transporte de glutamato en el prosencéfalo. Como tal, ambos representan dianas fascinantes para la modulación de la expresión y, de este modo, como agentes para retrasar la progresión de la enfermedad, incluyendo neurodegeneración, ataques y crecimiento de tumor cerebral.

Se han realizado esfuerzos sustanciales para comprender los mecanismos para reducir los niveles de glutamato en el sistema nervioso. Por ejemplo, el transporte de glutamato dependiente de sodio, de alta afinidad, es un medio descrito para inactivar glutamato. En particular, se piensa que las proteínas de transportador 2 de aminoácido excitatorio astrocítico (EAAT2) tienen funciones sustanciales en esa activación. Véase, por ejemplo, Rothstein J. D. *et al.* (1994) *Neuron* 28: 18; Rothstein J. D. *et al.*, (1995) *Ann. Neurol.* 38: 78 y referencias citadas en los mismos.

En particular, las investigaciones han sugerido que el EAAT2 es un transportador de glutamato predominante. Más particularmente, se han puesto de manifiesto ciertos estudios de reducción de la expresión con oligonucleótidos antisentido que demuestran que la pérdida de EAAT2 puede conducir a degeneración neuronal excitotóxica y alteración motora progresiva. Los estudios de ALS y otros trastornos neurodegenerativos han relacionado el transporte alterado de glutamato con la pérdida de la proteína EAAT2. En particular, hasta el 60% al 70% de los pacientes con ALS esporádica examinados tienen una pérdida del 30% al 95% de la proteína EAAT2. Véase, por ejemplo, Haugeto *et al.*, anteriormente; Rothstein J. D., *et al.*, (1996) *Neuron* 16: 675; Bristol, L. A. y Rothstein, J. D. (1996) *Ann. Neurol.* 39: 676.

Se han realizado intentos de tratar o prevenir trastornos neurológicos del SNC y las unidades de neurona motora. Sin embargo, la mayoría de las terapias existentes no siempre detienen el desarrollo o la gravedad de los trastornos en los pacientes afectados. Véase, por ejemplo, Rowell, (1987) Adv. Behav. Biol. 31: 191; Rinne, *et al.* Brain Res. (1991) 54: 167; Patente de Estados Unidos N° 5.210.076 de Berliner; Yurek, D. M. (1990) Ann. Rev. Neurosci. 13: 415 y Rowland *et al.* anteriormente.

Niederberger *et al.*, (Neuroscience 116 (2003): 81-87) muestra que la estimulación nociceptiva aumenta la expresión del transportador de glutamato GLT-1.

O'Shea (Clin. Expt. Pharm. and Physiology (2002) 29: 1018-1023) revisa los papeles de los transportadores de glutamato en el SNC y señala que los transportadores de aminoácidos excitatorios son dianas atractivas para fármacos.

Por consiguiente, existe una necesidad en el campo de terapias eficaces para tratar trastornos neurológicos.

15 Sumario de la invención

En este documento se describe el uso de un agente promotor de la expresión del transportador de aminoácidos excitatorios (EAAT) que es un antibiótico, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno neurológico asociado con transmisión alterada de glutamato.

En un aspecto, el antibiótico es un compuesto identificado por un ensayo de exploración que incluye los pasos de

- a) poner en contacto un antibiótico de ensayo con una molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ADNc y que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 60% con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, 2, 3 ó 4, donde la molécula de ácido nucleico es capaz de dirigir la expresión de ARNm de un vector indicador sin promotor o un complemento del mismo o una célula que comprende dicha molécula de ácido nucleico; y
- b) determinar si la expresión de ARNm o el polipéptido codificado por el ADNc está modulado, identificando de este modo un antibiótico que es un agente promotor de la expresión de EAAT2.

La expresión de la proteína EAAT se puede aumentar *in vivo* o la expresión de la proteína EAAT se puede aumentar *in vitro*.

Otros aspectos de la invención son aquellos en los que el agente promotor de la expresión de EAAT2 comprende al menos un elemento estructural seleccionado entre heterociclos que tienen al menos un átomo de azufre de anillo, aminas terciarias, sales de amonio cuaternario, esteroides, polioles, policétidos, guanidina, urea o arsenato; aquellos en los que el agente promotor de la expresión de EAAT2 aumenta la producción de EAAT2 el 200% o más con respecto a la producción no regulada; aquellos en los que el agente promotor de la expresión de EAAT2 aumenta la producción de EAAT2 el 300% o más con respecto a la producción no regulada; aquellos en los que el agente promotor de la expresión de EAAT2 aumenta la producción de EAAT2 el 600% o más con respecto a la producción no regulada.

En otro aspecto, el agente promotor de la expresión de EAAT2 se selecciona entre el grupo que consiste en penicilina V potásica, cloruro de decualinio, quinapril, amoxicilina, metanosulfonato de pridinol, aclomida, clorhidrato de vancomicina, tianfenicol, ceftriaxona sódica, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX), cefapirina sódica, actinospectacina, cefoperazona sódica, acivicina, acetilcolina, cloranfenicol, vidarabina, atenolol, oxitetraciclina, glafenina, clorhidrato de oximetazolina, galamina, ácido perílico (-), clorhidrato de amitriptilina, clorhidrato de tetracaína, fosfato de disopiramide, sulfato de sisomicina, ketamina, clorhidrato, xilacina, bicuculina, flurbiprofeno, cefadroxilo, clorhidrato de bacampicilina, clorhidrato de tiaprida, acetato de noretindrona, bergapteno, carisoprodol, citiolona, piroxicam, etilsuccinato de eritromicina, furegrelato sódico, alendazol, sulfato de dihidrostreptomina, aloína, fenoprofeno, flutamida, ampicilina sódica, amprolio, sulfato de esparteína, acetato de medroxiprogesterona, clorhidrato de alexidina, clorhidrato de clindamicina, cefalotina sódica, daidzeína, clorhidrato de meclizina, lindano, bromoprida, clorhidrato de N-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), enoxotona, bromuro de ipratropio, bufexamac, gluconolactona, rifampina, hidroxicloraquina, coleoforsina, cloroxina, clorhidrato de oxidopamina, camptotecina, nafcilina sódica, clorhidrato de mianserina, acetarsol, clorhidrato de prilocaína, mesilato de deferroxamina, bromuro de hexametonio, metenamina, paraxantina, clorhidrato de harmalol, piritona de cinc, butirato de hidrocortisona, acetazolamida, aminoglutetimida, clorhidrato de meclufenoxato, ácido 2-fenpropilamino-5-nitrobenzoico (NPPB), clorhidrato de amiodarona, aconitina, caproato de hidroxiprogesterona y diosmina.

En otro aspecto, el agente promotor de la expresión de EAAT2 se selecciona entre el grupo que consiste en penicilina V potásica, cloruro de decualinio, quinapril, amoxicilina, metanosulfonato de pridinol, aclomida, clorhidrato de vancomicina, tianfenicol, ceftriaxona sódica, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX), cefapirina sódica, actinospectacina, cefoperazona sódica, acivicina, acetilcolina, cloranfenicol, vidarabina, cefoperazona sódica, acivicina, acetilcolina, cloranfenicol, vidarabina, atenolol, oxitetraciclina, glafenina y clorhidrato de oximetazolina; aquellos en los que el agente promotor de la expresión de EAAT2 se selecciona entre el grupo que consiste en penicilina V potásica, cloruro de decualinio, quinapril, amoxicilina, metanosulfonato de pridinol, aclomida y clorhidrato de vancomicina; aquellos en los que el agente promotor de la expresión de EAAT2 se selecciona entre el grupo que consiste en penicilina V potásica, cloruro de decualinio y quinapril.

ES 2 328 811 T3

El agente promotor de la expresión de EAAT2 se puede usar para disminuir la concentración de glutamato extracelular en un mamífero, donde se administra al mamífero al menos un agente promotor de la expresión de EAAT2. El agente promotor de la expresión puede ser un antibiótico identificado por un ensayo de exploración que incluye los pasos de:

- a) poner en contacto una célula que expresa EAAT2 con un antibiótico de ensayo; y
- b) determinar si la expresión del EAAT2 en la célula se modula en presencia del antibiótico de ensayo con respecto a la ausencia del antibiótico de ensayo, identificando de este modo un antibiótico que modula la expresión de EAAT2.

La expresión de la proteína EAAT2 se puede aumentar *in vivo* o la expresión de la proteína EAAT2 se puede aumentar *in vitro*. En estos métodos, el agente promotor de la expresión de EAAT2 es un antibiótico y el agente promotor de la expresión de EAAT2 puede comprender opcionalmente al menos un elemento estructural seleccionado entre heterociclos que tienen al menos un átomo de azufre de anillo, aminas cuaternario, sales de amonio cuaternario, esteroides, polioles, policétidos, guanidina, urea o arsenato.

En otro aspecto, el agente promotor de la expresión de EAAT2 se puede usar cuando el mamífero es un primate; y cuando el mamífero es un ser humano. La concentración extracelular de glutamato se puede reducir al menos aproximadamente el 50% con respecto a la concentración no regulada; o la concentración extracelular de glutamato se puede reducir al menos aproximadamente el 75% con respecto a la concentración no regulada.

La enfermedad o el trastorno asociado con transmisión alterada de glutamato puede ser una enfermedad neurológica (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades neurológicas agudas, epilepsia, lesión de médula espinal, traumatismo cerebral, glaucoma o trastornos psiquiátricos. El método puede ser aquel en el que el agente promotor de la expresión de EAAT2 es un compuesto identificado por un ensayo de exploración como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un antibiótico que es un compuesto identificado por un ensayo de exploración que incluye los pasos de:

- a) poner en contacto una célula que expresa EAAT2 con un antibiótico de ensayo; y
- b) determinar si la expresión del EAAT2 en la célula está modulada en presencia del antibiótico de ensayo en comparación con la ausencia del antibiótico de ensayo, identificando de este modo un antibiótico que modula la expresión del EAAT2 como un compuesto que es capaz de tratar una enfermedad o un trastorno neurológico.

El agente promotor de la expresión de EAAT2 puede ser un antibiótico β -lactámico; o el agente promotor de la expresión de EAAT2 puede ser un compuesto de la clase de penicilina, clase de cefalosporina, clase de carbapenam o clase de monobactámico.

Otro aspecto es uno en el que la enfermedad o el trastorno neurológico asociado con transmisión alterada de glutamato está asociado con aprendizaje o memoria o la mejora de aprendizaje, memoria; o mejora cognitiva.

Al sujeto (que incluye un sujeto identificado como que necesita tal tratamiento) se puede administrar una cantidad eficaz de un antibiótico descrito en este documento o una composición descrita en este documento para producir tal efecto. La identificación de un sujeto que necesita tal tratamiento puede ser a criterio de un sujeto o un profesional sanitario y puede ser subjetiva (por ejemplo, opinión) u objetiva (por ejemplo, medible por un método de ensayo o de diagnóstico).

La Tabla 1 enumera compuestos (o sales o solvatos de los mismos) útiles en los métodos definidos en este documento.

TABLA 1

Compuestos β -lactámicos

Penicilinas	Cefalosporinas y cefamicinas	Otros Beta Lactámicos
bencilpenicilina (penicilina g)	cefaclor	Aztreonam
bencilpenicilina procaína	cefadroxilo	Imipenem
(penicilina procaína)	cefadilo	Meropenem
fenoximetilpenicilina	cefalexina	Ertapenem
(penicilina v)	cefamandol	FK-037
penicilina benzatina	cefazolina	
hetacilina	cefditoreno	
cloxacilina	cefepima	
carbenicilina	cefetamet	
flucloxacilina	cefdinir	
ampicilina	cefixima	
amoxicilina	cefizox	
co-amoxiclav	cefotaxima	
carboxipenicilina	cefinetazol	
ticarcilina	cefobid	
timentina	cefonicid	
tazocina (ureidopenicilina	cefoperazona	
piperacilina con el inhibidor	cefotan	
de beta-lactamasa	cefotetan	
tazobactam)		
piperacilina	cefoxitina	
pivmecilinam	cefipiroma	
amoxicilina-clavulanato	cefpodoxima	
piperacilina	cefpodoxima proxetilo	
oxacilina	cefprozilo	
	cefradina	
	ceftazidima	
	ceftibuteno	
	ceftidoreno	
	ceftina	
	ceftizoxima	
	ceftriaxona	
	cefuroxima	
	cefuroxima axetilo	
	cefalexina	
	cefzilo	
	cefalotina	

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1, que comprende la Fig. 1A a la Fig. 1F, es una serie de imágenes que demuestra que los antibióticos β -lactámicos son inductores de la proteína EAAT2 basándose en una exploración de 1040 fármacos aprobados por la FDA. La Fig. 1A muestra cultivos de médula espinal incubados con compuesto de ensayo; la Fig. 1B es una transferencia por ranuras de muestra de homogeneizados tisulares; la Fig. 1C ilustra una transferencia por ranuras de exploración representativa; la Fig. 1D ilustra los resultados de exploración de una biblioteca de compuestos de ensayo; la Fig. 1E es una ilustración de los resultados de expresión del tratamiento con diversos compuestos categorizados por clases; la Fig. 1F muestra un análisis de dosis-respuesta de la expresión de EAAT2 para ceftriaxona.

La Fig. 2, que comprende la Fig. 2A a la Fig. 2G, es una serie de imágenes que demuestra la generación de ratones transgénicos indicadores con promotor. Las Fig. 2A-2E ilustran la expresión de fragmentos de promotor de EAAT2 en cerebro de ratón a las dos semanas y expresión extendida del indicador en astrocitos por todo el parénquima cerebral. La Fig. 2F muestra astrocitos del indicador de promotor de EAAT1 y la Fig. 2G muestra la expresión cortical del indicador Bac-eGFP de EAAT1 en ratones transgénicos.

La Fig. 3, que comprende la Fig. 3A y la Fig. 1B, es una serie de imágenes que demuestra que los β -lactámicos activan el promotor de EAAT2. La Fig. 3A muestra la activación (por clase de compuesto) del promotor de EAAT2 por diversos compuestos de ensayo en células Cos7 y la Fig. 3B muestra la activación (por clase de compuesto) del promotor de EAAT2 en astrocitos humanos transfectados con el indicador eGFP de promotor de EAAT2. Los antibióticos β -lactámicos (10 μ M) activan de forma marcada el promotor de EAAT2, aunque los controles tales como glutamato no tienen efecto. El activador conocido, dibutilil AMP cíclico, tiene un efecto uniforme, pero menor.

