



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 389**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02707080 .4**

96 Fecha de presentación : **21.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1415162**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **Nuevos péptidos para el diagnóstico de la esquizofrenia.**

30 Prioridad: **21.03.2001 IL 142159**
21.03.2001 US 278659 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.10.2011

73 Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
The Weizmann Institute of Science
P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL

72 Inventor/es: **Deckmann, Michael**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 389 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos péptidos para el diagnóstico de la esquizofrenia

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un ensayo para el diagnóstico de la esquizofrenia y proporciona nuevos péptidos para su uso en el ensayo.

Técnica anterior

10 La siguiente es una lista de las publicaciones destinadas a una mejor comprensión de los antecedentes de la invención. El reconocimiento en el presente documento de la técnica anterior no debe interpretarse como una indicación de que esta técnica sea, en modo alguno, relevante para la patentabilidad de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Carpenter, W.T., y Buchanan, R.W.: Revisión, N. England., J. Med., 330:681-690, 1994.

Deckmann, M., Shinitzky, M., Leykin, I., Cheng, D., Guy, J., Avnon, M., Salganik, I., Amiri, Z., Schlossberg, A., Leib, E. y Rafael, C.: The Italian J. Psychiatr. Behav. Sci., 6:29-34, 1996.

DeLisi, L.E. y Crow, T.J.: Psychiatr. North Am., 9:115-132, 1987.

15 Rotman, A.: Blood platelets in psychopharmacological research. Prog. Neuropsychopharmacol., 6:135-151, 1983.

Shinitzky, M., Deckmann, M., Kessler, A., Sirota, P., Rabbs, A., y Elizur, A.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 621:205-217, 1991.

Shinitzky, M. y Deckmann, M., "Diagnosis of the susceptibility of contracting schizophrenia", Patente US No. 6,008,001, 1999.

Shinitzky, M. y Deckmann, M., "Assay for schizophrenia based on skin reaction" WO 99/30163, 1999.

20 Shinitzky, M. y Deckmann, M., "Assay for the diagnosis of schizophrenia based on a new peptide" WO 99/51725, 1999.

Antecedentes de la invención

25 La esquizofrenia es un síndrome que engloba una variedad de síntomas mentales, tales como alucinaciones auditivas, paranoia, delirio, catatonia, comportamiento extraño y retraimiento emocional. La esquizofrenia afecta aproximadamente al 1% de la población total y su carga económica, así como social, en la sociedad, son enormes. El inicio de la enfermedad se presenta a una edad temprana y, de esta manera, los pacientes necesitan, típicamente, supervisión médica y psiquiátrica durante toda su vida. Por lo tanto, la esquizofrenia se considera como una de las enfermedades más costosas en el mundo industrial (Carpenter, et al., 1994).

30 No se han identificado parámetros comunes asociados con la esquizofrenia y, por lo tanto, el diagnóstico de esta enfermedad, acordado a nivel internacional, se basa todavía, a día de hoy, únicamente en una evaluación psiquiátrica. Los factores de riesgo conocidos, asociados con la esquizofrenia, son la predisposición genética, el nacimiento durante el invierno y las complicaciones durante el embarazo o el parto. Las infecciones virales y / o bacterianas con una reacción autoinmune subsiguiente se han propuesto como factores causantes de la epidemia creciente de esquizofrenia (DeLisi, et al., 1987).

35 Se ha demostrado que la esquizofrenia implica un proceso autoinmune y recientemente se ha demostrado la implicación de anticuerpos y células T citotóxicas contra plaquetas en pacientes esquizofrénicos (Shinitzky, 1991, Deckmann, 1996, Shinitzky, 1999, Patente US 6.008.001). La reacción de las células T citotóxicas en pacientes esquizofrénicos se evaluó mediante un ensayo cutáneo en el que la mayoría de pacientes esquizofrénicos reaccionaron positivamente contra sus plaquetas autólogas, mientras que sólo un número muy pequeño de individuos no esquizofrénicos ensayados reaccionó positivamente en este ensayo (Shinitzky, 1999, W099/30163).

40 Además, se observaron elevados niveles de autoanticuerpos contra plaquetas en pacientes esquizofrénicos, pero no en pacientes que sufren trastorno maniaco-depresivo, depresión, trastornos de la personalidad y trastorno esquizoafectivo (Shinitzky, 1991 y Deckmann, 1996).

45 En el trabajo previo de los presentes inventores, se identificaron varias proteínas que se unen a autoanticuerpos que se encuentran en niveles elevados en los fluidos corporales de los pacientes esquizofrénicos (Shinitzky et al., 1999, WO 99/51725). Estas proteínas reaccionaron con autoanticuerpos purificados derivados de plaquetas (PAA) de pacientes esquizofrénicos, pero no podían diferenciar entre muestras de plasma o sangre de individuos esquizofrénicos y no esquizofrénicos. La digestión enzimática de una de estas proteínas, la enzima Enolasa, dio lugar a un fragmento que se

une a las muestras de plasma de los pacientes esquizofrénicos de una manera sustancialmente mayor de lo que se une a las muestras de plasma de individuos no esquizofrénicos. En base a este fragmento, se sintetizaron varios péptidos adicionales y se aislaron aquellos que tenían una actividad de unión alta a PAA de individuos esquizofrénicos. Se encontró que a estructura del epítipo antigénico de estos péptidos era un epítipo tri-dimensional que, mediante el uso de un programa informático, se predijo que tendría una estructura cíclica que comprende un núcleo hidrófobo y una extensión que tiene aproximadamente dos cargas positivas. Los estudios inmunológicos demostraron que sólo la forma cíclica oxidada del péptido era reactiva con los autoanticuerpos anti-plaquetas. Estos péptidos sintetizados comprendían al menos 17 aminoácidos (a.a.).

Resumen de la invención

Según la presente invención, se ha descubierto que las secuencias peptídicas descritas en la técnica anterior (WO 99/51725) son capaces de unirse en un mayor grado a autoanticuerpos que se encuentran en niveles elevados en los fluidos corporales de pacientes esquizofrénicos y en un menor grado o en absoluto en los fluidos corporales de individuos no esquizofrénicos, pero estos péptidos no pueden ser el sitio de unión natural de dichos autoanticuerpos. Esto se debe al hecho de que las secuencias no están expuestas en la superficie de la proteína de la que fueron derivadas (la enzima enolasa). A excepción del único aminoácido arginina en la posición 402, el resto de aminoácidos están enterrados dentro de la proteína (véase Fig. 1). Además, tal como se conoce, un sitio de unión de anticuerpos comprende, por lo general, aproximadamente 5-8 a.a., mientras que cada uno de estos péptidos comprendía 17 a. a., que no son necesarios, todos ellos, para el sitio de unión.

