



JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

3ª ANUALIDAD

FINAL

**Número Expediente:** 2010I153

**Investigador Principal:** Miriam Royo Expósito

**Otros Investigadores:**

Sonia Varón Colomer

Natàlia Garrido Beteta

Sergi Rodríguez Escrich

**Título Proyecto o subproyecto** Papel protector de la Reelina en trastornos de adicción: identificación de compuestos moduladores de la Reelina con potencial terapéutico

**Título Proyecto coordinado en el que se integra** Papel protector de la Reelina en trastornos de adicción

**Organismo:** Fundación Privada Parc Científic de Barcelona

**Centro:** Fundación Privada Parc Científic de Barcelona

**Departamento:** Unitat de Química Combinatoria

**Comunidad Autónoma:** Catalunya

**Duración:** 3 años

**Fecha de inicio:** 15/12/2010

**Fecha de finalización:** 15/12/2013

**Año Convocatoria:** 2010

**Área Temática:** 4. *Investigaciones sobre aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos diferenciales entre hombres y mujeres en relación con las adicciones*

**Palabras Clave:** Péptidos, anticuerpos, screening, moduladores de reelina, drug discovery, terapia para adicción



**RESUMEN:** (Objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2.000 palabras.)

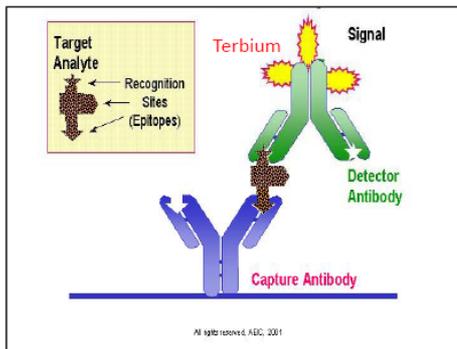
El proyecto es una colaboración establecida con el grupo del Dr. Soriano para explorar la vía de señalización activada por Reelina como diana terapéutica para el tratamiento de la adicción a distintos compuestos psicotrópicos mediante el desarrollo de un programa de química médica para la detección y optimización de moléculas que modulan esta vía. El grupo del Dr. Soriano ha demostrado que la vía de señalización activada por Reelina juega un rol homeostático en la función cerebral en adultos (incluyendo la plasticidad sináptica y la neurogénesis), y a su vez esta implicada en la adicción a distintas drogas y en trastornos asociados.

En un inicio el proyecto en base a realizar tres objetivos principales que son: 1) el desarrollo de un ensayo celular para poder evaluar potenciales moduladores de la cascada de reelina; 2) la evaluación de librerías de compuestos comerciales con el fin de encontrar potenciales hits como moduladores de la reelina; y 3) en base a los hits encontrados desarrollo de un programa de química médica y ensayos preliminares de eficacia de los potenciales candidatos *in vitro* e *in vivo*.

Este planteamiento, tal vez muy ambicioso considerando el punto de partida del proyecto, se ha visto modificado durante el desarrollo del mismo poniendo especial foco en el primer objetivo dada la dificultad manifiesta que resulta de obtener anticuerpos con elevada selectividad para determinados sitios de fosforilación. Existen anticuerpos para Dab 1 comerciales, pero anticuerpos específicos para determinadas zonas o dominios de la proteína o para detectar específicamente la fosforilación de determinados residuos no son asequibles comercialmente y los que hay descritos que han sido cedidos por los laboratorios que los generaron no funcionan con suficiente especificidad en nuestras manos. Por esto el foco del proyecto se ha puesto en la generación de anticuerpos de elevada especificidad para distintos dominios o zonas de fosforilación de Dab 1 ya que disponer de estos es el paso clave para la generación del ensayo celular para la detección de moduladores tipo reelina.