La Fig. 4, que comprende la Fig. 4A a la Fig. 4D, demuestra que la ceftriaxona induce la expresión de GLT1 y GLT1b, pero no de otras proteínas, *in vivo*. A ratas se inyectan (ip) diariamente durante 5 días ceftriaxona (200 mg/kg) una dosis conocida por producir concentraciones cerebrales micromolares bajas. La Fig. 4A es una transferencia de western del efecto de ceftriaxona sobre la expresión de GLT-1 y GLT-1B en el hipocampo; la Fig. 4B ilustra el efecto de ceftriaxona sobre la expresión de GLT-1 y GLT-1B en el hipocampo; la Fig. 4C es una transferencia de western del efecto de ceftriaxona sobre la expresión de GLAST, EAAC1 y EAAT4; la Fig. 4D ilustra el efecto de ceftriaxona sobre la expresión de GLAST, EAAC1 y EAAT4.

La Fig. 5 ilustra el efecto de diversos antibióticos sobre el transporte de glutamato. La Fig. 5 demuestra que la administración del antibiótico β -lactámico ceftriaxona y penicilina conduce a un aumento funcional en el transporte de glutamato. El tratamiento diario con ceftriaxona o penicilina (200 mg/kg, 5 días) no solamente aumentó la proteína GLT1, sino que también aumentó el transporte de glutamato mediado por GLT1, como se determina por ensayos de transporte de 3 H-glutamato (en presencia/ausencia de dihidrocainato, para medir el transporte específico de GLT-1). Se observó que el antibiótico no β -lactámico vancomicina no aumentó la actividad del transporte de glutamato.

La Fig. 6, que comprende la Fig. 6A a la Fig. 6D, demuestra la neuroprotección por ceftriaxona. La Fig. 6A ilustra el efecto de ceftriaxona sobre la tolerancia isquémica. Se observó que la privación de oxígeno-glucosa (OGD) de neuronas corticales condujo a muerte celular fiable; mientras que el pre-acondicionamiento con OGD breve era protector. Se consiguió una protección similar por pre-tratamiento con ceftriaxona (1 μ M). La Fig. 6B ilustra el efecto de ceftriaxona sobre la degeneración de neurona motora. Se observó que la ceftriaxona evitó la degeneración de neurona motora *in vitro*. El tratamiento crónico de cultivos organotípicos de médula espinal con el inhibidor de transporte de glutamato treo-hidroxiaspartato condujo a la pérdida de >50% de neuronas motoras.

El co-tratamiento con ceftriaxona evitó esta pérdida excitotóxica de neuronas motoras. La Fig. 6C ilustra el efecto de ceftriaxona sobre la fuerza de agarre (modelo *in vivo*); la Fig. 6D ilustra el efecto de ceftriaxona sobre la supervivencia en ratones con ALS SOD1 G93A. Se observó que la terapia con ceftriaxona (200 mg/kg al día i.p.) retrasó la pérdida de fuerza muscular en ratones SOD1 G93A. La terapia se inició con la aparición de la enfermedad (aproximadamente a las 12 semanas de edad). Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control de solución salina ($P < 0,05$) en cada punto de tiempo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de la secuencia del promotor de EAAT2. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un antibiótico en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno neurológico asociado con transmisión alterada de glutamato y ensayos de exploración para identificar antibióticos adecuados.

Los aminoácidos ácidos glutamato (Glu) y aspartato son los neurotransmisores excitatorios predominantes en el sistema nervioso central (SNC) del mamífero. Aunque existen concentraciones milimolares de estos aminoácidos excitatorios (EAA) en el cerebro, las concentraciones extracelulares se mantienen en el intervalo micromolar bajo para facilitar la transmisión sináptica nítida y para limitar el potencial neurotóxico de estos EAA. Una familia de transportadores de alta afinidad dependientes de Na^+ es responsable de la regulación y el aclaramiento de EAA extracelulares.

El glutamato y aspartato activan canales iónicos regulados por ligando que se denominan por los agonistas N-metil-D-aspartato (NMDA), a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y cainato. Estos receptores de EAA ionótrópos median en la despolarización sináptica rápida y son importantes para varios procesos fisiológicos adicionales, que incluyen plasticidad sináptica y desarrollo de sinapsis. Los EAA también activan una familia de receptores de metabótrópos acoplados mediante proteínas G a sistemas de mensajero secundario o canales iónicos. Está bastante comprobado que los EAA son extremadamente importantes para la función cerebral normal. Sin embargo, existe una evidencia sustancial de que una acumulación extracelular de EAA y activación excesiva de receptores de EAA también contribuyen a la muerte celular neuronal observada en lesiones agudas en el SNC. El proceso conocido como "excitotoxicidad" también puede contribuir a la pérdida neuronal observada en enfermedades neurodegenerativas crónicas, que incluyen esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Las concentraciones intracelulares de glutamato (5-10 nM) y aspartato (1-5 mM) son de 1000 veces superiores a las concentraciones extracelulares (<1-10 μ M). A diferencia de muchos otros neurotransmisores, no existen indicios de que el glutamato o aspartato se metabolizan extracelularmente. En lugar de esto, se aclaran del espacio extracelular por transporte al interior de neuronas y astrocitos.

Se han identificado varios subtipos de transportadores de glutamato dependientes de Na^+ mediante estrategias farmacológicas y clonación de ADNc. Cinco clones de ADNc distintos conocidos que expresan transporte de glutamato de alta afinidad dependiente de Na^+ se denominan en este documento GLT-1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, GLAST/EAAT1, EAAT4 y EAAT5. También existen indicios de heterogeneidad adicional de GLT-1 y GLAST que se origina por el corte y empalme alternativo de ARNm.

La expresión de dos de estos transportadores, GLT-1 y GLAST, generalmente está restringida a astroglia. La expresión de los otros dos transportadores, EAAC1 y EAAT4, generalmente está restringida a neuronas y se piensa que EAAT5 está restringido a la retina. De los tres transportadores encontrados en el prosencéfalo (GLT-1, GLAST y EAAC1), GLT-1 parece ser el único transportador que es específico para el tejido cerebral, sugiriendo que la expresión de GLT-1 está controlada por mecanismos cerebrales específicos.

Previamente se pensó que los transportadores pre-sinápticos tienen un papel principal en el aclaramiento de EAA durante la transmisión sináptica. Esto se basaba en los indicios de que la actividad está enriquecida dos veces en preparaciones de membrana sinaptosómica en comparación con fracciones enriquecidas en mitocondrias o mielina. Sin embargo, ahora se conoce que estas preparaciones de membrana contienen membranas gliales reselladas y cantidades enormes de proteína GLT-1. Además, desde hace tiempo se conoce que las lesiones de aferentes específicos dan como resultado una disminución del transporte dependiente de Na^+ a áreas diana. Por ejemplo, las lesiones de las proyecciones corticales al cuerpo estriado dan como resultado la captación disminuida en sinaptosomas del estriado. Estos tipos de estudios sugirieron que había transporte significativo al interior de terminales pre-sinápticos, pero los estudios más recientes han sugerido que estas lesiones reducen la expresión de los transportadores gliales.

Los indicios de varias estrategias complementarias sugieren firmemente que el GLT-1 media en la gran parte del transporte dependiente de Na^+ de EAA en el SNC. Por ejemplo, las propiedades farmacológicas de GLT-1 son paralelas al componente predominante de actividad observado en membranas de cerebro de rata. Basándose en el enriquecimiento requerido para purificar GLT-1 hasta homogeneidad, se piensa que GLT-1 representa aproximadamente el 1% de la proteína cerebral total. La inmunoprecipitación selectiva de GLT-1 de tejido prosencefálico solubilizado y reconstitución de la proteína remanente en liposomas, sugiere que GLT-1 media en el 90% de la actividad de transporte. Una reducción de la expresión con oligonucleótidos anti-sentido de GLT-1 da como resultado reducciones espectaculares en la actividad del transportador sinaptosómico en varias regiones del prosencéfalo. La captación sinaptosómica en ratones a los que se ha deleciónado genéticamente GLT-1 es el 5% de la normal. Finalmente, el registro electrofisiológico de corrientes mediadas por transportador en preparaciones de cerebro sugiere firmemente que GLT-1 tiene un papel principal para el aclaramiento de glutamato durante la transmisión sináptica en varias regiones del prosencéfalo.

La expresión de GLT-1/EAAT2 está regulada dinámicamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque GLT-1 es el transportador predominante en el SNC adulto, la expresión es más bien baja de forma temprana en el desarrollo y aumenta durante la sinaptogénesis tanto en ratas como en seres humanos. Como se ha descrito anteriormente, las lesiones de proyecciones en un núcleo diana particular dan como resultado la expresión disminuida de ambos transportadores gliales, GLT-1 y GLAST. Estos datos sugieren que la presencia de neuronas induce y/o mantiene la expresión de los transportadores gliales.

Varios grupos diferentes han demostrado expresión disminuida de GLT-1 y/o GLAST en modelos animales de lesiones agudas del SNC, que incluyen apoplejía y lesión cerebral traumática. Se ha demostrado una pérdida en la expresión de GLT-1 en pacientes con ALS. Además, existen indicios de expresión disminuida de estos transportadores en seres humanos con enfermedades neurodegenerativas crónicas, que incluyen Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Huntington. La pérdida de GLT-1 también es una característica del tumor cerebral mortal, glioblastoma multiforme.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es la forma más común de enfermedad de neurona motora del adulto en la que existe degeneración progresiva tanto de las neuronas motoras superiores en la corteza como de las neuronas motoras inferiores en el tronco encefálico y la médula espinal. La mayoría de los casos de ALS (95%) aparentemente son esporádicos (SALS), aunque aproximadamente el 5% son familiares (FALS). Cleveland DW, Rothstein JD., Nat. Rev. Neurosci. (2001); 2: 806-819; Kuncel RW, Crawford TO, Rothstein JD, Drachman DB. Motor neuron diseases. En: Asbury AK *et al.*, editores. Diseases of the Nervous System. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992: 1179-1208. Se observó que los casos de FALS estaban asociados con mutaciones en SOD-1 (Andersen PM *et al.* Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an overview. En: Brown RH, Jr., Meininger V, Swash M, editores. Amyotrophic lateral sclerosis. London: Martin Dunitz, 2000: 223-250; Brown RH, Jr. Amyotrophic lateral sclerosis. Insights from genetics. Arch Neurol 1997; 54: 1246-1250; Cleveland DW, Rothstein JD. Nat. Rev. Neurosci. 2001; 2: 806-819), el gen que codifica la superóxido dismutasa de cobre-cinc (CuZnSOD). Las mutaciones de SOD1 representan aproximadamente el 15-20% de todas las FALS. Las mutaciones SOD1 se han usado para generar modelos de ratón transgénico; SOD1 G93A, G37R, G86R y G85R producen todos degeneración de neurona motora fiable en ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína mutante. Cleveland DW., Neuron 1999; 24: 515-520; Cleveland DW *et al.*, Nature 1995; 378: 342-343; Cleveland DW, Rothstein JD. Nat. Rev. Neurosci. 2001; 2: 806-819. Los acontecimientos patógenos

“cadena abajo” de la toxicidad de SOD1 mutante incluyen excitotoxicidad, neuroinflamación y apoptosis. Cada vez más, estos acontecimientos cadena abajo han sido la diana de farmacoterapia -en algunos casos, alterando de forma exitosa el desarrollo de la enfermedad. Se han identificado múltiples otros genes o localización cromosómica en otras variantes familiares de ALS.

Es común para la ALS tanto familiar como esporádica la pérdida de la proteína de transportador de glutamato astrogial EAAT2. Como se ha descrito anteriormente, el transportador astrogial EAAT2 es la proteína predominante responsable de la gran parte del aclaramiento sináptico de glutamato. En particular, el EAAT2 protege contra neurodegeneración excitotóxica. Los indicios de anormalidades en el manejo de glutamato surgieron inicialmente en ALS a partir del descubrimiento de grandes aumentos en niveles de líquido cerebral de glutamato en pacientes con ALS, hallazgos descritos ahora en ~40% de pacientes con ALS esporádica. Rothstein JD *et al.* Ann. Neurol. 1990; 28: 18-25; Spreux-Varoquaux O *et al.* J Neurol Sci. 2002; 193: 73-78. La medición del transporte de glutamato funcional en tejido con ALS puso de manifiesto una disminución marcada en las regiones cerebrales de ALS afectadas. La pérdida del transportador de glutamato funcional es probablemente el resultado de una pérdida espectacular de la proteína transportadora de glutamato astrogial EAAT2, que puede estar hasta en el 65% de pacientes con ALS esporádica. Rothstein JD *et al.*, Ann. Neurol. 1994; 36: 282; Rothstein JD, *et al.* N Engl. J Med 1992; 326: 1464-1468; Rothstein JD *et al.*, Ann Neurol 1995; 38: 73-84. Sin tener en cuenta el mecanismo, la disminución de EAAT2 con oligonucleótidos anti-sentido ha demostrado que la pérdida de la actividad de transporte provoca directamente muerte neuronal. Además, la expresión de al menos tres mutantes de SOD1 (G85R, G93A, G37R) en ratones transgénicos condujo a una pérdida de la proteína EAAT2 y su función. Rothstein JD *et al.*, Neuron 1996; 16: 675-686; Rothstein JD *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 6591-6595. En conjunto, estos y otros estudios sugieren que la pérdida funcional de EAAT2 (asociada con disfunción de astrocitos) contribuye a la pérdida de neuronas motoras en ALS tanto hereditaria como esporádica. Recientemente también se ha documentado una pérdida de la proteína GLT-1/EAAT2 en un nuevo modelo transgénico de rata de la enfermedad. Howland DS *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 1604-1609. *En particular, la pérdida de proteína transportadora precede a la degeneración real de neuronas motoras y sus axones en el modelo de rata.*

Dos laboratorios han proporcionado recientemente datos importantes en cuanto a la importancia de EAAT2 como un terapéutico. El Dr. Glen Lin describió que una sobre-expresión de 2 veces de EAAT2 en ratones transgénicos conduce a neuroprotección *in vitro* y retrasó la aparición de enfermedad en ratones con ALS. Guo, H. *et al.* Hum Mol Genet. 2003; 12: 2519-2532. De forma similar, Dr. Margaret Sutherland ha descrito que una sobre-expresión de cinco veces de EAAT2 en ratones transgénicos puede aumentar la supervivencia de ratones SOD1 G93A al menos 30 días (y en varios animales, muchos meses más). Maguire JL, *et al.* Soc Neurosci Abstr. 2001; 27: 607.9; Sutherland M. L., *et al.* Soc Neurosci Abs. 2003. Además, su laboratorio ha descrito que el EAAT2 aumentado también puede atenuar los ataques y disminuir significativamente tanto los ataques como el crecimiento tumoral en roedores con xenoinjerto de glioma. Como se mostrará a continuación, también se han generado datos que sugieren que la sobre-expresión de EAAT2 puede retrasar la aparición de enfermedad en ratones con ALS usando terapéuticos novedosos.