Por lo tanto, según la presente invención, en base a la comprensión de que el péptido, que es el sitio de unión natural para los autoanticuerpos que se encuentran en niveles elevados en los pacientes esquizofrénicos tendrá una unión más sensible y específica a dichos autoanticuerpos y, como tal, puede ser ventajoso en el diagnóstico de la esquizofrenia, se realizó un intento para identificar un sitio equivalente en la superficie de la enolasa mediante el uso de modelado tridimensional. El uso de la estructura tridimensional para buscar en la superficie de la enolasa, dio como resultado la identificación de un epítipo putativo (ver Fig. 2) que consiste en cuatro aminoácidos cargados positivamente, definidos como R414, R184, K194 y R402, que rodean a un grupo de aminoácidos neutros definidos como L412, L183, L409, L406, P400 y A401. Según la invención, se proporcionan péptidos que tienen un epítipo putativo.

De esta manera, por su primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que se une a una muestra de fluido corporal obtenida de un paciente esquizofrénico a un nivel sustancialmente más alto que su unión a una muestra de fluido corporal obtenida de un individuo no esquizofrénico, teniendo dicho péptido no más de 10 aminoácidos (a.a.) de largo y comprendiendo una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- i. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1)
- ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2)
- iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3)
- iv. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4);

consistiendo dicha secuencia en al menos un a.a. cargado positivamente en un extremo de dicha secuencia, y comprendiendo dicho péptido al menos un a.a. cargado positivamente en su extremo, siendo el a.a. cargado positivamente de dicha secuencia continua.

Un "nivel de unión sustancialmente más alto", según la invención, se determinará mediante el uso de cualquiera de los ensayos de unión conocidos en la técnica, tales como los descritos a continuación y en los que el nivel de unión medido de un péptido a una muestra obtenida de un paciente esquizofrénico es significativamente mayor que el nivel de unión medido del mismo péptido a una muestra obtenida de un paciente no esquizofrénico, según se determina mediante un ensayo estadístico adecuado, por ejemplo, el ensayo T de Student.

El término "secuencia continua" se refiere a una secuencia ininterrumpida de entre 5 y 7 a. a. de cualquiera de entre las secuencias SEQ. IDs 1 - 4, que incluye un a.a. cargado positivamente en su extremo. Preferentemente, el a.a. cargado positivamente es lisina (indicado como K en las secuencias), pero puede ser también arginina (R) o histidina (H).

La secuencia continua puede ser parte de un péptido más largo de hasta 10 a.a., en el que la secuencia continua está situada en cualquier parte en el péptido. En caso en el que el péptido consiste en más de 7 a.a., en el que la secuencia continua está en uno de los extremos del péptido, dicho a.a. cargado positivamente estará en el extremo abierto de la secuencia (que no está conectado al a.a. adicional del péptido más largo), de manera que el péptido largo comprende un a.a. cargado positivamente en uno de sus extremos. Cuando la secuencia continua está en el medio del péptido, el péptido comprende al menos un a.a. cargado positivamente adicional en uno de sus extremos, además del a.a. cargado positivamente de la secuencia continua.

También se describen análogos de los péptidos anteriores. Dichos análogos son péptidos que comprenden más de 10 a.a., incluyendo al menos 5 a.a. que tienen la misma secuencia que una de las secuencias continuas indicadas anteriormente, pero en los que uno o dos a.a. son reemplazados, de manera conservadora, según se define este término más adelante. Los análogos comprenden también al menos un a.a. cargado positivamente en su extremo y, esencialmente, mantienen la actividad de los péptidos, según se define este término más adelante.

La expresión "mantiene esencialmente las características de unión" se refiere a un péptido cuyo nivel de unión a la muestra ensayada es al menos del 50%, preferentemente del 70%, más preferentemente del 90% o más del 100% del nivel de la unión del péptido a la misma muestra ensayada, según se determina mediante el mismo ensayo de unión.

Mediante una realización preferente, la invención proporciona un péptido que se une a una muestra de fluido corporal obtenida de un paciente esquizofrénico a un nivel sustancialmente más alto al de su unión a una muestra de fluido corporal obtenida de un individuo no esquizofrénico, siendo seleccionado dicho péptido de entre el grupo que consiste en:

- i. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1)
- ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2)
- iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3)
- iv. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4)

o análogos de dichos péptidos, en los que no más de dos a.a. son sustituidos, de una manera conservadora, manteniendo dichos análogos esencialmente las características de unión de los péptidos.

Mediante una realización más preferente, se proporciona un péptido que se une a las muestras de fluidos corporales obtenidas de un paciente esquizofrénico a un nivel esencialmente superior a su nivel de unión a una muestra de fluido corporal obtenida de un individuo no esquizofrénico, que tiene la secuencia de aminoácidos LVVGLCK (SEQ ID NO. 1).

Mediante un aspecto adicional de la invención, se proporciona un péptido que se une a una muestra corporal obtenida de un paciente esquizofrénico a niveles esencialmente superiores a los de su unión a una muestra obtenida de un individuo no esquizofrénico, en el que el péptido se une a anticuerpos que son capaces de unión específica a un péptido que tiene el aminoácido LVVGLCK. Varios ejemplos no limitativos de dichos péptidos son los siguientes:

- i. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2)
- ii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3)
- iii. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4)

o sus análogos, en los que no más de dos a.a. son reemplazados, de una manera conservadora, y que mantienen las características de unión de los péptidos.

Las letras de usadas anteriormente y a lo largo de la presente descripción, para indicar aminoácidos (a.a.) específicos están de acuerdo con los símbolos de a.a. de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

En vista del hecho de que los péptidos de la invención son los sitios de unión naturales putativos para los autoanticuerpos que se encuentran en niveles elevados en los fluidos corporales de pacientes esquizofrénicos, y debido a su alta pureza y alta actividad, estos péptidos son de lo más útil para el diagnóstico de la esquizofrenia. De esta manera, mediante un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ensayo para el diagnóstico de la esquizofrenia en un individuo, que comprende las etapas descritas en la reivindicación 6.

Mediante una realización preferente, el péptido de la etapa (b) es seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- i. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1)
- ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2)
- iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3)
- iv. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4)

o sus análogos, en los que no más de dos a.a. son reemplazados, de una manera conservadora, y que mantienen, esencialmente, las características de unión de dicho péptido.

