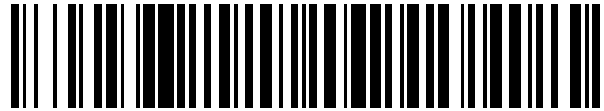


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 123**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2009 E 09744181 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2359142**

54 Título: **Importina 9 como biomarcador para la esquizofrenia**

30 Prioridad:

10.10.2008 GB 0818660

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

21.10.2013

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools Trinity Lane
Cambridge Cambridgeshire CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**LEVIN, YISHAI;
WANG, LAN y
BAHN, SABINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 123 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

Importina 9 como biomarcador para la esquizofrenia

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar o monitorizar la esquizofrenia o una predisposición a ella.

Antecedentes de la invención

La esquizofrenia es una enfermedad neuropsiquiátrica polifacética con una aparición y etiología impulsadas por una compleja interacción de factores genéticos, de desarrollo, nutricionales y ambientales. Afecta al menos al 1% de la población mundial y cuesta cientos de miles de millones de dólares en atención sanitaria e ingresos perdidos.

10 El diagnóstico actual de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos es subjetivo, debido al amplio espectro de síntomas, su superposición con otros trastornos y la falta de ensayos empíricos específicos de la enfermedad. Una mayor comprensión de las vías moleculares afectadas sería un paso importante hacia la mejora de las pruebas diagnósticas, el desarrollo de nuevos tratamientos pre-sintomáticos y la evaluación de la eficacia de intervenciones preventivas.

15 El documento WO 2008/090319 describe un método de diagnóstico o monitorización de un trastorno psicótico o la predisposición a él, que comprende medir, en una muestra tomada de un sujeto, el nivel de un biomarcador seleccionado de precursor de clusterina, inhibidor de la inter- α -tripsina, IgM, apolipoproteína A2 y glicoproteína alfa-2-HS. El documento WO 2008/107700 describe el uso de un biomarcador peptídico que es una α -defensina, o uno de sus fragmentos, como un biomarcador para la esquizofrenia o un trastorno depresivo importante, o para la predisposición a ellos.

20 Sumario de la invención

Utilizando una plataforma de proteómica global basada en tecnología nano-LC-MS/MS mono- y bi-dimensional se han identificado biomarcadores proteínicos de enfermedades para la esquizofrenia. Se realizaron dos estudios, utilizando muestras de suero tomadas de pacientes en los que se había detectado por primera vez la esquizofrenia y que no habían recibido tratamiento con fármacos y controles sanos.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención comprende el uso *in vitro* de importina 9 como un biomarcador para la esquizofrenia, o para la predisposición a ella. En una realización, la invención comprende adicionalmente el uso de uno o más péptidos adicionales seleccionados de NALP8, proteína S dependiente de la vitamina K, alfa-1-antiquimotripsina, lumican, helicasa, relacionado con haptoglobina, miembro 1B de la familia C similar a ANKRD26, proteína 2B que contiene el dominio AAA de la familia de la ATPasa, proteína C9orf93 no caracterizada, globulina de unión a tiroxina, miembro A1 de la familia que contiene el dominio mano EF, semialdehído sintasa alfa-aminoadípica mitocondrial, 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma-1, carboxipeptidasa 2 citosólica, alfa-1-antiquimotripsina, proteína FLJ36157 no caracterizada, atractina, rootletin, componente 7 del complemento, afamina, proteína similar a la quinesina, poli[ADP-ribosa]polimerasa 1 (PARP1), región de la cadena C de Ig gamma-1, paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica, cadena H2 pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina, cadena H4 pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína C-III, proteína de zona del embarazo, cofactor 2 de la heparina, subcomponente C1r del complemento, como un biomarcador para la esquizofrenia o para la predisposición a ella.

En una realización, la invención comprende adicionalmente el uso de uno o más péptidos adicionales seleccionados de proteína ligasa E3 de ubiquitina LRSAM1, Ig mu, factor 13 de coagulación, apolipoproteína C1, apolipoproteína D, serina/treonina-proteína quinasa, miembro 6 de la subfamilia B del casete de unión a ATP mitocondrial, proteína ligasa E3 de ubiquitina, haptoglobina, proteína 2 que contiene el dominio AAA de la familia de la ATPasa, cadena beta de espectrina eritrocítica, proteína de la matriz oligomérica del cartílago, proteína C de unión a manosa, integrina beta-3, proteína 2 asociada a microtúbulos, catepsina L2, factor B del complemento, componente 5 del complemento, vitronectina, proteína S, clusterina (ApoJ), proteína 2 de unión a hialuronano y DNA-topoisomerasa 2-alfa, como un biomarcador para la esquizofrenia o para la predisposición a ella.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención es un método para diagnosticar o monitorizar la esquizofrenia, o la predisposición a ella, que comprende detectar y/o cuantificar, en una muestra de un sujeto de ensayo, uno o más de los biomarcadores peptídicos enumerados anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención es un método de monitorización de la eficacia de una terapia en un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está predispuesto, a esquizofrenia, que comprende detectar y/o cuantificar, en una muestra de dicho sujeto, uno o más de los biomarcadores peptídicos enumerados anteriormente.