La realización de este proyecto de manera efectiva ha requerido el desarrollo de herramientas químicas y biológicas que permitan determinar en distintos ensayos celulares la cuantificación de distintas etapas de la activación de la vía de señalización asociada a la acción de Reelina e implementarlos a procesos de cribado de alto rendimiento. Para ello se decidió evaluar dos etapas clave de esta vía: 1) la fosforilación selectiva de determinadas tirosinas de Dab1 mediante la acción de la Src tirosina quinasa y 2) la ubiquitinación de Dab1 que se produce antes de la autodegradación. Las herramientas que se han desarrollado para realizar este trabajo son anticuerpos de carácter monoclonal y policlonal que reconozcan específicamente Dab1 una vez fosforilada por la acción de reelina en distintos estadios de modo que permitan determinar y cuantificar los pasos clave de esta vía asociados directamente a la acción de Reelina. El objetivo final es conjugar los anticuerpos obtenidos con un complejo de Terbio preparado para conjugar que se conoce como plataforma LanthaScreen (Invitrogen). El uso de esta plataforma permite realizar estimaciones de determinados procesos involucrados en una vía de señalización mediante medidas FRET entre un anticuerpo específico para determinar modificaciones post-transduccionales de un determinado sustrato quinasa (por ej: fosforilación o ubiquitinación) conjugado al complejo de terbio y una GFP-proteína que sea sustrato de la quinasa en estudio, en nuestro caso es GFP-Dab 1. El anticuerpo Terbium-anti-ubiquitin-FK2 es comercial (Invitrogencat # PV4752) se utilizará para determinar y estimar el proceso de ubiquitinación de Dab 1 y el anticuerpo monoclonal contra Dab 1 con residuos de tirosina fosforilados selectivamente (Tyr<sup>198</sup> and Tyr<sup>200</sup>) por la acción de la activación de la cascada de la Reelina que se ha generado por nuestro grupo en colaboración con la plataforma de producción de anticuerpos del CIBER BBN-CSIC y conveniente modificado con el complejo de terbio para estimar la fosforilación directamente asociada a la acción de reelina.

Además se ha procedido a generar también un anticuerpo anti Dab 1 de carácter policlonal que actuara como captador de la Dab 1 en el medio y que permite plantear el ensayo propuesto con una estrategia de tipo “sandwich” (Figura 1) . Esto incrementará la señal de detección y la fiabilidad del ensayo de screening. Este anticuerpo policlonal anti Dab 1 podía ser comercial o generarlo en nuestro grupo. Se optó por esta segunda opción ya que podemos obtener anticuerpos anti Dab 1 que reconocen secuencias de esta proteína suficientemente alejadas de la zona de reconocimiento donde se encuentran ubicadas las posiciones fosforiladas específicas de la vía de activación de reelina. A parte el desarrollo de esta batería de anticuerpos permitirá también al grupo del Dr. Soriano utilizarlos en distintas partes de sus estudios.



Proposed test.

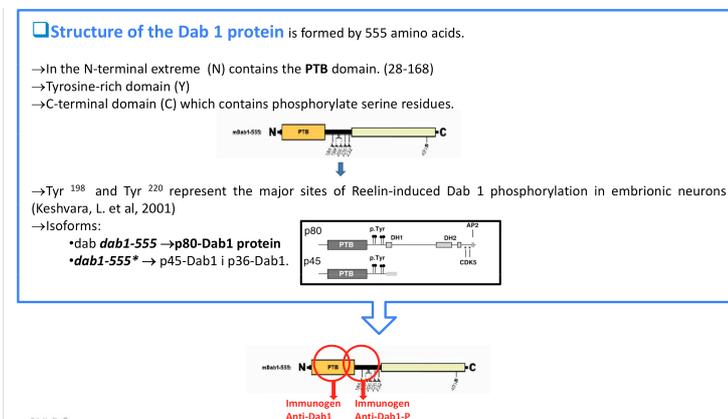
Detection antibody: Anti Dab 1-P: **Monoclonal**

Capture antibody: Anti Dab 1: **Polyclonal**

**Figura 1.** Estrategia tipo sandwich planteadas par poder amplificar la señal y tener una respuesta mas selectiva

### 1.- Desarrollo de anticuerpos policlonales anti Dab-1 y monoclonales anti Dab-1P

Se procedió a realizar la producción de anticuerpos policlonales de 3 péptidos no fosforilados correspondientes a la parte N-terminal (N-PTB) de la proteína Dab1 (ver figura 2). Nos focalizamos en esta parte de la secuencia por estar suficientemente alejada de los dominios donde se encuentran las tirosinas que pueden ser fosforiladas de modo específico por la vía de señalización activada por reelina. Así aseguramos que no haya interferencias cuando se utilicen ambos anticuerpos el policlonal anti Dab 1 y el monoclonal anti-P Dab 1 en el ensayo tipo sandwich y que la acción de un anticuerpo pueda impedir el reconocimiento por parte del otro. Además esta parte de la secuencia esta presente en todas las distintas isoformas de Dab 1 lo que nos puede dar anticuerpos que reconzcan por igual todaslas isoformas.