Mediante una realización preferente, el péptido de la etapa (b) tiene la secuencia de aminoácidos LVVGLCK.

Mediante un aspecto adicional, los péptidos en la etapa (b) son tales que se unen a anticuerpos que se unen a péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos LVVGLCK o sus análogos.

5 El uso de los péptidos de la invención y sus análogos, según se ha definido anteriormente y se define más adelante, para la preparación de una composición de diagnóstico para el diagnóstico de la esquizofrenia en un individuo, está también dentro del ámbito de la presente invención.

10 Mediante un aspecto adicional, la invención proporciona un kit útil en el ensayo anterior, comprendiendo dicho kit un soporte que comprende uno o más péptidos de la invención inmovilizados sobre el mismo, un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (hlg) o un fragmento del mismo, o uno o más péptidos no basados, conjugados a un marcador detectable que se une a los anticuerpos presentes en la muestra ensayada, reactivos requeridos para llevar a cabo el ensayo de detección, en el que dichos péptidos se unen a los anticuerpos presentes en una muestra de ensayo, así como instrucciones para su uso.

15 Cuando la detección de la unión de los péptidos de la invención a la muestra ensayada es mediante un anticuerpo anti-hlg, el anticuerpo anti-hlg puede ser conjugado a un marcador detectable o, como alternativa, el kit puede comprender también un segundo tipo de anticuerpos dirigidos contra dichos primeros anticuerpos, en el que los segundos anticuerpos son conjugados a un marcador detectable.

20 Mediante una realización, la unión del péptido de la invención a la muestra ensayada se detecta mediante el uso de segundos péptidos no unidos, que forman complejos con un marcador detectable, siendo dichos segundos péptidos capaces de unirse a los anticuerpos presentes en la muestra ensayada. Según esta realización, la detección se consigue mediante un ensayo de tipo sándwich, de doble antígeno, que puede ser realizado como un ensayo de una etapa o como un ensayo de dos etapas. Cuando la detección se realiza mediante el ensayo de tipo sándwich, de doble antígeno, el kit de la invención incluirá dichos péptidos conjugados a un marcador detectable, en lugar del anticuerpo de anti-inmunoglobulina humana.

25 El ensayo de la invención puede ser usado como un único ensayo para la detección de una alta probabilidad de esquizofrenia en un individuo. Sin embargo, según un aspecto adicional de la invención, los péptidos y el ensayo pueden ser usados como una herramienta de confirmación de diagnóstico. De esta manera, por ejemplo, cuando se determina una alta probabilidad de esquizofrenia en un individuo, mediante los procedimientos usados hasta la fecha (principalmente evaluación psiquiátrica, tal como se ha indicado anteriormente), esto podría ser reiterado (o, alternativamente, re-evaluado) usando el ensayo de la invención.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 es una representación gráfica que muestra una presentación superficial de enolasa, que demuestra que el péptido de la técnica anterior no puede ser el sitio natural de unión para los autoanticuerpos. Como puede verse, sólo la arginina R402 (flecha) estará disponible para los anticuerpos de unión, donde la parte restante del péptido está enterrada dentro de la proteína.

35 La Fig. 2 es una representación gráfica del epítipo putativo de los péptidos de la invención, que consiste en seis aminoácidos neutros (L413, L183, L409, L406, P400 y A401), que están rodeados por cuatro aminoácidos cargados positivamente (R414, R402, R184 y K194).

La Fig.3 es una representación esquemática que muestra el nivel de la unión de las muestras de plasma de 39 pacientes esquizofrénicos (cuadrados rellenos) y 50 individuos no esquizofrénicos (cuadrados abiertos) con el péptido LVVGLCK biotinilado en un inmunoensayo enzimático.

40 La Fig. 4 es una representación esquemática que muestra una correlación inversa entre los valores de O.D. medidos en el inmunoensayo enzimático descrito anteriormente en muestras obtenidas de pacientes esquizofrénicos y la duración de la enfermedad en estos pacientes.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona péptidos cortos altamente purificados y altamente activos, que comprenden un epítipo putativo natural de los péptidos, al cual se unen los autoanticuerpos que se encuentran en niveles elevados en los pacientes esquizofrénicos. La corta longitud de estos péptidos (7-10 aminoácidos) y su estructura, que es una estructura, que puede estar expuesta en la superficie de la enzima enolasa de una manera que permite a los autoanticuerpos unirse a ella, hacen que estos péptidos sean de la mayor utilidad en el diagnóstico de la esquizofrenia. De esta manera, aunque los péptidos de la técnica anterior (WO 99/51725) eran capaces de unirse a autoanticuerpos presentes en niveles más altos en pacientes esquizofrénicos, en comparación con los individuos no esquizofrénicos, los péptidos de la presente invención, que tienen las características anteriores, permiten detectar, más efectivamente, un individuo que tiene una alta probabilidad de tener esquizofrenia.