Incluso aunque la expresión de GLT-1 es extremadamente alta *in vivo*, los astrocitos “normales” mantenidos en cultivos esencialmente no expresan ARNm o proteína detectable. El co-cultivo de astrocitos con neuronas induce la expresión glial de GLT-1, sugiriendo que las neuronas inducen y/o mantienen la expresión de GLT-1 *in vitro*. Este efecto de neuronas, al menos en parte, está mediado por una molécula secretada soluble. Varias moléculas pequeñas imitan este efecto de neuronas, incluyendo dbcAMP, factor de crecimiento epidérmico, péptido activador de adenilato ciclase hipofisaria e inmunofilina. En todos estos casos, los aumentos en la expresión de proteína GLT-1 están acompañados por un aumento en el ARNm de GLT-1 y un cambio en la morfología de los astrocitos que muchos piensan que es reminiscente de la diferenciación.

Los efectos de dbcAMP están bloqueados por un inhibidor de la proteína cinasa A. Se ha demostrado que el aumento en la expresión de GLT-1 inducida por dbcAMP, factor de crecimiento epidérmico o medio acondicionado para neuronas está bloqueada completamente por un inhibidor de fosfatidilinositol 3-cinasa o un inhibidor del factor de transcripción NF- κ B. Por lo demás, se conoce poco acerca de los mecanismos que controlan realmente la expresión de GLT-1. Por tanto, la identificación del promotor de EAAT2 proporciona una herramienta valiosa para comprender la regulación de EAAT2 y para desarrollar ensayos para controlar su síntesis.

Como se usa en este documento, el término “EAAT2” se refiere al gen de transportador 2 de glutamato astrogial humano. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.658.782 que describe la secuencia de ADNc de EAAT2 humano, cuya descripción está incorporada específicamente en este documento como referencia. Como se usa en este documento, el término “GLT-1” se refiere al gen del transportador 2 de glutamato astrogial de roedor.

Como se usa en este documento, el término “promotor” se refiere de forma general a una región de ADN genómico, encontrada habitualmente 5' con respecto a un sitio de inicio de la transcripción de ARNm. Los promotores están implicados en la regulación de la sincronización y el nivel de transcripción de ARNm y contienen, por ejemplo, sitios de unión para proteínas celulares tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Como se usan de forma intercambiable en este documento, las expresiones “promotor de EAAT2”, “región promotora de EAAT2” y similares incluyen la región de ADN genómico encontrada 5' con respecto al sitio de inicio de la transcripción de ARNm de EAAT2. En realizaciones preferidas, el promotor de EAAT2 comprende la SEC ID N°: 1, 2, 3 ó 4 o fragmentos de la misma. Cuando se insertan en una construcción indicadora sin promotor, los fragmentos de promotor de EAAT2 preferidos son capaces de dirigir la transcripción del gen indicador.

En una realización, el promotor de EAAT2 incluye la SEC ID N°: 1 (por ejemplo, nucleótidos 1-4696 de la SEC ID N°: 1). En otra realización, el promotor de EAAT2 incluye una región P1, que comprende los nucleótidos 733-3450 de la SEC ID N°: 1 (también indicada como SEC ID N°: 2). En otra realización, el promotor de EAAT2 incluye una región P2, que comprende los nucleótidos 733-3186 de la SEC ID N°: 1 (también indicada como SEC ID N°: 3). En otra realización más, el promotor de EAAT2 incluye una región P3, que comprende los nucleótidos 2590-3450 de la SEC ID N°: 1 (también indicada como SEC ID N°: 4).

Las moléculas de activación del promotor de EAAT2 de la presente invención proporcionan agentes terapéuticos para trastornos neurológicos y psiquiátricos. Como se usa en este documento, la expresión “trastorno neurológico” incluye un trastorno, enfermedad o afección que afecta al sistema nervioso, por ejemplo, el sistema nervioso central. Los trastornos neurológicos que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen trastornos específicos que se han descrito que están asociados con excitotoxicidad. Se incluyen particularmente los trastornos neurológicos especificados que afectan a la función de neurona motora. Los trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), trastornos de expansión de repetición de trinucleótidos (por ejemplo; enfermedad de Huntington (HD), atrofia muscular espinal y bulbar, ataxia espinocerebelosa tipos 1, 2, 6 y 7, atrofia dentado-rubro-pálido-luisiana y enfermedad de Machado-Joseph), α -sinucleinopatías (por ejemplo, enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y atrofia multi-sistémica (MSA)), esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer, tumores cerebrales (por ejemplo, glioblastoma), apoplejía/isquemia, enfermedad cerebrovascular, epilepsia (por ejemplo, epilepsia del lóbulo temporal), demencia asociada con VIH, enfermedad de Korsakoff, dolor crónico, dolor neurogénico, neuropatías dolorosas, cefaleas (por ejemplo, migrañas), enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, parálisis de Bell, afasia, trastornos del sueño, glaucoma y enfermedad de Meniere.

Además, las moléculas de activación del promotor de EAAT2 de la presente invención proporcionan agentes terapéuticos para la modulación de la neurotransmisión de glutamato normal asociada con funciones cerebrales tales como aprendizaje y memoria. Las moléculas descritas en este documento se pueden administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento para la mejora de la memoria y el aprendizaje.

Como se usa en este documento, la expresión “trastorno psiquiátrico” se refiere a enfermedades y trastornos de la mente e incluye enfermedades y trastornos enumerados en el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Cuarta Edición (DSM-IV), publicada por la American Psychiatric Association, Washington D.C. (1994). Los trastornos psiquiátricos incluyen, pero sin limitación, trastornos de ansiedad (por ejemplo, trastorno de estrés agudo, agorafobia, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de angustia, trastorno de estrés pos-traumático, trastorno de ansiedad por separación, fobia social y fobia específica), trastornos de la infancia, (trastorno de déficit de atención/hiperactividad, trastornos de la conducta y trastorno negativista desafiante), trastornos alimenticios (por ejemplo, anorexia nerviosa y bulimia nerviosa), trastornos del ánimo (por ejemplo, depresión, trastorno bipolar, trastorno ciclotímico, trastorno distímico y trastorno depresivo mayor), trastorno de la personalidad (por ejemplo, trastorno antisocial de la personalidad, trastorno de la personalidad por evitación, trastorno límite de la personalidad, trastorno de la personalidad por dependencia, trastorno histriónico de la personalidad, trastorno narcisista de la personalidad, trastorno obsesivo-compulsivo de la personalidad, trastorno paranoide de la personalidad, trastorno esquizoide de la personalidad y trastorno esquizotípico de la personalidad), trastornos psicóticos (por ejemplo, trastorno psicótico breve, trastorno delirante, trastorno esquizoafectivo, trastorno esquizofreniforme, esquizofrenia y trastorno psicótico compartido), trastornos relacionados con sustancias (por ejemplo, dependencia del alcohol, dependencia de anfetaminas, dependencia de cannabis, dependencia de cocaína, dependencia de alucinógenos, dependencia de inhalantes, dependencia de nicotina, dependencia de opioides, dependencia de fenciclidina y dependencia de sedantes), trastorno de ajuste, autismo, delirio, demencia, demencia multi-infarto, trastornos de aprendizaje y memoria (por ejemplo, amnesia y pérdida de memoria relacionada con la edad) y trastorno de Tourette.

Como se ha señalado, los trastornos neurológicos y psiquiátricos de interés específico incluyen los asociados con liberación o eliminación anormal de aminoácidos excitotóxicos tales como glutamato. Varios tipos de neuronas del SNC están afectadas de forma especialmente adversa por glutamato excitotóxico. Véase, por ejemplo, Choi, D. W. (1988) Neuron 1: 623; y referencias citadas en ese documento. Los trastornos neurológicos específicamente preferidos incluyen AD, HD, PD, prefiriéndose especialmente ALS.

III. Ensayos de Exploración

La invención proporciona un método (también denominado en este documento un “ensayo de exploración”) para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen al promotor de EAAT2 y/o que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre, por ejemplo, la actividad del promotor de EAAT2.

En una realización, la invención proporciona ensayos para explorar compuestos candidatos o de ensayo que son moduladores de la actividad del promotor de EAAT2. En otra realización, la invención proporciona ensayos para explorar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a o modulan la actividad de un promotor de EAAT2. Los compuestos de ensayo de la presente invención se pueden obtener usando cualquiera de las numerosas estrategias en métodos de biblioteca combinatorial conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o fase de solución paralelas dirigibles espacialmente; métodos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el método de biblioteca “una perla un compuesto”; y métodos de biblioteca sintética que usan selección

por cromatografía de afinidad. La estrategia de biblioteca biológica está limitada a bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias se pueden aplicar a bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas de compuesto (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 45).

Los ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. USA* 90: 6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261: 1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421) o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364: 555-556), bacterias (Ladner Patente de Estados Unidos N° 5.223.409), esporas (Ladner Patente de Estados Unidos N° 409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249: 386-390); (Devlin (1990) *Science* 249: 404-406); (Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-310); (Ladner anteriormente).

En una realización preferida, un ensayo es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa un gen indicador unido operativamente a un promotor de EAAT2 o una porción del mismo (por ejemplo, cuya expresión está bajo el control del promotor de EAAT2 o porción del mismo) se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad del promotor de EAAT2. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad del promotor de EAAT2 se puede conseguir controlando, por ejemplo, la expresión del gen indicador (por ejemplo, nivel de expresión de ARNm indicador o polipéptido) o actividad. Como se describe a lo largo de este documento, el indicador puede ser cualquier marcador detectable. Por ejemplo, el indicador puede ser una secuencia de ácido nucleico, cuya expresión se puede medir, por ejemplo, mediante transferencia de Northern, RT-PCR, extensión por cebador o ensayos de protección de nucleasa. El indicador también puede ser una secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido, cuya expresión se puede medir, por ejemplo, mediante transferencia de Western, ELISA o ensayos RIA. La expresión del indicador también se puede controlar midiendo la actividad del polipéptido codificado por el indicador mediante el uso, por ejemplo, de un ensayo de transporte de glutamato convencional, un ensayo de luciferasa, un ensayo de β -galactosidasa, un ensayo de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) o un ensayo de proteína fluorescente.

El nivel de expresión o actividad de un indicador bajo el control del promotor de EAAT2 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión o actividad del indicador en ausencia del compuesto candidato. Después, el compuesto candidato se puede identificar como un modulador de la actividad del promotor de EAAT2 basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm indicador o la expresión de proteína o la actividad es mayor (de forma estadísticamente significativa mayor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la actividad del promotor de EAAT2. Alternativamente, cuando la expresión o actividad de ARNm indicador o proteína es menor (de forma estadísticamente significativa menor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la actividad de promotor de EAAT2.

También se puede determinar la capacidad del compuesto de ensayo de unirse al promotor de EAAT2 y/o para modular la unión de proteínas (por ejemplo, factores de transcripción) al promotor de EAAT2. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de unirse a y/o modular la unión del promotor de EAAT2 a una proteína de unión se puede conseguir, por ejemplo, acoplando el compuesto de ensayo, el promotor de EAAT2 o la proteína de unión a un radioisótopo o marcador enzimático de tal forma que la unión del promotor de EAAT2 al compuesto de ensayo o la proteína de unión se puede determinar detectando el componente marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos (por ejemplo, el compuesto de ensayo, el promotor de EAAT2 o una proteína de unión) se pueden marcar con ^{32}P , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , directamente o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar por recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Alternativamente, los compuestos se pueden marcar enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina o luciferasa y el marcador enzimático se puede detectar por determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

También pertenece al alcance de esta invención determinar la capacidad de un compuesto (por ejemplo, un compuesto de ensayo o una proteína de unión a promotor de EAAT2) de interactuar con el promotor de EAAT2 sin marcar ninguno de los compuestos de interacción. Por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la interacción de un compuesto con el promotor de EAAT2 sin el marcado del compuesto o del promotor de EAAT2 (McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257: 1906-1912). Como se usa en este documento, un "microfisiómetro" (por ejemplo, Cytosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico de luz direccionada (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden usar como un indicador de la interacción entre un compuesto y el promotor de EAAT2.

En otra realización, el ensayo es un ensayo sin células en el que un promotor de EAAT2 o una porción del mismo se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo de modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad del promotor de EAAT2 o porción del mismo. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de un promotor de EAAT2 se puede conseguir, por ejemplo, determinando la capacidad del promotor de EAAT2 de unirse a una molécula diana de promotor de EAAT2

mediante uno de los métodos que se han descrito anteriormente para determinar la unión directa. La determinación de la capacidad del promotor de EAAT2 de unirse a una molécula diana de promotor de EAAT2 también se puede conseguir usando una tecnología tal como Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real. Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345 y Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705.

5 Como se usa en este documento, “BIA” es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los compuestos de interacción (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR) se pueden usar como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

10 En otra realización más, el ensayo sin células implica poner en contacto un promotor de EAAT2 o porción del mismo con un compuesto conocido que se une al promotor de EAAT2 (por ejemplo, un componente de la maquinaria de transcripción basal) para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de interaccionar con el promotor de EAAT2, donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de interaccionar con el promotor de EAAT2 comprende

15 determinar la capacidad del promotor de EAAT2 de unirse preferentemente a o modular la actividad de una molécula diana de promotor de EAAT2.

En más de una realización de los anteriores métodos de ensayo de la presente invención, puede ser deseable inmovilizar el promotor de EAAT2 o su molécula diana para facilitar la separación de formas que forman complejos de las que no forman complejos de una o ambas moléculas, así como para adaptar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a un promotor de EAAT2 o la interacción de un promotor de EAAT2 con un sustrato o molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato se puede conseguir en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de micro-centrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un

20 dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, se pueden adsorber proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/diana sobre perlas de glutatión-sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, Mo) o placas de micrómetro derivatizadas con glutatión, que después se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y la proteína diana no adsorbida o el promotor de EAAT2 y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas

25 o pocillos de placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de perlas, el complejo se determina directamente o indirectamente, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los compuestos se pueden disociar de la matriz y se puede determinar el nivel de unión o actividad de promotor de EAAT2 usando técnicas convencionales.

35 También se pueden usar otras técnicas para inmovilizar proteínas o ácidos nucleicos en matrices en los ensayos de exploración de la invención. Por ejemplo, un promotor de EAAT2 o un sustrato o molécula diana de promotor de EAAT2 se pueden inmovilizar utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Se pueden preparar promotor, sustratos o moléculas diana de EAAT2 biotinilados a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, III.) e inmovilizar en los

40 pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que reaccionan con el promotor de EAAT2 o moléculas diana pero que no interfieren del promotor de EAAT2 a su molécula diana se pueden derivatizar en los pocillos de la placa y la diana o el promotor de EAAT2 no unido se pueden capturar en los pocillos por conjugación con anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los que se han descrito anteriormente para los complejos inmovilizados de GST, incluyen inmunodetección de complejos

45 mediante el uso de anticuerpos reactivos con el promotor de EAAT2 o la molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas que dependen de la detección de una actividad enzimática asociada con el promotor de EAAT2 o la molécula diana.