Un aspecto adicional de la invención proporciona ligandos, tales como compuestos de origen natural o sintetizados químicamente, capaces de unirse específicamente al biomarcador peptídico. Un ligando de acuerdo con la invención

puede comprender un péptido, un anticuerpo o uno de sus fragmentos, o un aptámero u oligonucleótido, capaz de unirse específicamente al biomarcador peptídico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, o uno de sus fragmentos, capaz de unirse específicamente al biomarcador peptídico. Un ligando de acuerdo con la invención se puede marcar con un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente o radiactivo; alternativa o adicionalmente un ligando de acuerdo con la invención se puede marcar con una etiqueta de afinidad, por ejemplo, una etiqueta de biotina, avidina, estreptavidina o His (por ejemplo, hexa-His).

Un biosensor según la invención puede comprender el biomarcador peptídico o uno de sus compuestos miméticos estructurales/conformacionales capaces de unirse específicamente a un anticuerpo contra el biomarcador peptídico. También se proporciona una matriz que comprende un ligando o compuesto mimético como se describe en la presente memoria.

La invención proporciona también el uso de uno o más ligandos como se describen en la presente memoria, que pueden ser de origen natural o sintetizados químicamente, y son adecuadamente un péptido, un anticuerpo o uno de sus fragmentos, un aptámero u oligonucleótido, o el uso de un biosensor de la invención, o una matriz de la invención, o un kit de la invención para detectar y/o cuantificar el péptido. En estos usos, la detección y/o cuantificación se pueden realizar en una muestra biológica, tal como del grupo que consiste en líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre completa, suero sanguíneo, plasma, orina, saliva u otro fluido corporal, aliento, por ejemplo, aliento condensado o uno de sus extractos o purificaciones o diluciones.

Se proporcionan kits de diagnóstico o de monitorización para realizar los métodos de la invención. Dichos kits comprenden adecuadamente un ligando de acuerdo con la invención, para la detección y/o cuantificación del biomarcador peptídico y/o un biosensor y/o una matriz como se describen en la presente memoria, opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de un kit para monitorizar o diagnosticar la esquizofrenia, en el que dicho kit comprende un biosensor que detecta y/o cuantifica el biomarcador como se describe en la presente memoria, en el que dicho biosensor comprende un ligando capaz de unirse específicamente al biomarcador como se describe en la presente memoria.

Los biomarcadores para la esquizofrenia u otros trastornos psicóticos son dianas esenciales para el descubrimiento de nuevas dianas y moléculas de fármacos que retardan o detienen la progresión del trastorno. Puesto que el nivel del biomarcador peptídico es indicativo del trastorno y de la respuesta al fármaco, el biomarcador es útil para la identificación de nuevos compuestos terapéuticos en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. Los biomarcadores de la invención se pueden emplear en métodos para el cribado de compuestos que modulen la actividad del péptido.

Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un ligando, tal como se ha descrito, que puede ser un péptido, un anticuerpo o uno de sus fragmentos, o un aptámero u oligonucleótido de acuerdo con la invención; o el uso de un biosensor de acuerdo con la invención o una matriz de acuerdo con la invención; o un kit de acuerdo con la invención, para identificar una sustancia capaz de promover y/o suprimir la generación del biomarcador.

También se proporciona un método para identificar una sustancia capaz de promover o suprimir la generación del péptido en un sujeto, que comprende administrar una sustancia de ensayo a un animal sujeto y detectar y/o cuantificar el nivel del biomarcador peptídico presente en una muestra de ensayo del sujeto.

Descripción de la invención

El término "biomarcador" significa un indicador obtenido biológicamente o biológico distintivo de un proceso, episodio o estado. Se pueden utilizar biomarcadores peptídicos en métodos de diagnóstico, por ejemplo, cribado clínico y evaluación del pronóstico y en la monitorización de los resultados de la terapia, la identificación de pacientes con más probabilidades de responder a un tratamiento terapéutico particular, el cribado y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y sus usos son valiosos para la identificación de tratamientos con nuevos fármacos y para el descubrimiento de nuevas dianas para el tratamiento con fármacos. Los biomarcadores peptídicos descritos en la presente memoria también pueden estar en forma de "precursor".