- 5 La actividad de unión del péptido de la invención a diversos anticuerpos puede ser determinada mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en sí mismos, tales como ELISA o transferencia Western. Por ejemplo, un péptido ensayado puede ser analizado para su actividad de unión a anticuerpos sometiéndolo a electroforesis en gel de poliacrilamida, transfiriéndolo a membranas PVDS que se hacen reaccionar, a continuación, con una muestra de fluido corporal de la muestra ensayada, y se compara su reacción con una muestra obtenida de un individuo no esquizofrénico.
- 10 El grado de unión de los péptidos de la invención a PAA se puede determinar mediante el uso de cualquier sistema de detección conocido en la técnica, tales como los anticuerpos contra la inmunoglobulina humana o fragmentos de los mismos unidos a un marcador detectable. El marcador puede ser un grupo radiactivo, un grupo fluorescente, una enzima capaz de catalizar una reacción que proporciona un producto detectable, un grupo biotina capaz de ser detectado mediante avidina, etc.
- Mediante una realización preferente, el grado de unión de los péptidos de la invención a la muestra ensayada se realiza usando un inmunoensayo enzimático en el que los péptidos son marcados con biotina y son unidos a tubos revestidos de estreptavidina, tal como se explica a continuación.
- 15 Según la invención, se ha encontrado que la posición de la carga positiva en los péptidos puede ser o bien al principio o bien al final del péptido. Esto indica que los péptidos existen en una forma de anillo abierto. Además se ha encontrado que la cisteína no tiene importancia en la secuencia de los péptidos, ya que la sustitución de cisteína con metionina retuvo la actividad de los péptidos. De esta manera, tal como se ha explicado anteriormente, la secuencia continua de a.a. comprendida en el péptido de la invención consiste en un a.a. cargado positivamente en su extremo. Si la secuencia continua está en uno de los extremos del péptido total, este a.a. cargado positivamente estará en un extremo del péptido total. Como alternativa, si la secuencia continua no está al final del péptido total, el péptido total comprenderá una carga positiva adicional en uno de sus extremos.
- 20 Se sabe que el sitio de unión de los anticuerpos consta, normalmente, de al menos cinco aminoácidos. De esta manera, los péptidos de la invención y sus análogos comprenden al menos cinco aminoácidos. Los cinco aminoácidos serán los que aparecen de forma consecutiva en una de las secuencias continuas de la invención.
- 25 Con el objetivo de mantener las características de unión del péptido, los análogos de la invención comprenden no más de dos sustituciones de a.a., las cuales son sustituciones conservadoras. Estas son sustituciones en las que un aminoácido de una clase se sustituye por un aminoácido de la misma clase, donde una clase se define por las propiedades físico-químicas comunes de las cadenas de aminoácidos, tales como carga, tamaño o hidrofobicidad. Los aminoácidos de la misma clase se caracterizan por frecuencias de sustitución altas en proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza (tal como se determina, por ejemplo, por una matriz de intercambio de frecuencia Dayhoff estándar).
- 30 De esta manera, por ejemplo, la leucina posicionada en la primera posición de la secuencia de aminoácidos de un péptido de la invención puede ser sustituida, de manera conservadora, por los aminoácidos glicina o valina, que pertenecen a la misma familia de aminoácidos, sin alterar la actividad de unión del péptido. El a.a. cargado positivamente al final del péptido de la invención puede ser sustituido, de manera conservadora, por otro a.a. cargado positivamente. Una persona con conocimientos en la materia no tendrá ninguna dificultad para determinar por qué aminoácido puede ser reemplazado cada uno de los aminoácidos del péptido, según la agrupación conocida de aminoácidos en familias, tal como puede encontrarse, por ejemplo, en *Molecular Biology of the Cell* Editors Alberts B. et al., Garland Publishing, Inc., New York and London, 2ª edición, 1989, páginas 54-55.
- 35 Los péptidos de la invención también pueden ser modificados químicamente. En dicho péptido modificado químicamente, al menos uno de los residuos de aminoácidos puede ser modificado o bien por un proceso natural, tal como modificación post-traduccional o bien mediante técnicas de modificación química, que son bien conocidas en la materia. Ejemplos de modificaciones químicas son acetilaciones y glicosilaciones, glicosamina-glicinaciones, ADP-ribosilaciones, unión covalente de un lípido o un derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, fosforilación, etc. La modificación química puede ser en el extremo amino o en el extremo carboxi del péptido.
- 40 Los péptidos de la invención pueden tener además un componente no péptido unido, tal como por ejemplo, un grupo portador macromolecular que puede estar unido covalentemente al lado amino o carboxi del péptido. Dicho portador puede ser, por ejemplo, polietilenglicol, carbohidratos o lípidos de ácidos grasos conjugados.
- Todo lo indicado anteriormente describe cambios en los péptidos de la invención que pueden resultar en una mayor estabilidad, biodisponibilidad o actividad de los péptidos de la invención.
- 50 El péptido de la invención puede ser obtenido por digestión enzimática (por ejemplo, usando Clostrapain) o digestión química (CNBr) de una proteína más larga. En tal caso, los péptidos resultantes son separados mediante procedimientos conocidos en la materia, tales como mediante RP-HPLC y, a continuación, los péptidos separados pueden ser utilizados para una secuenciación (por ejemplo, Eurosequence b.v. (Nijenborgh 4, 9749 Gronigen, The Netherlands)) y analizados para su capacidad de unión a los anticuerpos, tal como se ha descrito anteriormente.

La corta longitud de los péptidos de la invención (de 5 a 10 a.a.) los convierte en muy buenos candidatos a sintetizar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como en Abimed 522 a escala 10 μmol mediante Eurosequence b.v. (véase la explicación detallada en los ejemplos siguientes). La actividad de unión de los péptidos recién sintetizados se determinará utilizando cualquiera de los ensayos indicados anteriormente.

- 5 Otras ventajas de la presente invención, que se basa en el hecho de que los péptidos de la invención son péptidos cortos, purificados y activos, es que la muestra de "*fluido corporal*" del individuo a ensayar puede ser una muestra de plasma sanguíneo o suero, que es relativamente fácil de obtener y preparar. Sin embargo, a veces puede ser ventajoso realizar el ensayo de la invención en una muestra sanguínea del individuo ensayado, que es una fracción que contiene PAA obtenida de la muestra mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, tales como obteniendo un plasma rico en plaquetas y aislando PAA del mismo. Según la invención, la muestra puede ser también cualquier otra muestra de fluido corporal obtenida del individuo ensayado, incluyendo una muestra de sangre completa, o cualquier otra muestra de fluido corporal que contenga PAA, por ejemplo, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc. Análisis clínicos, así como los ensayos de inmunoreactividad según la invención, mostraron que el péptido que tenía la secuencia de aminoácidos LVVGLCK tenía la pureza más alta de la síntesis y podría formar dímeros, de manera espontánea, duplicando, de esta manera, el epítipo por sitio de unión de estreptavidina y mejorando el potencial de unión de PAAs a este péptido. Por lo tanto, según la invención, un péptido que tiene la secuencia anterior o un péptido que comprende esta secuencia son preferentes para su uso en el diagnóstico de esquizofrenia, según la invención.

EJEMPLOS

Ahora, la invención se mostrará mediante los Ejemplos no limitativos siguientes, con referencia las figuras.