En otro aspecto más de la invención, el promotor de EAAT2 se puede usar como “cebo” en un ensayo de un híbrido (véase, por ejemplo, BD Matchmaker One-Hybrid System (1995) *Clontechniques X*(3): 2-4; BD Matchmaker library Construction & Screening Kit (2000) *Clontechniques XV*(4): 5-7; BD SMART technology overview (2002) *Clontechniques XVII*(1): 22-28; Ausubel, F. M., *et al.* (1998 et seq.) *Current Protocols in Molecular Biology* Eds. Ausubel, F. M., *et al.*, págs. 13.4.1-13.4.10) para identificar proteínas que se unen a o interaccionan con el promotor de EAAT2 (“proteínas de unión a promotor de EAAT2” o “bp a promotor de EAAT2”) y están implicadas en la actividad

50 del promotor de EAAT2. Tales proteínas de unión a promotor de EAAT2 también están implicadas probablemente en la regulación de la transcripción del promotor de EAAT2.

En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación de dos o más de los ensayos descritos en este documento. Por ejemplo, se puede identificar un agente modulador usando un ensayo basado en células o sin células, y se puede

60 confirmar la capacidad del agente de modular la actividad de un promotor de EAAT2 *in vivo*, por ejemplo, en un animal tal como un modelo animal para una enfermedad neurológica.

Esta invención se refiere además a agentes novedosos identificados mediante los ensayos de exploración que se han descrito anteriormente. Por consiguiente, pertenece al alcance de esta invención usar adicionalmente un agente

65 identificado como se describe en este documento en un modelo animal apropiado (por ejemplo, un modelo animal para una enfermedad neurológica). Por ejemplo, un agente identificado como se describe en este documento (por ejemplo, un agente modulador de promotor de EAAT2 o una proteína de unión a promotor de EAAT2) se puede usar en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con un agente de este tipo.

Alternativamente, se puede usar un agente identificado como se describe en este documento en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de un agente de este tipo. Además, esta invención se refiere a usos de agentes novedosos identificados por los ensayos de exploración que se han descrito anteriormente para tratamientos como se describen en este documento.

En este documento se describen agentes que se identifican mediante el uso de métodos de exploración indicados en este documento. Estos compuestos incluyen una diversidad de estructuras químicas como se identifican en este documento, que incluyen compuestos que tienen un sistema de anillo β -lactámico, más específicamente, compuestos antibióticos β -lactámicos, que incluyen compuestos de la clase de penicilina, clase de cefalosporina, clase de carbapenam y clase de monobactámicos.

IV. Métodos de Tratamiento

El uso de un antibiótico de acuerdo con la presente invención tiene utilidad en el tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un antibiótico como un modulador del promotor de EAAT2 a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano).

Para modular la actividad del promotor de EAAT2 y, de este modo, modular la expresión del gen de EAAT2, por ejemplo; un compuesto descrito en este documento o identificado mediante los ensayos de exploración de la invención, se puede administrar a una célula o un sujeto. La administración de un modulador de promotor de EAAT2 a células de mamífero (que incluyen células humanas) puede modular (por ejemplo, regular positivamente o negativamente) la expresión de ARNm y/o polipéptido de EAAT2, regulando de este modo positivamente o negativamente el transporte de glutamato al interior de la célula. En tales métodos, el promotor de EAAT2 se puede administrar a un mamífero (que incluye un ser humano) mediante procedimientos conocidos.

Un antibiótico de acuerdo con la invención (que incluye uso profiláctico) se puede usar para la fabricación de un medicamento adecuado para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de promotor de EAAT2 a un animal que lo necesite, incluyendo un mamífero, particularmente un ser humano. Un medicamento de este tipo se administrará de forma adecuada a sujetos, particularmente seres humanos, que padecen, tienen, son susceptibles a o presentan riesgo de una enfermedad o un trastorno neurológico.

Para aplicaciones terapéuticas, el medicamento fabricado de acuerdo con la invención se puede administrar de forma adecuada a un sujeto tal como un mamífero, particularmente un ser humano, solo o como parte de una composición farmacéutica, que comprende el modulador de EAAT2 junto con uno o más portadores aceptables de los mismos y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El portador o portadores tienen que ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de la misma.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones se pueden presentar de forma conveniente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, comprimidos y cápsulas de liberación sostenida y en liposomas y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA (17^a ed. 1985).

Tales métodos preparativos incluyen el paso de poner en asociación con la molécula a administrar ingredientes tales como el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntimamente los ingredientes activos con portadores líquidos, liposomas o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformar el producto.

Las composiciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sobres o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite o introducir en liposomas y como un bolo, etc.

Un comprimido se puede preparar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos formados por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma fluida tal un polvo o gránulos, mezclada opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente con actividad superficial o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en forma de polvo humectado con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y se pueden formular a fin de proporcionar liberación lenta o controlada del ingrediente activo en los mismos.

Las composiciones adecuadas para administración tópica incluyen grageas que comprenden los ingredientes en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; y pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solamente la adición de portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección improvisada se pueden preparar a partir de polvo estéril, gránulos y comprimidos.

La aplicación de los terapéuticos sujeto frecuentemente será local, a fin de administrarse en el sitio de interés. Se pueden usar diversas técnicas para proporcionar las composiciones sujeto en el sitio de interés, tal como inyección, uso de catéteres, trocates, proyectiles, gel pluronic, endoprótesis vasculares, polímeros de liberación sostenida de fármaco u otros dispositivos que proporcionen acceso interno. Cuando un órgano o tejido es accesible debido a la retirada del paciente, tal órgano o tejido se puede bañar en un medio que contenga las composiciones sujeto, las composiciones sujeto se pueden aplicar pintando sobre el órgano o se pueden aplicar de cualquier modo conveniente.

Se entenderá que las cantidades preferidas reales de un modulador de EAAT2 dado de la invención usadas en una terapia dada variarán con el compuesto activo particular que se está utilizando, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación, el sitio de administración particular, el peso, estado general, sexo etc., del paciente, la indicación particular que se está tratando, etc. y tales factores adicionales que se reconocen por los especialistas en la técnica que incluyen el médico o veterinario a cargo del caso. Las velocidades de administración óptimas para un protocolo de administración dado se pueden determinar de forma sencilla por los especialistas en la técnica mediante el uso de ensayos de determinación de dosificación convencionales.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos. Se debe entender que estos ejemplos son solamente con propósitos ilustrativos y que no se tienen que considerar limitantes de esta invención de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis in vitro de la expresión de proteína EAAT2

Ensayo de Exploración para sobre-expresión de Proteína EAAT2. Se usan cultivos organotípicos de médula espinal y cultivos astrogiales para explorar para fármacos capaces de estimular la síntesis y función de EAAT2. Los cultivos organotípicos ofrecen la ventaja de que mantienen la arquitectura normal de interacciones neurona-astroglía *in vitro* y se obtienen de tejido post-natal; por tanto, pueden reflejar mejor las respuestas astrogiales *in vivo* (en lugar de células embrionarias). Por tanto, un fármaco que actúa sobre un astrocito -o induce a las neuronas para que secreten factores que alertan a los astrocitos- refleja mejor el estado "natural" de suministro de un fármaco a un animal completo.

Método de Bioensayo: la Figura 1 ilustra los resultados de una exploración de 1040 fármacos aprobados por la FDA. La exploración puso de manifiesto que los antibióticos β -lactámicos sirven como inductores de la proteína EAAT2. En resumen, la exploración incluye la incubación de cultivos de médula espinal con compuestos durante 3 días (Figura 1A). La Figura 1B ilustra una transferencia por ranuras de muestra de homogeneizados tisulares para validar la expresión aumentada de EAAT2 observada con controles crecientes que se sabe que tienen lugar con Dibutiril AMP cíclico, GDFN o la neuroinmunofinila GPI-1046. Los tres compuestos (dbcAMP, GDNF y GPI-1046) indujeron un gran aumento en la expresión de EAAT2 después de tres días en cultivo. La Figura 1C ilustra una transferencia por ranuras de datos típicos de proteína EAAT2 de una exploración temprana de diversos agentes. Cada transferencia incluyó tejido no tratado de control y un control positivo del panel B. La Figura 1D ilustra los resultados de exploración de la exploración la NIH-NINDS Custom Collection del 1040 compuestos aprobados por la FDA. La altura de las barras refleja la expresión aumentada de la proteína EAAT2 con respecto a controles no tratados. Cada transferencia incluyó al menos un control no tratado y un control positivo conocido. La Figura 1E ilustra antibióticos β -lactámicos que estaban altamente representados en la mayoría de los compuestos potentes. Estos compuestos eran capaces de aumentar la expresión de proteína EAAT2 hasta 7 veces en comparación con cultivos de control no tratados, después de un tratamiento crónico durante 7 días. La Figura 1F ilustra un análisis de dosis-respuesta para ceftriaxona poniendo de manifiesto CE_{50} 3,5 μ M para expresión de EAAT2.

Médula Espinal Organotípica. Se han descrito en el pasado con detalle cultivos organotípicos de médula espinal. Rothstein JD *et al.*, N. Engl. J. Med. 1992; 326: 1464-1468. En resumen, secciones de 300 μ m de médula espinal lumbar de rata, de crías de rata de 8-10 días post-natales, se ponen en membranas semipermeables Millipore Millicell CM. Cada pocillo contiene 5 cortes (Figura 1A). Semanalmente se pueden preparar cincuenta-100 cultivos. Cada fármaco (10-100 μ M) se añadió durante 3 días junto con medio de cultivo celular/suero. Los cultivos se recogieron y se aplicaron 5-50 μ g de tejido a un aparato de transferencia por ranuras para la detección de EAAT2 por métodos convencionales de transferencia de Western/quimioluminiscencia descritos en el pasado. Kuncel RW *et al.*, Motor neuron diseases. En: Asbury AK *et al.*, editores. Diseases of the Nervous System. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992: 1179-1208; Rothstein JD *et al.*, Neuron 1994; 13: 713-725. Todos los anticuerpos anti-péptido se purificaron

por afinidad y eran altamente específicos para subtipos de transportador. Se muestra un análisis de transferencia por ranuras típico en la Figura 1B, 1C. Mediante este método se pueden detectar de forma fiable aumentos superiores al 50% de la proteína expresada. Para cada transferencia por ranuras de anticuerpo, se espera que los homogeneizados usados estén dentro del intervalo lineal para detección de anticuerpos, basándose en curvas patrón anteriores.

Diseño de Ensayo de Bibliotecas de Exploración. La biblioteca de compuesto para estos primeros estudios era la NINDS Custom Collection de Microsource Discovery. La biblioteca está compuesta por 1040 compuestos en placas de 96 pocillos, que también incluían un control positivo para la síntesis de transportador (Dibutiril AMP cíclico. [dbcAMP], GDNF). La biblioteca es una colección única de compuestos bioactivos conocidos que permiten la evaluación simultánea de cientos de fármacos y patrones bioquímicos comercializados. Cada compuesto se estudió a una concentración final de 10-100 μ M. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se muestra una transferencia por ranuras típica en la Figura 1C.

Análisis de Datos. Se analizaron todas las transferencias por densitometría de láser (BioRad Image Quant) y se promediaron los puntos duplicados. El conjunto de datos de resultado completo de los 1040 compuestos se muestra en la Figura 1D. Cada transferencia incluyó un patrón de control positivo (por ejemplo, dbcAMP) y un patrón de control negativo (por ejemplo, DMSO de suero). Los datos se mantuvieron en hojas de cálculo Excel usando un sistema de codificación numérica/texto. Se re-evaluaron todos los fármacos positivos (definido el positivo como un aumento de al menos el 50% en la expresión de proteína).

Resultados: Los Fármacos Explorados Pueden Aumentar EAAT2 In Vitro. Después de explorar 1040 compuestos, se pudieron identificar más de 10 compuestos relacionados capaces de aumentar los niveles de proteína EAAT2 de 3,5 a 7 veces (véase la Figura 1E). En total, se identificaron 80 compuestos capaces de aumentar EAAT2 2 veces o más en la primera exploración. De esta lista, los antibióticos β -lactámicos estaban muy representados y eran el motivo estructural más común observado en todos los compuestos, eran activos quince antibióticos beta lactámicos diferentes. Como se muestra en la Figura 1E, estos β -lactámicos eran todos capaces de expresión aumentada de proteína EAAT2. Un análisis de dosis-respuesta de seguimiento (Figura 1F) puso de manifiesto una CE_{50} para la expresión de proteína para ceftriaxona de 3,5 μ M.

Ejemplo 2

Activación de indicador de promotor de EAAT2. Generación de Líneas Celulares Indicadoras de Promotor de COS7 y Astroglial Humano

Aislamiento de Promotor de EAAT2 (E2P) y Generación de Indicador. Se obtuvo un fragmento de promotor de EAAT2 de 2,7 kb cortando el clon PAC RP4-683L5 con Kpn1 y Nco1. Los estudios previos documentan que esa secuencia, 5' de la región codificante de EAAT2, tiene motivos de promotor y se puede activar *in vitro*. El promotor se clonó en el vector indicador de luciferasa pGL3-basic (Promega) (denominado pE2P-GL3) o plásmido pEGFP-1 (Clontech) (denominado pE2P-eGFP). El E2P también se clonó en un plásmido pLck-eGFP (una versión miristoilata de eGFP que dirige la proteína eGFP a la membrana). Finalmente, E2P también se clonó en un plásmido pE2P-Luciferasa-IRES-Lck-eGFP, que tenía el fragmento E2P-Luciferasa de pE2P-GL3, seguido de un IRES (sitio de entrada interno de ribosomas), seguido de Lck-eGFP (denominado pELILE). En esta última construcción, E2P dirige la expresión tanto de Luciferasa como de eGFP al mismo tiempo.

Generación de ratones Transgénicos E2P-eGFP y Bac-EAAT1-eGFP (Figura 2). Para proporcionar líneas celulares de exploración para los ensayos se han generado ahora de forma exitosa dos ratones transgénicos que expresan los fragmentos de promotor de EAAT2 (E2P) o el promotor de EAAT1 de longitud completa (Bac-EAAT1). Como se muestra en la Figura 2, se han generado ratones transgénicos E2P que demuestran expresión extendida del indicador del promotor de EAAT2 en el SNC. De forma similar, se han generado ratones Bac-EAAT1 y células de expresión. Recientemente, el grupo Heintz también ha generado un ratón basado en indicador Bac de EAAT1 basado en una construcción Bac similar usada en ratones.

Ensayos de Exploración. Se usó el reactivo Lipofectamine 2000 para transfectar células Cos-7 y HEK-293. Se obtuvieron células astrogliales corticales humanas del colaborador Dr. Avi Nath. Los EpE2P-eGFP, pE2P-Lck-eGFP y pELILE contienen un gen de resistencia a Neomicina que permitió el establecimiento de líneas celulares estables. Para las células astrogliales humanas se usó SV40 para inmortalizar la célula. Las células transfectadas de forma estable se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron con solución de compuesto 10 μ M durante 48 horas y se registró la intensidad de fluorescencia con un lector automatizado (SpectraGeminiXS).