**Figura 2.** Estructura de Dab 1 y los dominios que la componen.

En base a esto se diseñaron, sintetizaron y purificaron tres péptidos inmunogénicos (figura 3 ) con los cuales inmunizaron conejos para la obtención de los correspondientes anticuerpos. Dos de estos péptidos se tuvieron que sintetizar un par de veces al fallar la primera síntesis debido a su complejidad sintética. Se conjugaron a KLH (para inmunizar) y a BSA (para realizar su evaluación como anticuerpos) utilizando el método del iodoacético que permite la conjugación a la proteína vía lisinas y la incorporación del péptido antigénico vía cisteína. La decisión de trabajar con tres secuencias distintas con las que se obtuvieron tres anticuerpos que reconocen distintos fragmentos se realizó con el fin de poder disponer del mejor anticuerpo, es decir el mas selectivo que actúe como capturador de Dab 1 y por otro lado tener posibilidad de cambiar de anticuerpo capturador si al realizar el sandwich con el anticuerpo monoclonal este no fuera capaz de reconocerla secuencia fosforilada por efecto del Ab capturador.

MSTETELQVAVKTSAKKDSRKKGQDRSEATLIKRFKGEGVRYKAKLIGIDEVSAARGDKLQC  
DSMMKLKGVVAGARSKGEHKQKIFLTISFGGIKIFDEKT **GALQHHAHVHEISYIAKDITDHRA**  
**FGYVCGKEGNHRFVAIKTAQAAEPVILDLRDLFQLIYELK**QREELEKKAQKDKQCEQAVYQTI  
LEED **VEDPVYQYIVFEAGHEPIRDPETEENIYQVPTSQKKE**GVYDVPKSPVSAVTQLELFGD  
MSTPPDITSPPTPATPGDAFLPSSSQTLPGSADVFGSMSFGTAAVPSGYVAMGAVLPSFWGQQ  
PLVQQQIAMGAQPPVAQVIPGAQPIAWGQPGLFPATQQAWPTVAGQFPAAFMPTQTVMPLA  
AAMFQGPLTPLATVPGTND SARSSPQSDKPRQKMGKESFKDFQMVQPPPVPSPKPDQPSLTCT  
SEAFSSYFNKVGVAQD TDDCDFDISQLNLTPTSTTPSTNSPPTPAPRQSSPSKSSASHVSDPT  
ADDIFEEGFESPSKSEEQEAPDGSQASSTSDPFGEPSGEGPSGDNISPQDGS

Péptido A: Fragmento de la secuencia incluida entre los residuos 100-130 (21aa). Contiene una cisteína en el extremo C-terminal para realizar la conjugación.

Péptido B: Fragmento de la secuencia incluida entre los residuos 100-130 (21aa). Contiene una cisteína en el extremo C-terminal para realizar la conjugación.

Péptido C: Fragmento de la secuencia incluida entre los residuos 100-150 (21aa). Contiene una cisteína en el extremo N-terminal para realizar la conjugación.

**Figura 2.** Secuencia de Dab 1 y los péptidos que se han utilizado para la generación de anticuerpos policlonales. En amarillo se remarca la secuencia de la proteína donde se han extraído los péptidos seleccionados como inmunógenos para la producción de anticuerpos policlonales anti Dab 1. En verde se remarca la parte de la proteína donde se han reportado fosforilaciones directamente asociadas a la acción de reolina.

Las densidades del hapteno de los conjugados de proteína se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas naturales con el de los conjugados. En la tabla 1 se pueden observar el número de copias de péptido antigénico incorporadas a la proteína carrier KLH. El desarrollo de los anticuerpos policlonales se realizó inoculando los conejos con el inmunógeno unido a la proteína KLH (3 conejos/por inmunógeno). Las inoculaciones se repitieron cada cuatro semanas aproximadamente, emulsionando con el adyuvante incompleto, hasta que, al cabo de un total de seis inoculaciones, ya no hubo un incremento apreciable en la respuesta inmune. El incremento de respuesta inmune se cuantificó mediante una valoración del título del antisuero de los conejos mediante un ensayo ELISA indirecto no competitivo.

### METODO DE CONJUGACIÓN



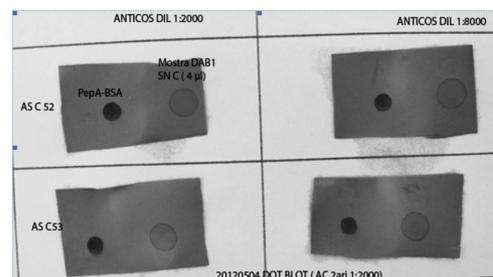
Péptido	MW del péptidos	Número de copias incorporadas
A	2549,86	8.2
B	2384,67	4.15
C	2267,57	26

**Tabla1.** Resultados de la conjugación de los péptidos A,B y C a KLH.

Con todos los antisueros obtenidos se realizaron ensayos de ELISA indirecto competitivo para analizar el reconocimiento de los péptidos inmunizados (los mismos péptidos conjugados a BSA). Los ensayos obtenidos de la valoración de los sueros obtenidos de los anticuerpos policlonales obtenidos contra los inmunógenos PéptidoA-KLH, PéptidoB-KLH y PeptidoC-KLH revelan que los anticuerpos más prometedores son los obtenidos con el péptido A-KLH. Con los sueros correspondientes al cuarto sangrado se realizaron experimentos de Western Blott observándose una banda sobre peso molecular de 80 KDa (peso molecular esperado para Dab 1).