Materiales y procedimientos

1. **Pacientes y personas de control** - Treinta y nueve pacientes esquizofrénicos participaron en este estudio. Se registraron los parámetros siguientes: sexo, edad, duración de la esquizofrenia, número de hospitalizaciones, años de educación y estado psiquiátrico (PANSS). Se obtuvieron cincuenta muestras de plasma de un banco de sangre local.
2. **Plasma** - Se recogió sangre venosa con heparina como coagulante de los pacientes y sujetos de control. El plasma fue obtenido después de una centrifugación (4.000 g; 15 mins., 4° C).
3. **Síntesis de péptido y marcado con biotina** - Los péptidos fueron sintetizados en un Abimed 522 a una escala de 10 micromoles mediante Eurosequence b.v. (Nijenborgh 4:9747 AG Groningen, The Netherlands) y fueron marcados en el terminal amino con biotina que contenía un separador de seis carbonos. La pureza del péptido fue evaluada, de forma rutinaria, mediante RP-HPLC y, cuando se consideró necesario, mediante espectroscopia de masas con desorción con láser. Los péptidos fueron disueltos, de forma rutinaria, en 1 ml de agua/DMF/DMSO (1:1:1; v/v/v).
4. **Transferencia en línea** - Los péptidos fueron transferidos en línea sobre membranas PVDF o nitrocelulosa. Unas tiras de las membranas fueron incubadas durante la noche con 0,5 ml de muestra de plasma en 0,5 ml de tampón (200 mM Tris, 0,3% de caseína; 200 mM KCl, 10,6 mM de fenol, 2,1 mM CaCl_2 , 0,01% de Triton X-100, pH 8,5) a temperatura ambiente, bajo agitación suave, en las matrices de incubación BioRad. Después de tres lavados con PBS, las tiras fueron ensayadas con anti-Fc humana (cabra) conjugada con peroxidasa de rábano (SIGMA, dilución 1:100) durante 2 horas a temperatura ambiente, bajo agitación suave. Se usaron Fast-DABTM o 4-cloro-naftol (SIGMA) como reactivo de color para detectar anticuerpos unidos.
5. **Inmunoensayo enzimático** - Unos tubos revestidos de estreptavidina (Boehringer Mannheim, 80 nMol de estreptavidina por tubo) fueron revestidos con un incremento diez veces superior de péptido marcado con biotina en 1 ml de PBS durante 3 días a 4°C, fueron lavados dos veces con 2 ml 1M NaCl, una vez con 2 ml de agua, fueron secados y almacenados bajo vacío a menos 18°C hasta su uso. Para el ensayo, 0,05 ml de muestra y 1 ml de tampón de incubación (60 mM de ácido cítrico, 90 mM de Na_2HPO_4 , 168 mM de NaOH, 200 mM de NaCl, pH 7.7) fueron añadidos al tubo marcado con péptido y se incubó durante 1 hora a 37°C, sin agitación. Los tubos fueron revestidos con el fin de prevenir la evaporación. A continuación, los tubos fueron lavados tres veces con 2 ml de una solución de 1 M NaCl durante 15 min., bajo agitación suave, 1 ml Anti-Fc humana (cabra) conjugado con peroxidasa de rábano (SIGMA) añadido a una dilución de 1:2000 en tampón de POD (200 mM Tris, 0,3% de caseína, 200 mM KCl, 10,6 mM de fenol, 2,1 mM CaCl_2 , 0.01% de Triton X-100, pH 8,0) y se incubó durante 0,5 horas a 37°C, sin agitación. Después de cuatro lavados con 2 ml de una solución de 1M NaCl, la reacción de color se inició añadiendo 1 ml de Tetrametilbenzidina (TMB) Liquid Substrate SystemTM (SIGMA). La reacción enzimática se detuvo añadiendo 1 ml de 0,5M H_2SO_4 . La absorbancia fue leída espectrofotométricamente a 450 nm.

Ejemplo 1:

Cuatro péptidos según la invención, que tienen una de las secuencias de a.a.:

(a) LVVGLCK

(b) KLVVGLC

5 (c) LVVGLMK

(d) KLVVGLM

fueron marcados con biotina y fueron aplicados sobre tubos revestidos con estreptavidina, tal como se ha descrito anteriormente. Se preparó una colección de muestras de plasma a partir de 5 pacientes esquizofrénicos y se preparó una reserva adicional de plasma a partir de 5 individuos no esquizofrénicos.

10 **Resultados:**

La totalidad de los cuatro péptidos de la invención se unieron a la colección de plasma procedente de pacientes esquizofrénicos en un grado más alto al de su unión a la muestra de plasma de control obtenida de individuos no esquizofrénicos (según se midió en el inmunoensayo enzimático descrito anteriormente, que mostró una O.D. de 0,5 en las muestras de los péptidos con las muestras de plasma de control y O.D. de 1,6 en las muestras de los péptidos con la colección de plasma derivada de esquizofrenia).

15

Ejemplo 2: Diagnóstico de la esquizofrenia usando el péptido LVVGLCK

De los cuatro péptidos de la invención, la pureza más alta de la síntesis se encontró en el péptido LVVGLCK. Además, se encontró que estos péptidos forman dímeros espontáneamente, duplicando, de esta manera, el epítipo para el sitio de unión de estreptavidina.

20 Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento con LVVGLCK-biotina, de la siguiente manera: el péptido fue marcado con biotina y fue aplicado sobre tubos revestidos de estreptavidina, tal como se ha explicado anteriormente. Muestras de plasma de 39 pacientes esquizofrénicos y 50 individuos no esquizofrénicos de control fueron ensayadas con el péptido aplicado y el nivel de unión fue determinado mediante el inmunoensayo enzimático descrito anteriormente.

25 Tal como se ve en la Fig. 3, el péptido LVVGLCK biotinilado se unió en un mayor grado a las muestras de plasma obtenidas de pacientes esquizofrénicos (cuadrados rellenos), a un valor medio y una desviación estándar de $1,47 \pm 0,65$, en comparación con su unión a las muestras de plasma de individuos no esquizofrénicos (cuadrados abiertos), con un valor medio y una desviación estándar de $0,46 \pm 0,21$. La diferencia de unión de este péptido a los dos grupos fue estadísticamente muy significativa ($1,1 \times 10^{-11}$ usando el ensayo T de Student).

30 **Ejemplo 3: Análisis de la esquizofrenia en base al péptido de la invención en comparación con un análisis psiquiátrico aceptable**

Mediante un análisis adicional de los resultados descritos en el Ejemplo 2 anterior, con otros parámetros psiquiátricos registrados de los pacientes, se encontró una correlación inversa entre la duración de la esquizofrenia y el nivel de unión al péptido de la invención, medido como densidad óptica (O.D.). Se aplicó un ajuste geométrico ($y = ax^{bx}$), con $a = 1,9376$ y $b = 0,000798$ como coeficientes (Fig. 4). Resumiendo las Figs. 3 y 4, los resultados siguientes, mostrados en la Tabla 1 siguiente, se pueden alcanzar mediante la comparación del ensayo bioquímico con la evaluación psiquiátrica.