Resultados: Identificación de compuestos de activación de Promotor de EAAT2 (Figura 3). De la exploración original de NINDS, se identificaron numerosos compuestos β -lactámicos capaces de activar de forma potente el promotor de EAAT2. Como se muestra en la Figura 3, la mayoría de los β -lactámicos fueron capaces de aumentar el promotor de EAAT bastante más que el control positivo conocido, dibutiril AMP cíclico. Todos los compuestos fueron activos a una concentración farmacológicamente pertinente de 1-10 μ M -un intervalo de concentración en el que estos compuestos se pueden encontrar en el SNC después de terapia anti-bacteriana convencional (por ejemplo, ceftriaxona).

Ejemplo 3

Activación in vivo de expresión/función de EAAT

- 5 La activación *in vivo* de la expresión/función de proteínas se puede evaluar como se indica en el siguiente ejemplo usando ceftriaxona como el compuesto de ensayo.

La Ceftriaxona Aumenta el nivel de GLT1 en Cerebro (Figura 4)

- 10 Para determinar si un fármaco identificado en las Fases 1 y 2 podría realmente inducir la expresión de EAAT *in vivo*, se administró ceftriaxona a ratas (n=5) (y ratones, n=3) diariamente. La ceftriaxona se administró a una dosis que se conoce que conduce a niveles en SNC de 200 mg/kg ip. Después de 5 días de administración diaria crónica, los animales se sacrificaron y se recogió el tejido cerebral. Como se muestra en la Figura 4A, 4B, la terapia con ceftriaxona
 15 condujo a un aumento de 3 veces en los niveles de GLT1 en cerebro, así como su producto de corte y empalme normal, GLT1b. Este aumento es comparable a los resultados de activación de promotor observados *in vitro* (Figura 3). Las transferencias de Western para el transportador de glutamato astrogial GLAST así como los dos transportadores de glutamato neuronales, EAAC1 y EAAT4, no mostraron alteración en la expresión del transportador después de la terapia con ceftriaxona (Figura 4C, 4D). De forma similar, la proteína constitutiva actina no estaba modificada por la
 20 administración de ceftriaxona (Figura 4A, 4C).

Ejemplo 4

Neuroprotección de compuestos

- 25 Para evaluar la potencial neuroprotección conseguida por expresión aumentada de EAAT2 por fármacos de activación de promotor, se realizaron varios experimentos *in vitro* e *in vivo* en los que la toxicidad de glutamato contribuye a muerte neuronal. La neuroprotección se puede evaluar como se indica en el siguiente ejemplo usando antibióticos β -lactámicos como el compuesto de ensayo.

- Modelo de Isquemia In Vitro - Privación de oxígeno-glucosa* (Figura 6A). El modelo *in vitro* de privación de oxígeno-glucosa (OGD) es un modelo bien conocido y bien aceptado de lesión neural aguda. En este modelo *in vitro* de isquemia, una hora de privación de oxígeno-glucosa (OGD) es mortal para neuronas cultivadas, conociéndose que
 35 la toxicidad implica el exceso de glutamato. Sin embargo, cuando estos cultivos se pre-acondicionan 24 horas antes del estado mortal con OGD transitoria (5 minutos), existe una resistencia espectacular y robusta de neuronas a muerte celular. Los datos indican que esta neuroprotección puede deberse en parte a la expresión aumentada de GLT1.

- Método.* Se preparan cultivos de células neuronales-gliales mixtos corticales primarios de ratones CD1 de 14-16 días de gestación. La preparación de estos cultivos a partir de corteza fetal de ratón está bien descrita. Los experimentos se realizan en los días 13-15 *in vitro*. En el estado experimental, los cultivos se someten a privación de oxígeno-glucosa (OGD), un modelo *in vitro* de isquemia. Las células corticales se someten a tratamiento de control (medio, solución salina equilibrada de Earle modificada que incluye glucosa y burbujeada con CO₂ al 5% O₂ al 95%, se cambia a lo largo de los grupos de tratamiento, pero no se realiza OGD) o 5 minutos (subletal) de OGD (mediante el uso de solución
 45 salina equilibrada de Earle modificada que está desprovista de glucosa y burbujeada con H₂ al 10%, N₂ al 85% y el 5% hasta desoxigenación). Se consiguen condiciones anaerobias usando una cámara anaeróbica a 37°C. La OGD se termina por intercambio de medio de nuevo a medio de cultivo oxigenado. Veinticuatro horas después de lo anterior, las células corticales se someten bien a ningún tratamiento o bien a una hora de OGD. La supervivencia neuronal se determina por recuento celular asistido por ordenador después de tinción con los colorantes vitales fluorescentes yoduro de propidio (como un indicador de muerte neuronal) y Hoechst 33321 (como un indicador del número total de neuronas) y se presenta como porcentaje de muerte celular. Los núcleos gliales presentan fluorescencia a una menor intensidad y se eliminan. Se añaden fármacos (Ceftriaxona 1 μ M) 24 horas antes del primer estado experimental y, por tanto, han estado en el medio de cultivo 48 horas antes del comienzo de 1 hora de OGD. Después de 1 hora de OGD, las células se devuelven al medio de cultivo sin fármacos.

- 55 *Neuroprotección con Ceftriaxona.* La muerte neuronal basal en los cultivos es del 14%, como se muestra en la columna sin tratamiento (NT) de la Figura 6A. Los datos se presentan como muerte neuronal promedio en pocillos separados de un experimento. Ceftriaxona 1 μ M, cuando se añade durante 48 horas en estos cultivos, no aumenta la muerte celular basal (NT + Ceftriaxona). Cuando los cultivos se someten a 1 hora de OGD, la muerte celular neuronal, como se espera, aumenta espectacularmente hasta aproximadamente el 50%. Cuando los cultivos se pre-acondicionan con 5 minutos de OGD 24 horas antes de 1 hora de OGD, el porcentaje de muerte celular es comparable al estado sin tratamiento, indicando tolerancia isquémica de neuronas en este estado. Éste es el fenómeno bien conocido de tolerancias isquémicas. Lo que es importante, Ceftriaxona 1 μ M, cuando se añade 48 horas antes de 1 hora de OGD, también protege las neuronas contra muerte celular, reduciendo el porcentaje de muerte de células neuronales del 50%
 60 al 20% (de forma similar a la neuroprotección de tolerancia isquémica). Por tanto, parece que el pre-tratamiento con ceftriaxona evita la muerte neuronal en tolerancia isquémica.

Modelo in vitro de neurodegeneración motora crónica (Figura 6B). Se usó un modelo de neurodegeneración crónica, basado en el bloqueo del transporte de glutamato en cultivos organotípicos de médula espinal, con el inhibidor no específico treo-hidroxiaspartato (THA) o TBOA. La incubación crónica de cultivos con THA (o TBOA) conduce a un aumento crónico en el glutamato extracelular y la muerte lenta posterior de neuronas motoras (a lo largo de 4 semanas). El modelo de cultivo de médula espinal organotípica se desarrolló para estudiar aspectos de toxicidad mediada por glutamato (y terapia). Ha sido útil en identificación de fármacos pre-clínica (incluyendo riluzol, el único fármaco aprobado por la FDA para ALS, y más recientemente, celecoxib). La expresión aumentada del transportador de glutamato GLT1 por sobre-expresión genética (por ejemplo, sobre-expresión por transfección o transgénica), en este sistema, puede evitar la muerte de neuronas motoras (no mostrado) y muerte neuronal en animales transgénicos. Guo H., *et al.* Hum Mol Genet. 2003; 12: 2519-2532.

Para determinar si el fármaco indujo la activación del promotor de GLT1 y si la sobre-expresión posterior de la proteína GLT1 puede ser neuroprotectora, se usó el paradigma de médula espinal organotípica. Los cultivos de médula espinal organotípica se prepararon a partir de médulas espinales lumbares de crías de rata de 8 días de edad, como se ha descrito previamente. Rothstein JD, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 6591-6595. Se añadió ceftriaxona con cambios de medio. No se añadieron fármacos durante los primeros 7 días después de la preparación del cultivo. Después se añadió THA a cultivos experimentales a una concentración de 100 μ M, que produce muerte de neuronas motoras en el intervalo de 3 a 4 semanas. Se añadieron diversas concentraciones de ceftriaxona como se indica, para conseguir concentraciones finales de 0 a 100 μ M. Los experimentos siempre se realizaron con cultivos de médula espinal de control (es decir, sin fármacos añadidos), THA solo, ceftriaxona sola y ceftriaxona + THA. Los experimentos a cada concentración de ceftriaxona se repitieron 3-5 veces. El medio, con THA y ceftriaxona a las concentraciones indicadas, se cambió dos veces por semana. Después de 4 semanas, los cultivos se fijaron y se inmunotñieron para neurofilamento (SMI-32, Sternberger) para cuantificar neuronas motoras de asta ventral grande (un método bien establecido para seguir la supervivencia de neurona motora en estos sistemas).

Neuroprotección por ceftriaxona. Como se muestra en la Figura 6B, el tratamiento con ceftriaxona evitó la pérdida de neuronas motoras de un modo dependiente de dosis. Como se muestra en las Fases 1 y 2 de Datos Preliminares, está concentración de ceftriaxona aumenta la proteína y función de GLT1 al menos 3 veces. Lo que es importante, las concentraciones usadas en estos estudios están dentro del intervalo que se puede conseguir con administración oral/parenteral de ceftriaxona (1-4 gramos/día). En particular, la neuroprotección no se pudo observar en cultivos preparados a partir de ratones anulados en GLT-1 (no mostrado).

Efecto de Neuroprotección In Vivo de ceftriaxona sobre la aparición y progresión de enfermedad de neurona motora en el Ratón SOD1 G93A. (Figura 6C, 6D)

Para determinar si la ceftriaxona podía alterar la neurodegeneración en un modelo de enfermedad que implica la expresión alterada de transportadores de glutamato, se trataron ratones SOD1 G93A con ceftriaxona. Numerosos estudios han documentado un papel que contribuye al exceso de glutamato en este modelo de ratón y un papel para modular los receptores o transportadores de glutamato en estrategias neuroprotectoras. Guo H., *et al.* Hum Mol Genet. 2003; 12: 2519-2532. La sobre-expresión modesta por una estrategia transgénica puede alterar la aparición de la enfermedad y/o la supervivencia. Además, los estudios recientes sugieren que la administración tardía de fármacos, por ejemplo, en el momento de la aparición de la enfermedad, puede ser más pertinente terapéuticamente.

Paradigma de tratamiento. Se trataron ratones SOD1 G93A [(B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)lGur/J, de alta expresión] con ceftriaxona (200 mg/kg ip) comenzando aproximadamente a las 12 semanas de edad. Los animales tratados con fármaco (n=20) y los controles a los que se inyectó solución salina (n=20) se controlaron diariamente para supervivencia y semanalmente para fuerza de agarre (Columbus Instruments) y para peso corporal, como se ha descrito anteriormente.

La Ceftriaxona Retrasa la Pérdida de Fuerza de Agarre y Aumenta la Supervivencia

Como se muestra en la Figura 7C, el tratamiento con ceftriaxona retrasó significativamente la pérdida de fuerza muscular. Este efecto se observó en el intervalo de 7 días después del tratamiento y persistió durante 4 semanas. A las 18 semanas de edad se había perdido la conservación de la fuerza. De un modo similar, el fármaco también aumentó la supervivencia global de los ratones aproximadamente 7-10 días (Figura 6D). Aunque este efecto es relativamente pequeño, el fármaco se administró en el momento de la aparición de la enfermedad y, por tanto; incluso un efecto pequeño puede tener importancia clínica. La neuroprotección observada en este estudio probablemente no se debe a las propiedades antibióticas normales del fármaco, ya que los ratones no tienen infecciones conocidas a las 12-16 semanas de edad, cuando se observaron efectos de fuerza muscular destacados.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente promotor de la expresión de EAAT2 que es un antibiótico, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un trastorno neurológico asociado con transmisión alterada de glutamato.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad o el trastorno neurológico asociado con transmisión alterada de glutamato está asociado con aprendizaje, memoria o cognición.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad o el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades neurológicas agudas, epilepsia, lesión de médula espinal, traumatismo cerebral, glaucoma y trastornos psiquiátricos.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad o el trastorno neurológico es esclerosis lateral amiotrófica.

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico es un compuesto identificado por un ensayo de exploración que comprende los pasos de:

a) poner en contacto un antibiótico de ensayo con una molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ADNc y que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 60% con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, 2, 3 ó 4, donde la molécula de ácido nucleico es capaz de dirigir la expresión de ARNm de un vector indicador sin promotor o un complemento del mismo o una célula que comprende dicha molécula de ácido nucleico; y

b) determinar si está modulada la expresión de ARNm o el polipéptido codificado por el ADNc, identificando de este modo un antibiótico que es un agente promotor de la expresión de EAAT2.

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico es un compuesto identificado por un ensayo de exploración que comprende los pasos de:

a) poner en contacto una célula que expresa EAAT2 con un antibiótico de ensayo; y

b) determinar si la expresión del EAAT2 en la célula está modulada en presencia del antibiótico de ensayo en comparación con la ausencia del antibiótico de ensayo, identificando de este modo un antibiótico que modula la expresión del EAAT2.

7. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el antibiótico comprende al menos un elemento estructural seleccionado entre heterociclos que comprenden al menos un átomo de azufre de anillo, aminas terciarias, sales de amonio cuaternario, esteroides, polioles, policétidos, guanidina, urea o arsenato.

8. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el antibiótico aumenta la producción de EAAT2 el 200% o más con respecto a la producción de EAAT2 no regulada.

9. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el antibiótico aumenta la producción de EAAT2 el 300% o más con respecto a la producción de EAAT2 no regulada.

10. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el antibiótico aumenta la producción de EAAT2 el 400% o más con respecto a la producción de EAAT2 no regulada.

11. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el antibiótico aumenta la producción de EAAT2 el 600% o más con respecto a la producción de EAAT2 no regulada.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración extracelular de glutamato está reducida al menos aproximadamente el 50% con respecto a concentraciones no reguladas.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración extracelular de glutamato está reducida al menos aproximadamente el 75% con respecto a la concentración no regulada.

14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antibiótico es un antibiótico β -lactámico.

15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antibiótico es un antibiótico β -lactámico de la clase de penicilina, clase de cefalosporina, clase de carbapenam o clase de monobactámico.