Cuando se realiza experimentos de Western Blott con los sueros finales del inmunógeno A-KLH las bandas correspondientes al peso molecular de 80 KDa desaparecen. Este resultado cuadra con experimentos de Elisa no competitivos realizados con lisados celulares que contenían Dab 1 que tampoco mostraban reconocimiento de Dab 1 en lisados celulares (ver tabla 2).

Este resultado se confirmó al realizar experimentos de Dot Blott comparando péptido competidor (péptido A-BSA) con Dab 1 (lisados de neuronas que contienen Dab 1). El suero final obtenido con el inmunógeno A-KLH reconoce al péptido competidor (péptido A-BSA) pero no al lisado que contiene Dab 1 (figura 4).



**Figura 4.** Experimento Dot Blott que compara el reconocimiento los sueros finales obtenidos con el péptido A-KLH con el competidor péptidoA-BSA y lisado celular que contiene Dab1.

Esta diferencia en el reconocimiento se puede deber a distintos factores que pueden ser: a) el extracto biológico a analizar sea muy complejo; b) las condiciones de la preparación del lisado interfieran en el reconocimiento, y c) la concentración de Dab 1 es muy baja en el lisado.



En este punto se hizo patente la necesidad de disponer de Dab 1 recombinante como control positivo para descartar cual puede ser la causa del bajo reconocimiento de la misma en lisados celulares. En este tiempo se ha estado trabajando en la generación de este control positivo.

Paralelamente se está explorando con la purificación de los sueros por afinidad para ver si mejora el reconocimiento, así como en el estudio de distintos tratamientos del lisado previo a la incubación del anticuerpo. Actualmente se está buscando la mejor opción que favorezca el reconocimiento en lisados que contienen Dab1 que se aplicará al suero obtenido con el inmunógeno A-KLH, así como a los sueros obtenidos con los otros dos inmunógenos.

Un planteamiento adicional en caso que las acciones anteriores fallen es volver inocular el inmunógeno péptido A-KLH (que es el que ha dado mayor respuesta) a nuevos conejos con el fin de obtener sangres finales más definidas. Actualmente se está evaluando la necesidad de proceder a realizar este segundo experimento de inmunización.

## 2. Producción de anticuerpos monoclonales que permitan cuantificar fosforilación selectiva de determinadas tirosinas de Dab1 mediante la acción de la Src tirosina quinasa activada por reelina.

Se escogieron dos secuencias que contienen tirosinas que está descrito en la literatura que son fosforiladas por la activación de la vía relacionada con reelina (figura 4).

MSTETELQVAVKTSAKKDSRKKGQDRSEATLIKRFKGGVRYKAKLIGIDEVSAARGDKLCQ  
DSMMKLKGVVAGARSKGEHKQKIFLTISFGGIKIFDEKT **GALQHHAHVHEISYIAKDITDHRA**  
**FGYVCGKEGNHRFVAIKTAQAAEPVILDLRDLFQLIYELK**QREELEKKAQKDKQCEQAVYQTI  
LEED**VEDPVYQYIVFEAGHEPIRDPETEENIYQVPTSQKKE**GVYDVPKSPVSAVTQLELFGD  
MSTPPDITSPPTPATPGDAFLPSSSQTLPGSADVFGSMSFGTAAVPSGYVAMGAVLPSFWGQQ  
PLVQQIAMGAQPPVAQVIPGAQPIAWGQPLFPATQQA WPTVAGQFPPAAFMPQTVMPLA  
AAMFQGPLTPLATVPGTND SARSSPQSDKPRQKMGKESFKDFQMVQPPP VPSRKPDPQLTCT  
SEAFSSYFNKVGVAQDTDDCDFDISQLNLTPVTSTTPSTNSPPTPAPRQSSPSKSSASHVSDPT  
ADDIFEEGFESPSKSEEQEAPDGSQASSTSDPFGEPSPGEGPSGDNISPQDGS

Péptido D : Fragmento bifosforilado de 15 aa de la secuencia incluida entre los residuos 190-230. Contiene una cisteína en el extremo N-terminal. (D-P , fosforilado).