35

Tabla 1

Evaluación psiquiátrica		Ensayo bioquímico			
		1-15 años de enfermedad	16-30 años de enfermedad	1-30 años de enfermedad	Controles
Nº de individuos ensayados	N = 39	N = 23	N = 16	N = 39	N = 50
Esquizofrénicos:	39	19	7	26	0
Límite:	0	1	6	7	6
Negativos:	0	3	3	6	44

Esto tiene en consideración las siguientes definiciones:

Negativo: 0 hasta media + 1s

5 Límite: Entre media + 1s hasta media + 2s

Positivo: Superiores a la media + 2s

En conclusión, una sensibilidad de más del 80% y una especificidad de más del 90% parecen ser factibles. Sin embargo, cabe señalar que estas definiciones son arbitrarias y, por tanto, pueden cambiarse dependiendo de si se hace más hincapié en la especificidad o en la sensibilidad.

REIVINDICACIONES

1. Péptido que se une a una muestra de fluido corporal obtenida de un paciente esquizofrénico, en un nivel esencialmente más alto que su unión a una muestra de fluido corporal obtenida de un individuo no esquizofrénico, siendo dicho péptido de no más de 10 aminoácidos (a.a.) de largo y comprendiendo una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 5 i. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1);
 ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2);
 iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3); y
 iv. KLVVGLM (SEQ ID NO.4);

10 en el que dicha secuencia consiste en al menos un a.a. cargado positivamente en un extremo de dicha secuencia; y en el que dicho péptido comprende al menos un a.a. cargado positivamente en su extremo, siendo el a.a. cargado positivamente de dicha secuencia.

2. Péptido según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- i. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1);
 ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2);
 15 iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3); y
 iv. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4).

3. Péptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos LVVGLCK (SEQ ID NO. 1).

20 4. Péptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido se une a anticuerpos que son capaces de unión específica a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos LVVGLCK (SEQ ID NO. 1).

5. Péptido según la reivindicación 4, que tiene la secuencia de aminoácidos KLVVGLC (SEQ ID NO. 2), LVVGLMK (SEQ ID NO. 3) o KLVVGLM (SEQ ID NO. 4).

6. Ensayo para el diagnóstico de esquizofrenia en un individuo, que comprende las etapas siguientes:

25 (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal de un individuo con un péptido de no más de 10 aminoácidos (a.a.) de largo y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- i. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1);
 ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2);
 iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3); y
 iv. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4);

30 en el que dicha secuencia consiste en al menos un a.a. cargado positivamente en un extremo de dicha secuencia, y en el que dicho péptido comprende al menos un a.a. cargado positivamente en su extremo, siendo el a.a. cargado positivamente de dicha secuencia; y en el que dicha muestra de fluido corporal es una muestra de sangre, una fracción de la misma que contiene PAA, o una fracción que contiene anticuerpos asociados a plaquetas (PAA) derivados de las plaquetas; y

35 (b) determinar el nivel de unión de dicho péptido a dicha muestra, un nivel esencialmente más alto que el nivel de unión de dicho péptido a una muestra obtenida de un individuo no esquizofrénico, lo que indica que dicho individuo ensayado tiene una alta probabilidad de tener esquizofrenia.

7. Ensayo según la reivindicación 6, en el que el péptido de la etapa (b) es seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- 40 ii. LVVGLCK (SEQ ID NO. 1);
 ii. KLVVGLC (SEQ ID NO. 2);

iii. LVVGLMK (SEQ ID NO. 3); y

iv. KLVVGLM (SEQ ID NO. 4).

8. Ensayo según la reivindicación 6, en el que el péptido de la etapa (a) tiene la secuencia de aminoácidos LVVGLCK (SEQ ID NO. 1).

5 9. Ensayo según la reivindicación 6, en el que el péptido en la etapa (a) es tal que se une a los anticuerpos que se unen a péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos LVVGLCK (SEQ ID NO. 1).

10 10. Kit para su uso en el diagnóstico de la esquizofrenia, que comprende un soporte que comprende uno o más péptidos según la reivindicación 1, inmovilizados sobre el mismo, anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (hIg) o un fragmento del mismo, reactivos que llevan a cabo un ensayo de detección, mediante el cual dichos péptidos se unen a los anticuerpos presentes en una muestra ensayada, así como instrucciones de uso.

11. Kit según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo anti-hIg forma un complejo con un marcador detectable.

12. Kit según la reivindicación 10, en el que en lugar de dicho anticuerpo anti-hIg, el kit comprende uno o más péptidos no unidos que se unen a los anticuerpos presentes en una muestra ensayada, dichos péptidos formando complejos con un marcador detectable.

15 13. Uso de cualquiera de los péptidos según la reivindicación 1 para la preparación de una composición de diagnóstico para el diagnóstico de esquizofrenia en un individuo.

14. Ensayo según la reivindicación 6, para su uso en la confirmación de una alta probabilidad de esquizofrenia en un individuo, determinada mediante al menos otro ensayo diagnóstico.