ES 2 328 811 T3

16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antibiótico es un antibiótico β -lactámico seleccionado entre el grupo que consiste en bencilpenicilina, bencilpenicilina procaína, penicilina V, penicilina V potásica, penicilina benzatina, hetacilina, cloxacilina, carbenicilina, flucloxacilina, ampicilina, ampicilina sódica, amoxicilina, co-amoxiclav, carboxipenicilina, ticarcilina, timentina, tazocina, piperacilina, pivmecillinam, amoxicilina-clavulanato, oxacilina, HCl de bacampicilina, nafcilina sódica, cefaclor, cefadroxilo, cefadilo, cefalexina, cefamandol, cefazolina, cefditoreno, cefepima, cefetamet, cefdinir, cefixima, cefizox, cefotaxima, cefmetazol, cefobid, cefonicid, cefoperazona, cefoperazona sódica, cefotan, cefotetan, cefoxitina, ceftiofina, cefpiroma, cefpodoxima, cefpodoxima proxetilo, cefprozilo, cefradina, ceftazidima, ceftibuteno, ceftidoren, ceftina, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftriaxona sódica, cefuroxima, cefuroxima axetilo, cefalexina, ceftazidima, cefzilo, cefalotina, cefalotina sódica, cefapirina sódica, Aztreonam, Imipenem, Meropenem, Ertapenem y FK-037.

17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el antibiótico β -lactámico se selecciona entre grupo que consiste en penicilina V, penicilina V potásica, amoxicilina, ceftriaxona, ceftriaxona sódica, cefapirina sódica, cefoperazona, cefoperazona sódica, cefadroxilo, HCl de bacampicilina, ampicilina, ampicilina sódica, cefalotina, cefalotina sódica y nafcilina sódica.

18. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antibiótico se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro de decualinio, clorhidrato de vancomicina, actinospectacina, oxitetraciclina, sulfato de sisomicina, etilsuccinato de eritromicina, sulfato de dihidrostreptomycin, amprolio, HCl de alexidina, clindamicina, enoxotona, rifampina, cloroxina, metenamina y piritona de cinc.

19. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el antibiótico es ceftriaxona o ceftriaxona sódica.

20. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antibiótico es tianfenicol.

21. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antibiótico es cloranfenicol.

22. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la enfermedad o el trastorno neurológico es esclerosis lateral amiotrófica.

23. Un método *in vitro* para aumentar la expresión de proteína EAAT2 que comprende el paso de poner en contacto una célula con al menos un agente promotor de la expresión de EAAT2 que es un antibiótico.

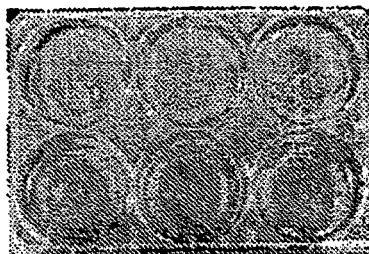


FIG. 1A

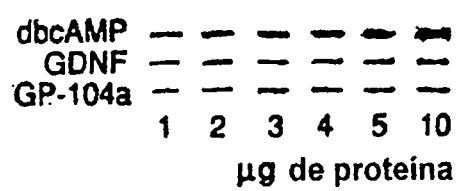


FIG. 1B

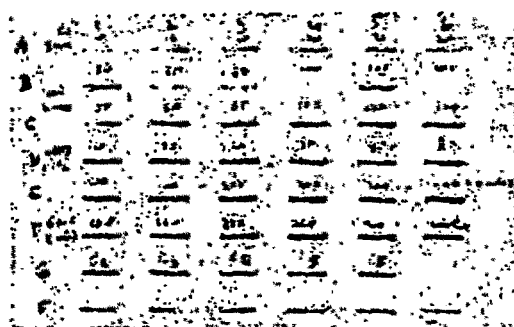


FIG. 1C

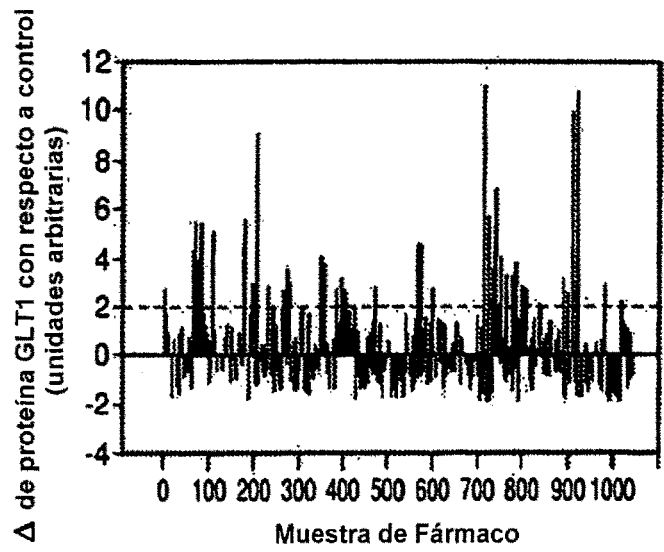


FIG. 1D

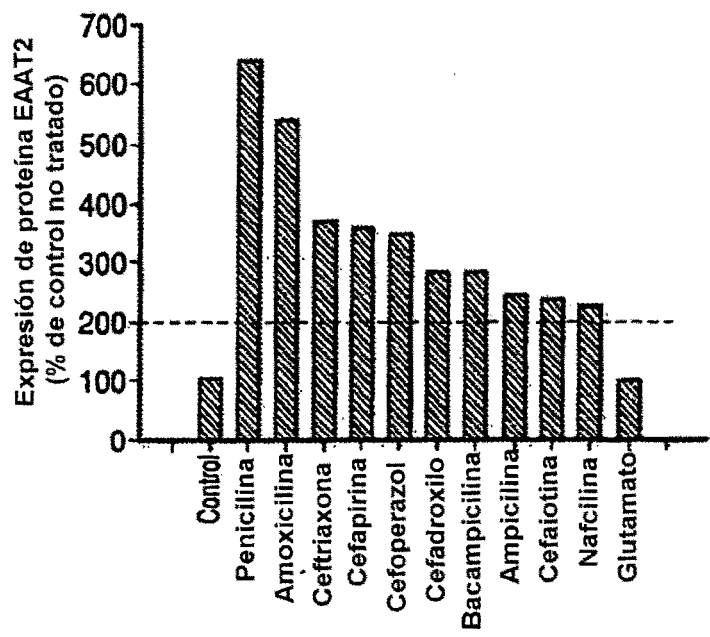


FIG. 1E

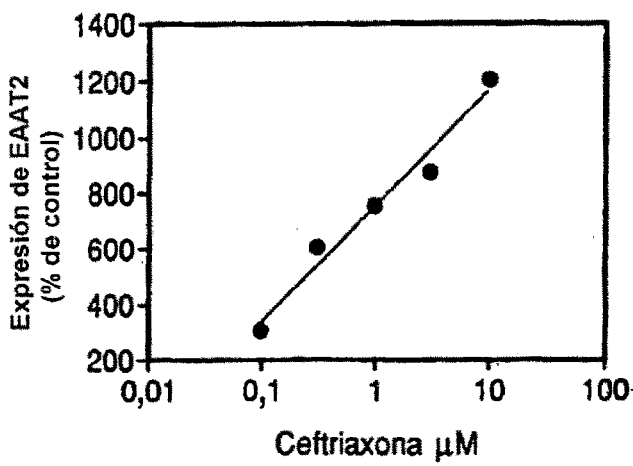


FIG. 1F

EAAT2

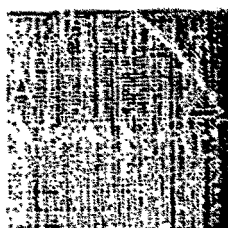


FIG. 2A

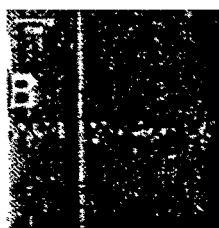


FIG. 2B

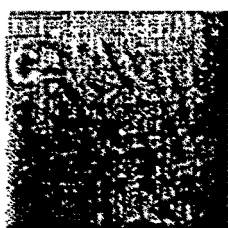


FIG. 2C

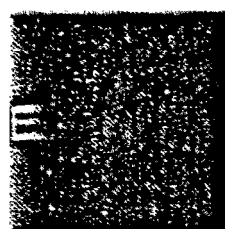
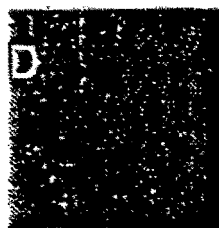