Péptido E: Fragmento fosforilado de 15 aa de la secuencia incluida entre los residuos 190-230. Contiene una cisteína en el extremo N-terminal. (E-P , fosforilado).

**Figura 4.** Secuencia de Dab 1 y péptidos utilizados como antígenos para la producción de anticuerpos monoclonales anti P Dab 1. n verde se remarca la parte de la proteína donde se han extraído los péptidos seleccionados como inmunógenos para la producción de anticuerpos monoclonales anti P Dab 1. En amarillo se remarca la parte de la proteína donde se han extraído los péptidos para la producción de anticuerpos policlonales anti Dab 1 que se utilizarán como anticuerpos de captura.

Para la generación de estos anticuerpos monoclonales y su selección sintetizaron los siguientes péptidos:

- Péptido D
- Péptido E
- Péptido D-P (fosforilado)
- Péptido E-P (fosforilado)
- Fosfopéptido no homólogo (una secuencia aleatoria que contiene dos residuos de tirosina fosforilados).
- Fosfopéptidos homólogos (secuencia con el mismo contenido de aminoácidos que los péptidos utilizados para inmunizar pero dispuestos secuencialmente de otro modo totalmente distintos).



De todos estos péptidos, los que son fosforilados se tuvo que repetir su síntesis varias veces, especialmente el péptido D-P (que tiene dos tirosinas fosforiladas), para poder obtener el producto final requerido con la pureza necesaria en cantidades suficientes para la inmunización. Se prepararon los correspondientes conjugados E-P-KLH y D-P-KLH para inmunización y los conjugados E-P-BSA, D-P-BSA, E-BSA, D-BSA y los conjugados de los fosfopéptidos homólogos y no homólogos para estudiar el reconocimiento selectivo de los anticuerpos generados. Todos ellos se prepararon según el método descrito anteriormente y se evaluó las densidades del hapteno de los conjugados de proteína se calcularon mediante MALDI-TOF-MS (ver tabla 2 para los resultados de los conjugados inmunógenos y los correspondientes controles no fosforilados).

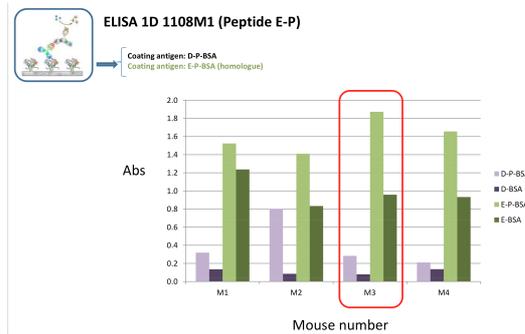
Péptido	MW del péptidos	Número de copias incorporadas
D	1809,45	7.6
D-P	1889,93	6.8
E	1772,97	3.58
E-P	1932,93	19.57

**Tabla 2.** Resultados de la conjugación de los péptidos D y E a BSA y D-P y E-P a KLH.

Una vez preparados los inmunógenos de los péptidos D-P y E-P unidos a KLH se inmunizaron ratones BALB/c hembra de entre 8 y 10 semanas de edad mediante inyección intraperitoneal. Se realizaron 3 inmunizaciones en intervalos de tres semanas y transcurridas 3 semanas desde la última dosis, se les administró 100 µg de conjugado en 200 µl de PBS 4 días antes de la fusión celular. Aproximadamente 11 días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante un “ELISA diferencial” para detectar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer al al péptido fosforilado/no fosforilado correspondiente. Este procedimiento consiste en realizar, en pocillos adyacentes de una placa ELISA, un ensayo no competitivo utilizando como antígeno de tapizado en un pocillo el péptido fosforilado unido a la proteína BSA, y en el pocillo adyacente el péptido no fosforilado unida a la proteína BSA, para probar, respectivamente, la capacidad de los anticuerpos de reconocer al péptido fosforilado frente al no fosforilado. En este “Elisa diferencial” se observaba que en prácticamente ningún pocillo había una diferencia significativa de reconocimiento del péptido fosforilado en frente a la del péptido no fosforilado por parte de los sueros de los sobrenadantes de los hibridomas procedentes de la fusión.

Dicho resultado nos llevó a un cambio de estrategia experimental para poder dar lugar a anticuerpos con una mayor especificidad con un aumento del tiempo durante el protocolo de inmunización.