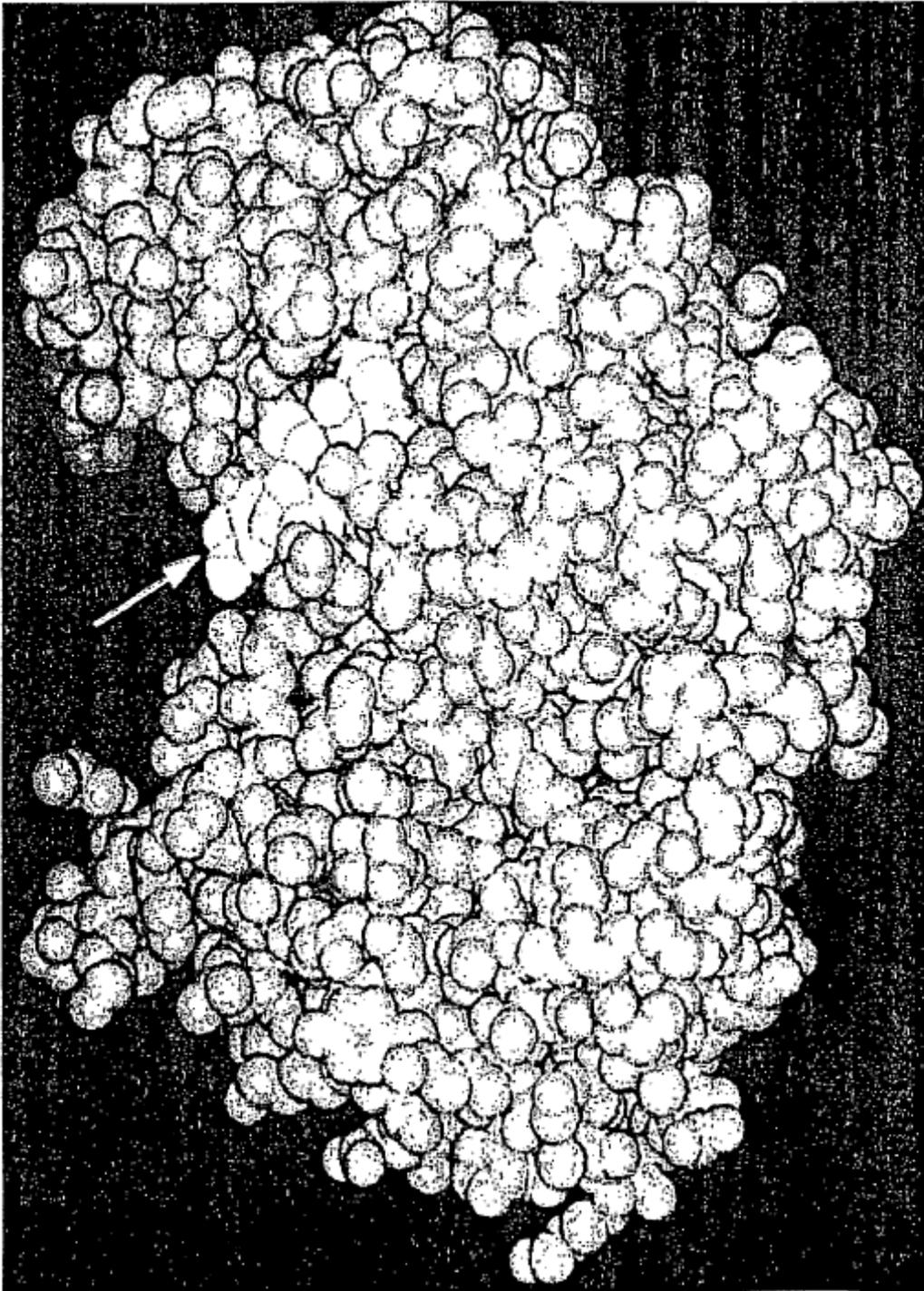


FIG.1

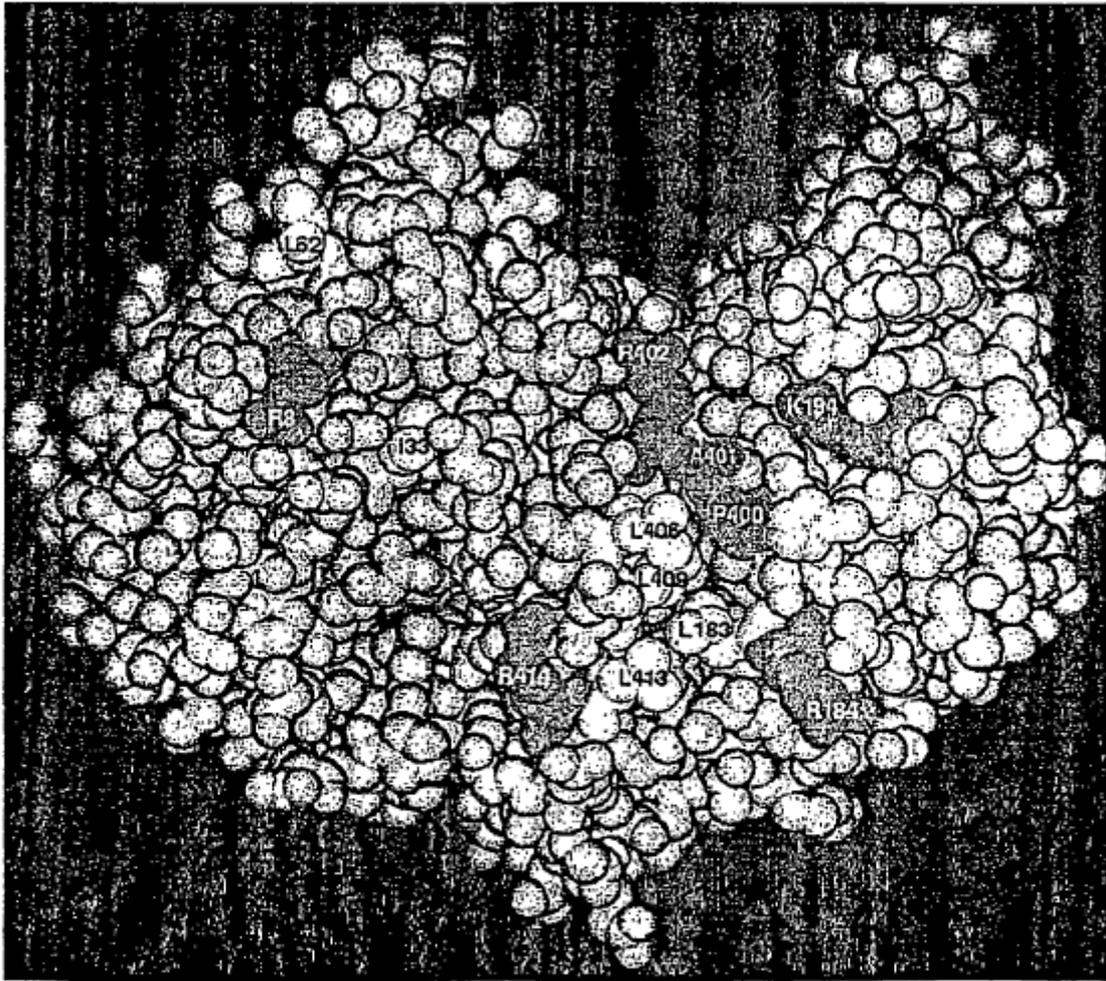


FIG.2