FIG. 2E

EAAT1



FIG. 2F



FIG. 2G

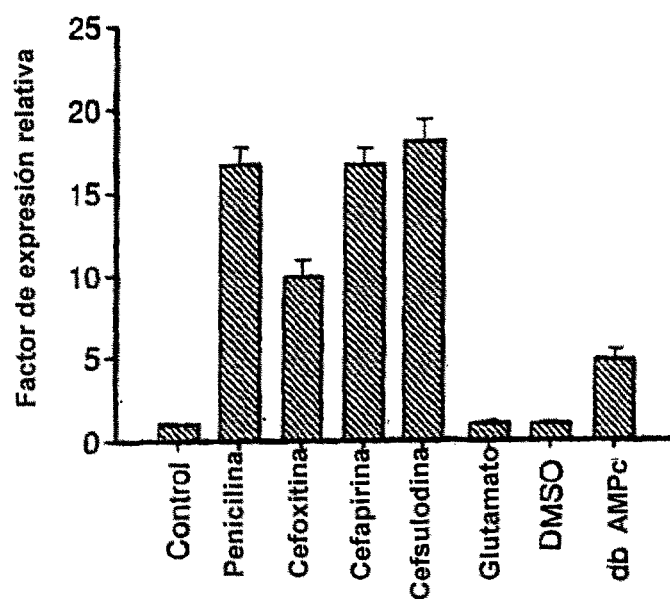


FIG. 3A

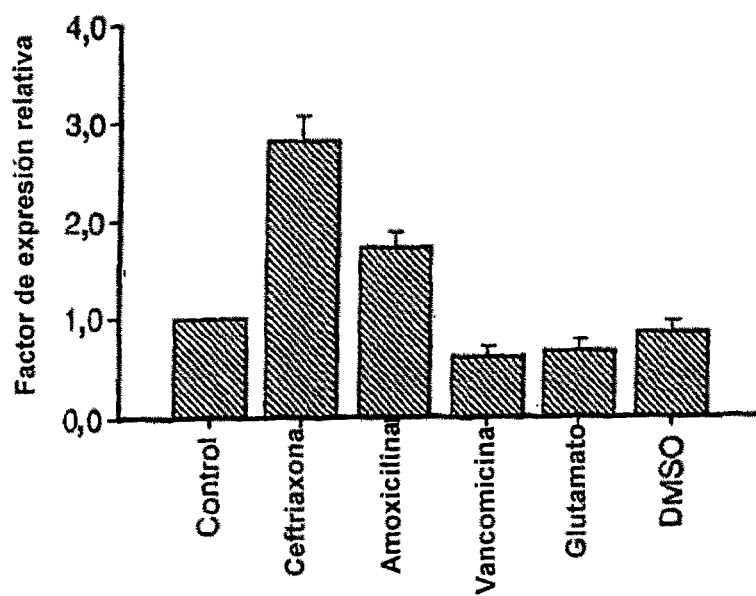


FIG. 3B

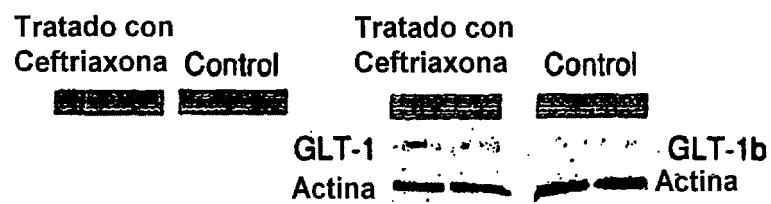


FIG. 4A

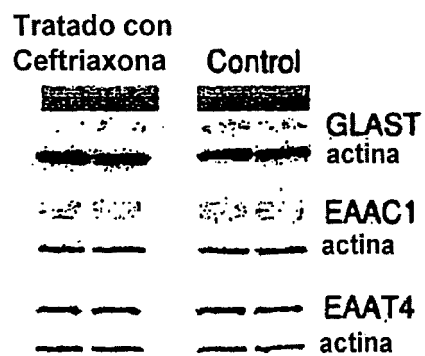


FIG. 4C

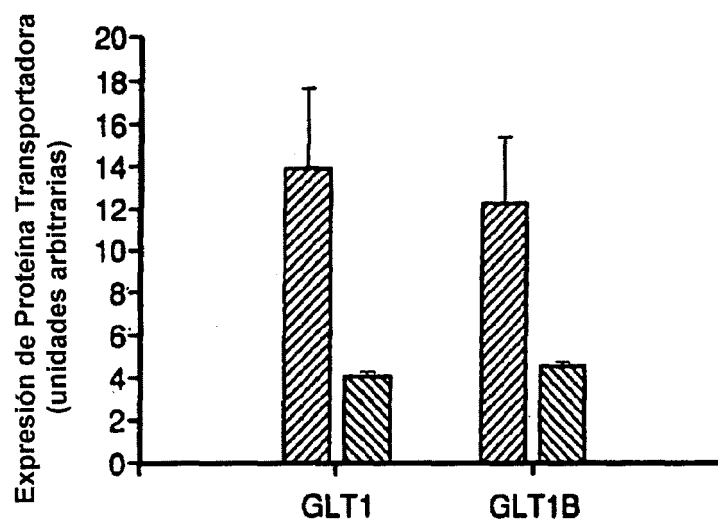


FIG. 4B

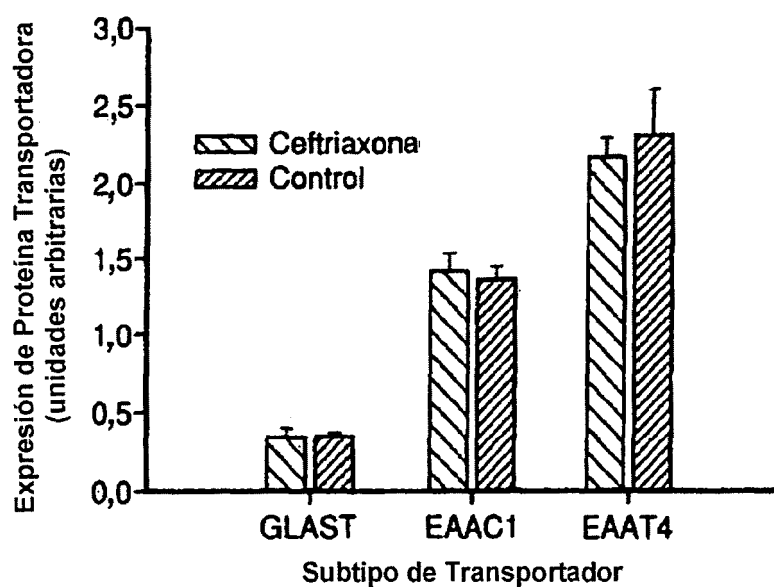


FIG. 4D

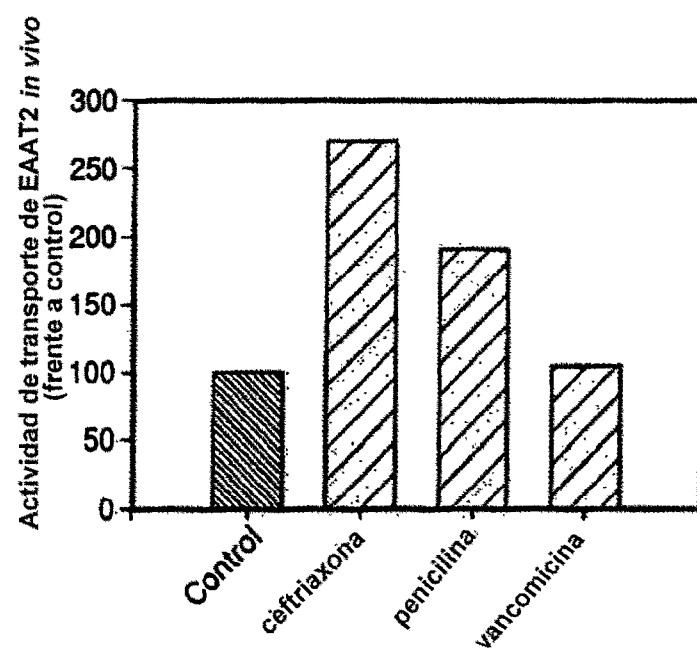
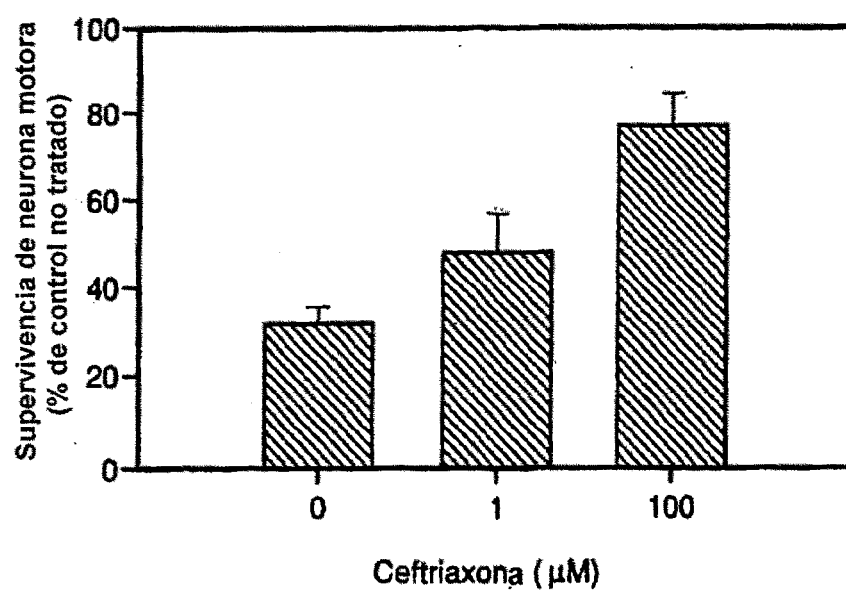
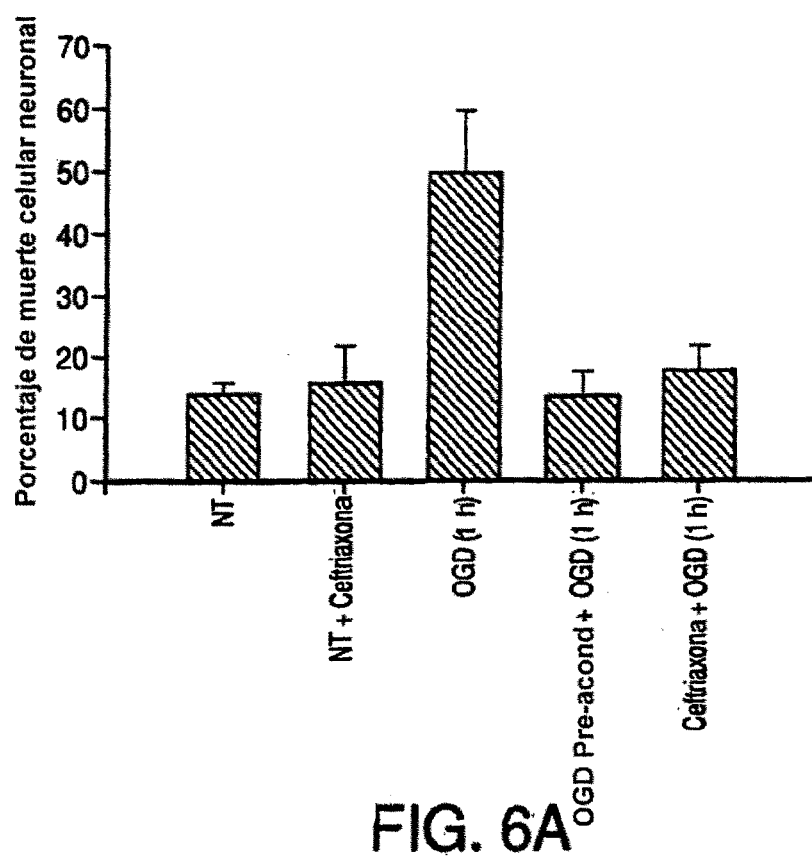


FIG. 5



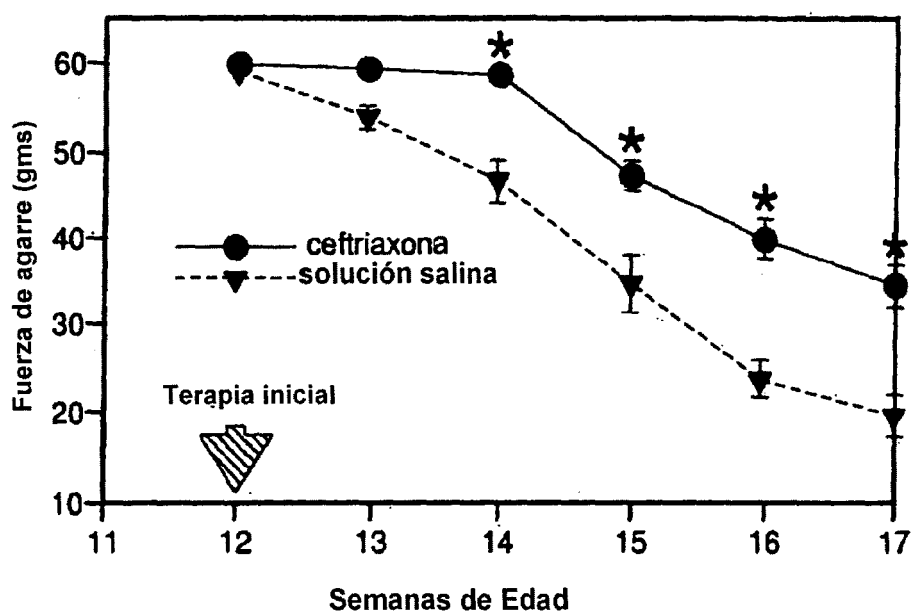


FIG. 6C

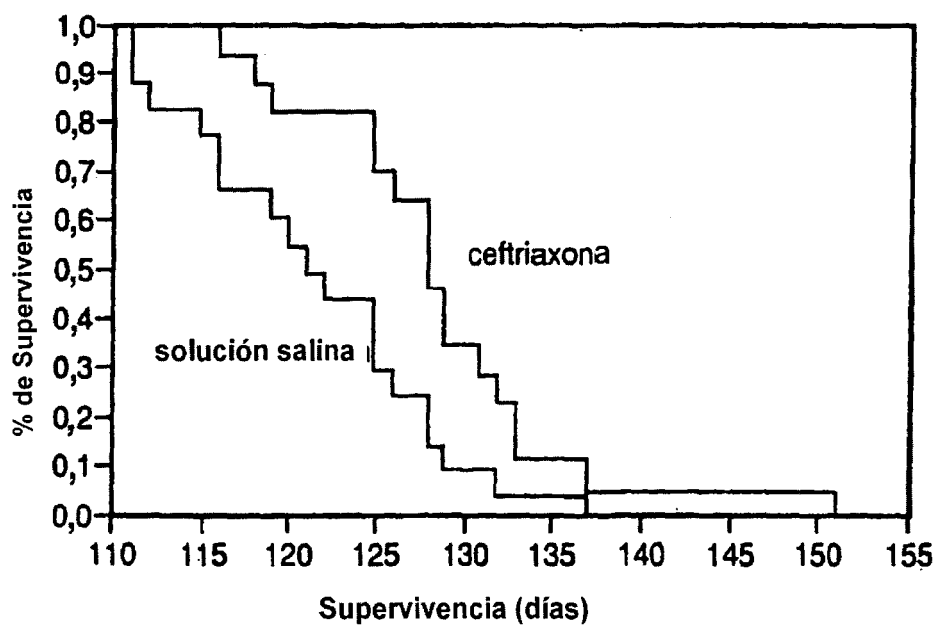


FIG. 6D

ES 2 328 811 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<210> 1 SEC ID Nº: 1