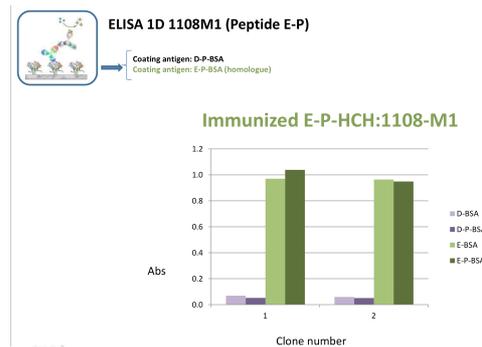
Para ello se realizaron nuevas inmunizaciones de ratones tanto con el péptido D-P como con el péptido E-P unidos a la KLH y se llevaron a cabo protocolos de inmunización más largos para poder conseguir un mayor aumento de la especificidad de los anticuerpos producidos y así poder llegar a ser capaces de obtener anticuerpos específicos de los péptidos fosforilados. En este nuevo proceso de inmunización se obtuvieron resultados espectaculares con algunos ratones que fueron seleccionados para el proceso de clonaje y obtención de hibridomas y que mostraban gran selectividad en el reconocimiento entre las secuencias E y D y con la correspondiente secuencia fosforilada (figura 5).



**Figura 5.** Ensayo de selección mediante Elisa diferencial de ratones inmunizados con E-P-KLH

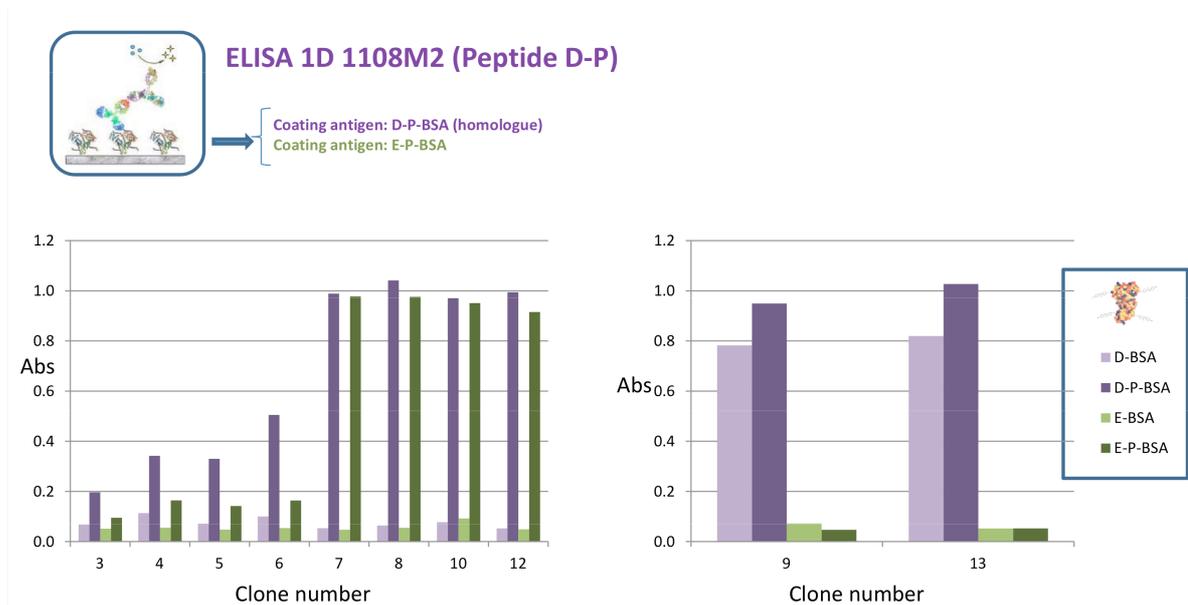
De los ensayos obtenidos de la valoración mediante Elisa diferencial de los clones procedentes del segundo clonaje de los ratones seleccionados para el desarrollo de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra los inmunógenos D-P-KLH y E-P-KLH revelan que se han obtenidos hibridomas con distintas características de reconocimiento de los péptidos D, D-P, E y E-P.

Así clones procedentes de ratones inmunizados con el inmunógeno E-P-KLH son capaces de distinguir entre la secuencia D y D-P y entre la forma fosforilada E-P y E (ver figura 6)



**Figura 6.** Valoración del reconocimiento de algunos de los hibridomas obtenidos para el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra el inmunógeno E-P-KLH.

Por otro lado clones procedentes de ratones inmunizados con el inmunógeno D-P-KLH son capaces de distinguir entre la secuencia D y E y entre la forma fosforilada D-P frente a D (figura 6).



**Figura 7.** Valoración del reconocimiento de algunos de los hibridomas del segundo clonaje obtenidos para el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra el inmunógeno D-P-KLH.