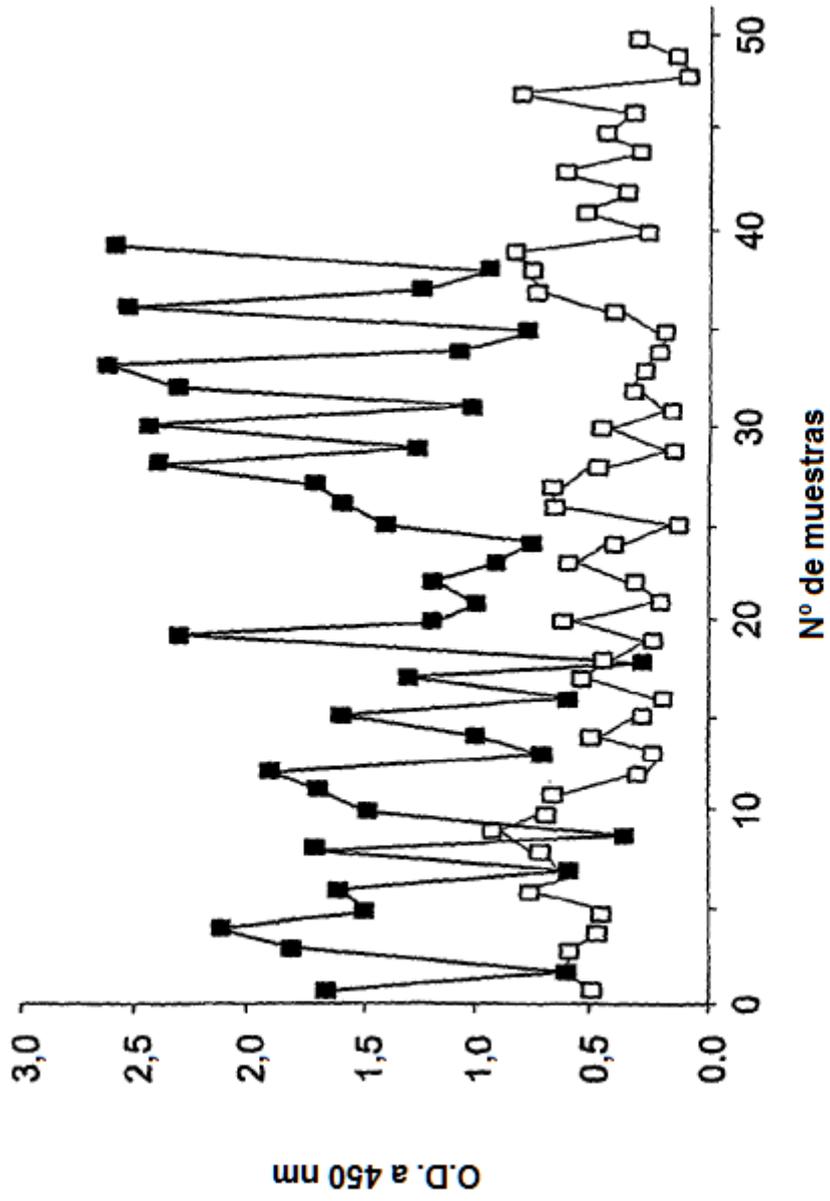


FIG. 3

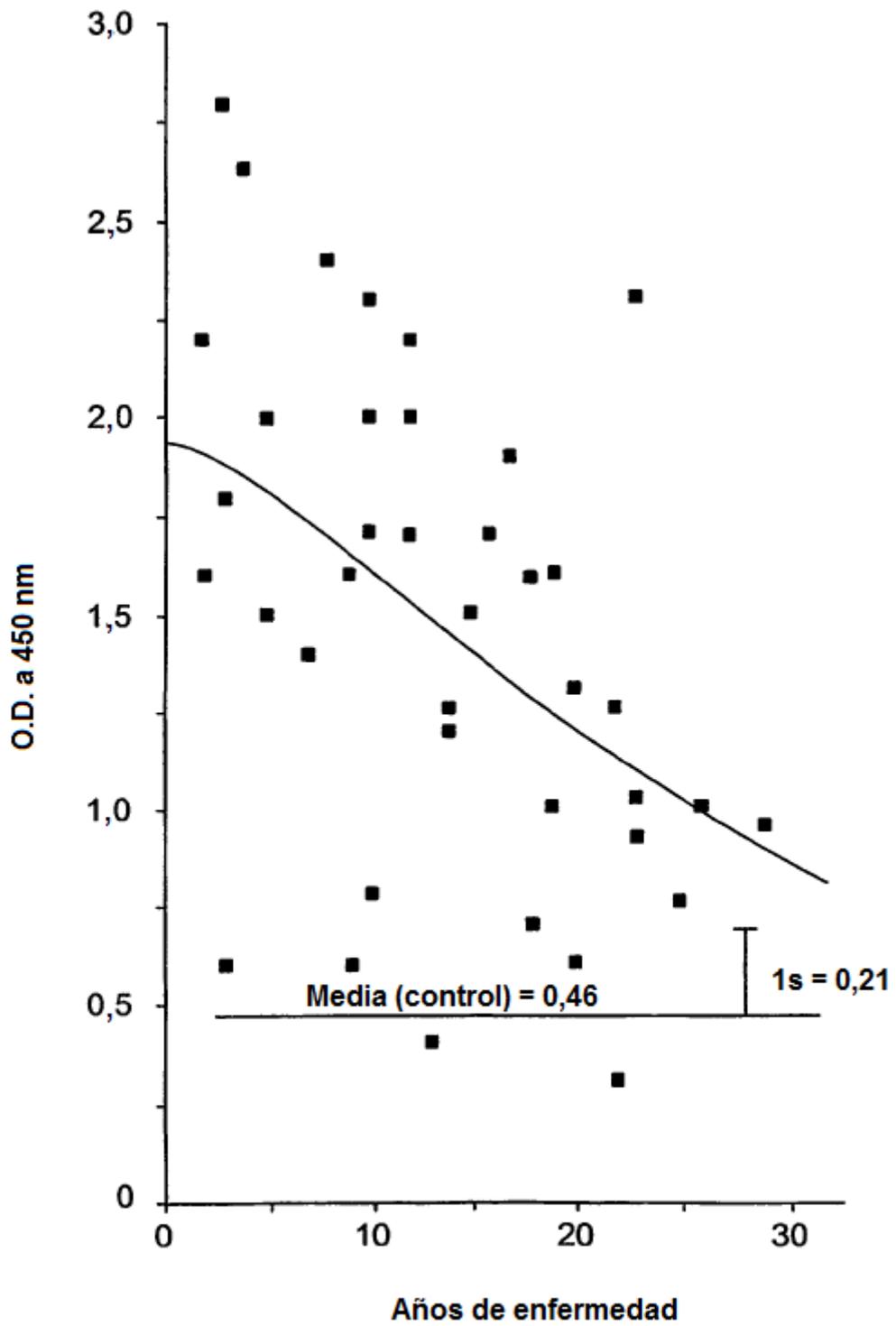


FIG. 4