<211> 4696

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

aaaaccacca ggggtgttgc tggaaagttt ttattcctgg attaaaggca aggatcagcc 60
tgtatttttag caatttcttt ttaagggttaa tgtcccatgc gccacctact tctggggccc 120
tggtccagcc cttctttatg tgttgaccac ttctagggtcc agcacttccc aactctgctg 180
cgcagtggtgac tcaatccctt ggggaagtcct ttaaaaatgc ccaagtcagc cccgcctac 240
cccaaagat gcatggacca gaaatctctg aaaggtggcc tgagtattac tattttctaa 300
aaggtctctc cagaccattt taatgggcac ccagtgttga aaataactgc tccagtttgt 360
taaaaaataa ttggtgtgaa tattggcaaa agcctctctg cacaaagaaa gagaaccagt 420
ttcttctagc taatgtttgt tagccagaat tatctgtggc atagtccatg tgacttaata 480
gacctgggtct tccagggcag ctgaatgcaa atgtttctca cgtgtagaac gggatgtcag 540
ggcttacaga gaaagtggga aactggaatg atgactccat ctaattcggc catgctggat 600
gattcacctg gattctctca tgtcctgagc attgaaaaca taatgaagag tttttaaatt 660
gaatgtttta aagagtgaag acaactccat cccttttctt gtttctttt accttgtatt 720
tatgtaccac caggtacctt gctcttggca gtgagcgtga atgaatggca cagctcagcc 780
cctgaagcct gtgtgcagag attgagggat tgtgatggag tagttcatte atgctcatgt 840
taaggggggt gctaatagca gactagtgtc cctgcgatta ttaatatcta ggtctgggac 900
acttgtaaag ttagacaatt agactgtaaa gtttgtatat gtgacaactt cagatacaaa 1020
gacacacact tacccttgac ggggcttaag aggagagtgt caaacataat accaaagtga 1080
aagaagatag ctcttcatct acaaattatt tttaaacaca tttaccaggt taaacaataa 1140
ctaatttttc ggaagagaag agtaccacaáa gtcaaagtcc ctaagacgaa gagatgctta 1200
tggcattttt ttttaataaa agaaaatgca aagttagagt ggttctgaag gaacctagga 1260
tgaataaggt acagacatga ttattctaatt ggtgcagaca ggattgagag agaagggggg 1320
aggggagaga tggagaaagg catggatgga agatgacgtt tggattcaga ttttggaaag 1380
gagagtaaag gaaggaggta agcagagatt tattttttaa attttattaa tgtgttttcc 1440
cctcttttcc ttgttatttt tctcatctgt ctgttcatac ttggatattt tgtccaataa 1500
actatcttct aaggactctg aaaatgcact gaatattttt ggagggttta ctggggtgcc 1560
agacgccact ttaggagttt tacatatcct ctccatttca tttagttctc ttagcacaga 1620
gaagtgggag aagatagtcc cattttacag gtgggatgaa gagagagatg gaggaatttg 1680
ccccagggtta ctcagctaga aggtggtgaa gaactcaagc cttcggatat cagcgcctgg 1740
catttaacta ccaatcggtc ctgctgggac tccggctcct ctggcaccat ccccgggacc 1800
tactcagaga gtttgacgtg gcccggtcgc gtccatcgt ctaacaaggt ccagcacagc 1860
gcaaatccga agatcgtcta ccccggggaa aaagagagtc tgtttaattc tcctgtggcc 1920
ctccaagtga gttcttttgg gttccattgc ctgacgagg aaagtgaggc tttgcctgct 1980
ctgcgtcac agggtcggca agtagtggga ccctaggttc ctgcagtatt ccagagataa 2040

```

ES 2 328 811 T3

tcaaagctgc acaggtctcg tcatttttat gcaaaggcgt ccggaaggct cgaactctcc 2100
 cttgcacaag cccatctgtc tctgtgcgcc gcccccgga cacggaagca ggcggcgagc 2160
 agcgccgagt ggggtggagaa ccgtectccg ccaactaccc ctccggccaac tctccgcgcc 2220
 ttctcagccg gcacccacga ggccgaccte tctcgcccta aaaaaaaaaa aaaaaaatcc 2280
 cggcctcccc tgcaccccg cgcgcgcccc caggagctg cattaatatt aatctcgctg 2340
 aataattgaa ggccagagat ttattcgagc ttccggcggg gagggagcgc agctggggcg 2400
 cgtttaggct gcaccaccg cgtgtttcag ccgtcgcact ccgtggacc tgggaccccc 2460
 agacgtggga ggtatggggtg ggtgtgcctg cctgtgagtt tgggggtgag tgtgagctga 2520
 agcgggtgct ccggggagtg agggaggagc gccaggggct gctccaggga ggcggagacg 2580
 gaggggcatc ccgggtctcc gcgcggtcgc ctgcgctca ccccgacgg ggtgacctgg 2640
 ggccacgcgg gcttcagggg aaacaatagc tactccttag atcctgggt cctgccaccg 2700
 gctgcccag ccttcccga cgagcggcg ggctctttt cttatttggc taatttatgg 2760
 cgagaggctg ggggaaggga tggcagagga gggaccgga ctgaaatgg gggcgggggg 2820
 cggcggttaa aggagttgcc cgagcggcg gcgcgggtga tgtcagctct cgacgaaaat 2880
 agagagggat cgcttcaaa tccccagctc ccggcgggct aaaccttgca atccctccct 2940
 agcgggcgcc ccagcagagc gcagcggcct ccacgcctc cccaggcgcg cacacaccg 3000
 cacaogcgca cgcacgctca ccgtcctctg ccaccactct ctgctccgc cactcgccgc 3060
 gcccgcgagc cccgcagcaa agcacagggt gcagcggctg caggggcgca tcgcggcgct 3120
 gcgccctcct gcagccctgg gcgcctcgt ctctcgggga agccaccctc ggagcccccg 3180
 gagctccccg ccaagcgcca tccccgcggg cggaggggag cgcgggtcgc gcgccgtgga 3240
 gagccgggac gcggattagc gcccgagga gcctcctgog cccgttgagg cgttaaaggg 3300
 cttaccccg aggcgggtgg aaggcggggc agaggctcct cttaaatacc gctcccgcc 3360
 gcacttcgcy ctcaccccg cgtccgcttt ctccctcgcc cacagctgcc gctagtgct 3420
 gaagaggagg gtcgcttccc cagaccatgg catctacgga agggtaggg gatttttatc 3480
 tgtacccgcg ggaagcggg gtcaogcgcg gggtagggc gccctatcc gggatgcgga 3540
 tagagaggcg gcggcgcgcg gcctcggagg tggtagggga gccgtagctt ggtcggggat 3600
 gggatgggtg ggggggatt gattttcttt cctggagatt gctgctaat cctttgaaa 3660
 tgcagagggt ggagggttgt tttattttga taaaagggt aaggtagcgt gggggcctga 3720
 gagtgtgagg aagaaatcct cttgaggtta cttttgggat ttcaaaaca taggggattg 3780
 ggcatagtgt gagcagacac cggggtagca gcgcctggag cgcggcgccc caggcccgag 3840
 gcgggcttgc aggtggtgcc ggctcggaag gaatgagcca agacagggcc ctggggcggg 3900
 gcaaggacca gcgcgcggcg ccttgaacgc cagggttgca gactcgccat ggagatgctg 3960
 ggcccgctcc gatcggtcct tgtccctgga aggcggaatc tccctggcta gctctaagg 4020
 aggttggaag agatttggtt gcttcccggg aggcgggaaa acgtgtggtt tgggacaagg 4080
 gcaggagtcg ccagactcca gcgggcagg atagcattgg ctccctatt cagcccgagg 4140
 atctggagtc gtgtcctgcc tcccagatt ccagctggca tggggaaagc tccctcgccg 4200
 tgataactaa agacaattgt ctttagcaag agacagaagg ggctgcagg ggcaaaagg 4260
 ttctttgaat actcacacat caaaggaaag gtccacagag tccctggacc agtatctccc 4320
 agaaaacttt ttgggcttcg tagaacctga gtggcaatga azagactggg cagctcagcc 4380
 ctttgggttaa tccccaaaat tgcagttact caettgcaag cgatcacaat atccatgta 4440
 tgtgaaaagc aaatatcagg ggcttctctg ggctcaagtg gtggtgttg cattttccag 4500
 tttctcctaa gaaattttac caactccgca ggcttgtttt aggggaattg atctctaaac 4560
 aggttgaaag gctggtatcc aaagccagat ctctagactg caatctccaa tagaaggaaa 4620
 atatttctag aactgtctct ctgtccagga gaaggaattc cagcacactg gggcggtta 4680
 ctagtggatc cgagct 4696

50 <210> 2 SEC ID N°: 2

<211> 2718

<212> ADN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

60 ggtaccttgc tcttggcagt gagcgtgaat gaatggcaca gctcagcccc tgaagcctgt 60
 gtgcagagat tgagggattg tgatggagta gttcattcat gctcatgta aggggggtgc 120
 taatagcaga ctagtgtccc tgcgattatt aatatctagg tctgggacag attgtgatgg 180
 cttcttttcc agttgccacc tcagcagaaa gggaaataga aaaccctaac ttgtaaagtt 240
 65 agacaattag actgtaaagt ttgtatatgt gacaacttca gatacaaaga cacacactta 300

ES 2 328 811 T3

5 ccccttgacgg ggcttaagag gagagtgtca aacataatac caaagtgaaa gaagatagct 360
 ctatcatctac aaattatattt taaacacatt taccagggtta aacaataact aattttttcgg 420
 aagagaagag tacccaaagt caaatgccct aagacgaaga gatgcttatg gcattttttt 480
 ttaaataaag aaaatgcaaa gtttagagtgg ttctgaagga acctaggatg aataagggtac 540
 agacatgatt attctaattg tgcagacagg attgagagag aagggggggag gggagagatg 600
 gagaaaggca tggatggaag atgacgtttg gattcagatt ttggaaagga gagtaaagga 660
 agggaggtaag cagagattta ttttttaaat ttatttaattg tgttttcccc tctttttctt 720
 10 gttattttttc tcatctgtct gttcatactt ggatattttg tccaataaac tatctttctaa 780
 ggactctgaa aatgcactga atattttttg aggggtttact ggggtgccag acgccacttt 840
 aggagtttta catatcctct ccattttcatt tagttctctt agcacagaga agtggggagaa 900
 gatagtccta ttttacaggg gggatgaaga gagagatgga ggaatttgcc ccagggttact 960
 cagctagaag gtggtgaaga actcaagcct tccgatatac gcgcctggca ttttaactacc 1020
 15 aatcggctct gctgggactc cggctcctct ggcaccatcc ccgggacctc ctgagagagt 1080
 ttgcacgtgg ccggtcggct tccatcgtct aacaagggtcc agcacagcgc aaatccgaag 1140
 atcgtctacc ccggggaaaa agagagctctg tttaattctc ctgtggccct ccaagttagt 1200
 tcttttgggt tccattgcct agacgaggaa agtgaggctt tgcctgctct gcgctcacag 1260
 ggtcggcaag tagtgggacc ctagggtcct gcagtattcc agagataatc aaagctgcac 1320
 20 aggtctcgtc atttttatgc aaaggcgtcc ggaaggctcg aactctccct tgcacaagcc 1380
 catctgtctc tgtgcgcgc ccccgggaca cggaaagcag cggcgagcag cggcgagctg 1440
 gtggagaacc gtcccccgcc actcaccct cggccaactc tccgcgcctt ctgagcggc 1500
 acccacgagg ccgacctctc tccgcctaaa aaaaaaaaaa aaaaatcccg gcctcccctg 1560
 25 caccgccccc gccgccccca gggagctgca ttaatatata tctcgtgaa taattgaagg 1620
 ccagagattt attcagactt cggcggggga gggagcgcag ctgggcccgc tttaggctgc 1680
 accacccgcg tgtttcagcc gctcgactcc gctggacctg ggacccccag acgtgggagg 1740
 atgggggtgg tgtgcctgcc tgtgagtgtg ggggtgagtg tgagctgaag cgggtgctcc 1800
 ggggagtgag gagggagcgc caggggctgc tccagggagg cggagacgga ggggcatccc 1860
 30 ggggtctcgc gcggtcgcct gcgcttcacc ccgcacgggg tgacctgggg ccacgcgggc 1920
 ttacaggggaa acaatagcta ctcttagat cctgggtccc tgcaccggc tgcccaagcc 1980
 tccccggagc agcggcgggg cctcttttct tatttggtta atttatggcg agaggctggg 2040
 ggaaggagtg gcagaggagg gaccgcgact gaaaatgggg gcggggggcg gcggttaaag 2100
 gagttgcccg agcggcgggc gcgggtgatg tcagctctcg acgaaaatag agagggatcg 2160
 35 cctgcaaata cccagctcgc gcggggctaa accttgcaat ccctccctgg ccggcgccga 2220
 gccagagcgc agcggcctcc accgcctccc caggcgcgca cacaccgca cagcgacag 2280
 cagctcacc gtcctctgcc accactctct gctccgcga ctgcgcgcgc ccgcgagccc 2340
 cgcagcaaag cacagggtgc agcggctgca ggggcgcac gccggcgtgc gccctctctc 2400
 agccctgggc gcacgcctct ctccgggaag ccacccctcg agccccggga gctccccgc 2460
 40 aagcggcatc ccgcggggcg gagggtgcgc gccgtggaga gccgggacgc gccgggagc 2520
 ggattagcgc ccgcaggagc ctccctgcgc cgttgaggcg cttaaagggt taccgggag 2580
 gcgggtggaa gggcgggcag aggtcctct taaataccgc tccgggccgc acttcgcgct 2640
 caccggggcg tccgctttct ccctcgccca cagctgcgg atagtgtga agaggagggg 2700
 45 gcgttcccc gacctgg 2718

<210> 3 SEC ID N°: 3

<211> 2454

<212> ADN

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

55 ggtaccttgc tcttggcagt gagcgtgaat gaatggcaca gctcagcccc tgaagcctgt 60
 gtgcagagat tgagggattg tgatggagta gttcattcat gctcatgtta aggggggtgc 120
 60 taatagcaga ctagtgtccc tgcgattatt aatatctagg tctgggacag atttgtatgg 180
 cttcttttcc agttgccacc tcagcagaaa gggaaataga aaaccctaac ttgtaaagt 240
 agacaattag actgtaaaagt ttgtatatgt gacaacttca gatacaaga cacacactta 300
 cccttgacgg ggcttaagag gagagtgtca aacataatac caaagtgaaa gaagatagct 360
 ctatcatctac aaattatattt taaacacatt taccagggtta aacaataact aattttttcgg 420
 aagagaagag tacccaaagt caaatgccct aagacgaaga gatgcttatg gcattttttt 480
 65 ttaaataaag aaaatgcaaa gtttagagtgg ttctgaagga acctaggatg aataagggtac 540

ES 2 328 811 T3

5 agacatgatt attctaattgg tgcagacagg attgagagag aaggggggag gggagagatg 600
 gagaaggca tggatggaag atgacgtttg gattcagatt ttggaaagga gagttaaagga 660
 agggaggtaag cagagattta ttttttaaatt tttattaatg tgttttcccc tctttttctt 720
 gttatttttc tcatctgtct gttcatactt ggatattttg tccaataaac tatctttctaa 780
 ggactctgaa aatgcactga atattttttgg aggggtttact ggggtgccag acgccacttt 840
 agggagtttta catatcctct ccatttcatt tagttctctt agcacagaga agtgggagaa 900
 gatagtcca ttttacagggt gggatgaaga gagagatgga ggaatttgcc ccagggttact 960
 10 cagctagaag gtggtgaaga actcaagcct tcggatatca gcgcctggca tttacttacc 1020
 aatcggtcct gctgggactc cggctcctct ggcaccatcc ccgggaccta ctacagagagt 1080
 ttgcacgtgg ccggtcgcgt tccatcgtct aacaagggtcc agcacagcgc aaatccgaag 1140
 atcgtctacc ccggggaaaa agagagtctg ttttaattctc ctgtggccct ccaagtgaagt 1200
 tcttttgggt tccattgcct agacaggaa agtgaggctt tgcctgctct gcgtcacag 1260
 15 ggtcggcaag tagtgggacc ctagggtcct gcagtattcc agagataatc aaagctgcac 1320
 aggtctcgtc atttttatgc aaagggcgtcc ggaaggctcg aactctccct tgcacaagcc 1380
 catctgtctc tgtgcgcgcg ccccgggaca cggaagcagg cggcgagcag cgcgagtggt 1440
 gtggagaacc gtccccgcgc actcaccctt cggccaactc tccgcgcctt ctacgcccgc 1500
 acccagagg ccgacctctc tcggcctaaa aaaaaaaaaa aaaaatcccg gcctcccctg 1560
 20 caccgccccc gcgcgccccca gggagctgca ttaattattaa tctcgtctgaa taattgaagg 1620
 ccagagattt attcagagctt cggcggggga gggagcgcag ctgggcccgc tttaggctgc 1680
 accaccgcgc tgtttcagcc gctcgaactc gctggacctg ggacccccag acgtgggagg 1740
 atggggtggg tgtgcctgcc tgtgagtttg ggggtgagtg tgagctgaag cgggtgctcc 1800
 ggggagtgag gagggagcgc caggggctgc tccaggaggg cggagacgga ggggcatccc 1860
 25 ggggtctccgc gcggtcgcct gcgcttcacc ccgcacgggg tgacctgggg ccacgcgggc 1920
 ttcaggggaa acaatagcta ctcccttagat cctgggctcc tgccaccggc tgcccaagcc 1980
 tccccggac agcggcgggg cctcttttct tatttgcta atttatggcg agaggctggg 2040
 ggaagggatg gcagaggagg gaccgcgact gaaaatgggg gcggggggcg gcggttaagg 2100
 gaggtgcccg aggcggcggc gcgggtgatg tcagctctcg acgaaaatag agagggatcg 2160
 30 cctgcaaatc ccagctccg gcgggggctaa accttgcaat ccctccctgg cggcgccga 2220
 gccagagcgc agcggcctcc accgcctccc caggcgcgca cacaccgca cagcgcgacg 2280
 cacgtcacc gtcctctgcc accactctct gctcccgcga ctccgcgcgc ccgcgagccc 2340
 cgcagcaaaag cacaggtggc agcggctgca ggggcgcatc gccggcgctgc gccctctctgc 2400
 35 agccctgggc gcatcgtctc ctccgggaag ccaccctcgg agcccccgga gctc 2454

<210> 4 SEC ID N°: 4

<211> 861

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

50 cccgggtctc cgcgcggtcg cctgcgtctc acccgcacg gggtgacctg gggccacgcg 60
 ggcttcaggg gaaacaatag ctactcctta gatcctgggc tectgccacc ggctgccaa 120
 gccttcccgg acgagcggcg gggcctcttt tcttatttgg ctaatttatg gcgagaggct 180
 gggggaaggg atggcagagg agggaccgcg actgaaaatg ggggcggggg gggcggtta 240
 aaggagtgc cogaggcggc ggcgcgggtg atgtcagctc tcgacgaaaa tagagaggga 300
 tcgcctgcaa atccccagct ccggcggggc taaaccttgc aatccctccc tggccggcgc 360
 cgagccagag cgcagcggcc tccaccgctt cccagggcgc gcacacacc gcacacgcgc 420
 55 acgcacgctc accgtcctct gccaccactc tctgctcccg ccactcgccg cgcccgcgag 480
 ccccgagca aagcacaggt ggcagcggtc gcaggggcgc atcgccggcg tgcgccctcc 540
 tgcagccctg ggcgcctcgc tctctcgggg aagccacctc cggagcccc ggagctcccc 600
 gccaaagcgc atccccgcg gcggagggga gcgcgggtcg cgcgcctgag agagccggga 660
 cgcggattag cgcgcgcagg agcctcctgc gcccggtgag gcgctaaagg gcttacccc 720
 60 gaggcggtg gaaggcgggg cagaggtccc tcttaataac cgctcccggc cgcacttcgc 780
 gctacccccg gcgtccgctt tctccctcgc ccacagctgc cggatagtgc tgaagaggag 840
 gggcggttcc ccagaccatg g

65