La valorización de los hibridomas procedentes del primer clonaje por Western Blott confirman que algunos de los hibridomas seleccionados son prometedores.

Así podemos decir que hemos obtenido tres familias de anticuerpos monoclonales contra los péptidos fosforilados D-P y E-P. Se disponen de clones que son capaces de reconocer:

- Péptido E-P frente péptido E
- Péptido D-P frente péptido D
- Péptido D-P frente peptido E-P

Actualmente se está procediendo a analizar los hibridomas del segundo clonaje mediante Western Blott., a cuantificar la concentración de anticuerpo monoclonal de ratón en cada muestra para poder ensayar de manera comparativa todos los clones a la misma concentración mediante Elisa.

Una vez confirmados estos anticuerpos monoclonales como selectivos para las secuencias fosforiladas seleccionadas se procederá a su conjugación con la plataforma LanthaScreen y se iniciaran los ensayos iniciales en formato sandwich aunque al principio se utilice como anticuerpo de captura un policlonal anti Dab 1 comercial hasta tener el propio desarrollado

### 3. Selección y producción de controles positivos y negativos para el ensayo de screening

Se ha un estudio bibliográfico exhaustivo con el fin de seleccionar controles positivos y negativos de la vía de reelin que se pretende cuantificar. De esta manera diversas proteínas y algunos péptidos descritos que se unen a los receptores de Reelin (ApoER2 y VLDLR) de manera similar a ella se ha determinado que se usaran como controles para establecer y validar el ensayo HTS que se está desarrollando. Los controles seleccionados hasta el momento son: a) Reelin como el único ligando definido como desencadenante de la vía de señalización estudiada; b) ApoE ligando de estos receptores cuya acción no transcurre a través de la fosforilación de Dab 1 ; c) Thrombospondin-1 (THBS-1) que se une a los sitios de unión de VLDLR y ApoER2 compitiendo en la unión con Reelin y que induce la fosforilación de Dab-1, pero no su degradación o la fosforilación de Akt; d)



F-Spondin que también induce la activación de Dab 1; y e) fragmentos fruto de la degradación de Reelina que también se unen a sus receptores.

Se ha iniciado el proceso de obtención de estos potenciales controles para disponer de los mismos en el momento de iniciar el desarrollo del ensayo, una vez obtenidas las herramientas necesarias para el mismo. En una primera fase se ha iniciado el proceso de obtención de los fragmentos de Reelina que se ha realizado en aquellos que ha sido posible por su tamaño mediante síntesis en fase sólida.

#### 4.- Síntesis de péptidos que mimetizan los sitios de unión se Reelina.

Se ha planatado la síntesis de péptidos (15 a 20 aminoácidos de tamaño) que exploran los repeats de Reelina que se encuentran entre R3 y R6 y entre R5 y R6 (para encontrar el péptido de talla inferior (unidad mínima de binding) que sea capaz de inducir una activación en la cascada de Reelina (a altas concentraciones micromolar). Se sintetizado una pequeña biblioteca basada en esta aproximación mediante síntesis en fase sólida.

#### **ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN:** (Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

Todavía no han aparecido artículos relacionados ya todavía hay experimentos en curso necesarios para su publicación. Además los anticuerpos que se han generado formaran parte de un ensayo de cribado que potencialmente se patentará. La publicación de los resultados se realizará una vez se haya realizado la protección intelectual del ensayo de cribado.

#### **MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO SOBRE LOS PROYECTADOS Y SU JUSTIFICACIÓN:**

Se ha planteado el diseño y producción de algún anticuerpo más de los diseñados al principio ya que creemos que con estos anticuerpos podremos obtener ensayos más sensibles y fiables. Esto incrementará un poco la partida de obtención de anticuerpos.

Además ha habido retrasos en el plan de trabajo debido a problemas técnicos originados en la dificultad sintética de los péptidos antígenos diseñados lo que ha provocado que su síntesis (tanto en el caso de los policlonales como en el de los monoclonales) se haya tenido que repetir varias veces para tener los péptidos objetivo. Esto ha causado un atraso en el inicio del proceso de inmunización.

Posteriormente los resultados de los ensayos de inmunización también han presentado problemas técnicos que han forzado un cambio en el protocolo de obtención de los anticuerpos para mejorar su especificidad siendo necesario recurrir en el caso de la obtención de anticuerpos monoclonales a un segundo experimento de inmunización. Esto ha implicado un cambio en el protocolo de inmunización (procesos mas largos de inmunización especialmente para los anticuerpos monoclonales) y mayor inversión de tiempo en encontrar las condiciones idoneas de evaluación que puedan ser transferibles al ensayo de screening. Consecuentemente la pruebas del sistema de screening que se habían de realizar en la Plataforma de HST de la Universidad de Santiago de Compostela (USEF-USC) se han retrasado ya que no tenía sentido iniciar nada hasta no disponer de anticuerpos con elevada especificidad ya que estos son la clave del ensayo. Al finalizar el proyecto se puede decir que la obtención de anticuerpos monoclonales para los sitios de fosforilación específicos de Dab 1



se han obtenido con éxito y están en proceso de caracterización final, mientras que la obtención de un anticuerpo policlonal de captura anti Dab 1 ha presentado problemas que se están intentando resolver. Si esto no fuera posible en un plazo corto de tiempo se recurrirá al uso de un anticuerpo Dab 1 comercial con el fin de hacer un primer prototipo del ensayo planteado.

**OBJETIVOS PLANTEADOS** :(Transcribir los del proyecto original)

Buscar moduladores químicos de la expresión de la Reelina que puedan ser nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de una amplia variedad de adicciones a compuestos psicotrópicos (por ej: anfetaminas y el alcohol entre otros).

Los objetivos específicos de esta propuesta son los siguientes:

2.1 Desarrollo de ensayos celulares para la detección de moduladores de la casacada de la Reelina e implementación a procesos de cribado de alto rendimiento (High Throughput Screening, HTS).

2.2 Identificación de potenciales hits mediante HTS y optimización de los mismos.

2.3 Desarrollo de un programa de química médica de tipo *hit to lead* y ensayos preliminares de eficiencia de los potenciales candidatos *in vitro* e *in vivo*

**OBJETIVOS CONCRETOS ALCANZADOS:** (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto)

Estamos en el proceso de consecución del objetivo 2.1 Desarrollo de ensayos celulares para la detección de moduladores de la casacada de la Reelina e implementación a procesos de cribado de alto rendimiento (High Throughput Screening, HTS).

Estamos en la fase final de generación de las herramientas (anticuerpos) para poder poner a punto los ensayos disponiendo de anticuerpos monoclonales específicos para determinados sitios de fosforilación de Dab 1 que están siendo acabados de caracterizar y cuantificar. También se han generado un anticuerpo policlonal anti Dab 1 de captura que presenta problemas de reconocimiento de la proteína aunque no de la secuencia inmunogénica. Estos problemas se están intentando solventar, pero en cuanto los anticuerpos monoclonales estén caracterizados se procederá a realizar los primeros prototipos del ensayo con un anticuerpo comercial hasta disponer del propio. También se han empezado el proceso de obtención de algunos controles.



Se ha empezado a trabajar en el objetivo 2.3 Desarrollo de un programa de química médica de tipo *hit to lead* y ensayos preliminares de eficiencia de los potenciales candidatos *in vitro* e *in vivo*

Concretamente se ha sintetizado una pequeña biblioteca de péptidos que mimetizan los sitios de unión de reelina con el fin de disponer de ella cuando el ensayo este a punto.

**APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS.** (En caso de memoria final)

Se pretenden obtener agentes terapéuticos que permitan atajar drogodependencias de distinta índole (psicotrópicos, alcohol etc...). El ensayo de cribado que se está desarrollando nos permitirá determinar que compuestos actúan como moduladores de la cascada de reelina y son potenciales fármacos para el tratamiento de drogodependencias mediante acción en una vía no muy explorada farmacológicamente pero de la que tenemos pruebas contrastadas de su participación en drogodependencias.

**PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO.** (En caso de memoria final)

Todavía no hay patentes, aunque este tiene una clara filosofía de protección de la propiedad intelectual pero no se ha llegado todavía al punto adecuado. Se pretende patentar el ensayo de cribado que se desarrolle y las moléculas que se determinen como moduladores de la vía reelina mediante el mismo.

**OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O PENDIENTES DE RESOLUCIÓN:** importe, procedencia y aplicación

No ha habido otra financiación.

**SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS:** organismo, convocatoria y cantidad.

Se solicitó un ayuda de Alzheimer Drug Discovery Foundation y una de La Caixa sin resultados positivos.

**OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR**

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección [pndinvestigacion@msssi.es](mailto:pndinvestigacion@msssi.es) la presente memoria.

En .Barcelona a 13 de Febrero de 2014



MINISTERIO DE SANIDAD,  
SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD

SECRETARÍA DE ESTADO  
SERVICIOS SOCIALES E  
IGUALDAD

DELEGACIÓN DEL GOBIERNO  
PARA EL PLAN NACIONAL SOBRE  
DROGAS

FIRMA