Las referencias en la presente memoria a "otro trastorno psicótico" se refieren a cualquier trastorno psicótico apropiado de acuerdo con *DSM-IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edition, American Psychiatric Assoc, Washington, DC, 2000. En una realización particular, el otro trastorno psicótico es un trastorno psicótico relacionado con la esquizofrenia. Los ejemplos de trastornos psicóticos relacionados con la esquizofrenia incluyen trastorno psicótico breve, trastorno delirante, trastorno psicótico debido a un estado morbo general, trastorno esquizoeficaz, trastorno esquizofreniforme y trastorno psicótico inducido por sustancias.

Como se usa en la presente memoria, el término "biosensor" significa cualquier compuesto capaz de detectar la presencia del biomarcador. Ejemplos de biosensores se describen en la presente memoria.

Biosensores de acuerdo con la invención pueden comprender un ligando o ligandos, como se describe en la presente memoria, capaces de unirse específicamente al biomarcador peptídico. Dichos biosensores son útiles para detectar y/o cuantificar un péptido de la invención.

5 En la presente memoria se describen kits de diagnóstico para el diagnóstico y monitorización de la esquizofrenia. Preferiblemente, dichos kits contienen un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar un biomarcador peptídico.

Los métodos de monitorización de la invención se pueden utilizar para monitorizar la aparición, la progresión, la estabilización, la mejoría y/o la remisión.

10 En los métodos de diagnóstico o de monitorización de acuerdo con la invención, la detección y/o cuantificación del biomarcador peptídico en una muestra biológica de un sujeto de ensayo se puede realizar en dos o más ocasiones. Se pueden hacer comparaciones entre el nivel de biomarcador en muestras tomadas en dos o más ocasiones. Se puede realizar la evaluación de cualquier cambio en el nivel del biomarcador peptídico en muestras tomadas en dos o más ocasiones. La modulación del nivel del biomarcador peptídico es útil como un indicador del estado de la esquizofrenia o de la predisposición a ella. Un aumento del nivel del biomarcador con el tiempo es indicativo de la aparición o progresión, es decir, empeoramiento de este trastorno, mientras que una disminución del nivel del biomarcador peptídico indica la mejoría o remisión del trastorno, o viceversa.

15 Un método de diagnóstico o de monitorización de acuerdo con la invención puede comprender la cuantificación del biomarcador peptídico en una muestra biológica de ensayo de un sujeto de ensayo y la comparación del nivel del péptido presente en dicha muestra de ensayo con uno o más controles.

20 El control utilizado en un método de la invención puede ser uno o más controles seleccionados del grupo que consiste en: el nivel de biomarcador peptídico encontrado en una muestra de control normal de un sujeto normal, un nivel normal del biomarcador peptídico; un intervalo normal del biomarcador peptídico, el nivel en una muestra de un sujeto con esquizofrenia u otro trastorno psicótico, o una predisposición a él diagnosticada; esquizofrenia u otro nivel de biomarcador peptídico de un trastorno psicótico o esquizofrenia u otro intervalo de biomarcador peptídico de un trastorno psicótico.

25 Un método preferido para el diagnóstico de la esquizofrenia o de la predisposición a ella, comprende:

- (a) cuantificar la cantidad del biomarcador peptídico en una muestra biológica de ensayo; y
- (b) comparar la cantidad de dicho péptido en dicha muestra de ensayo con la cantidad presente en una muestra biológica normal de control de un sujeto normal.

30 Un nivel más alto del biomarcador peptídico en la muestra de ensayo con relación al nivel del control normal es indicativo de la presencia de esquizofrenia, o la predisposición a ella; un nivel del péptido equivalente o inferior en la muestra de ensayo con relación al nivel del control normal es indicativo de la ausencia de esquizofrenia y/o ausencia de una predisposición a ella.

35 El término "diagnóstico", tal como se utiliza en la presente memoria, abarca la identificación, confirmación y/o caracterización de la esquizofrenia, o la predisposición a ella. Por predisposición se entiende que un sujeto no presenta actualmente el trastorno, pero puede verse afectado por el trastorno con el tiempo. Los métodos de monitorización y de diagnóstico de acuerdo con la invención son útiles para confirmar la existencia de un trastorno, o la predisposición a él; para monitorizar el desarrollo del trastorno por la evaluación de la aparición y progresión, o para evaluar la mejoría o la regresión del trastorno. Los métodos de monitorización y de diagnóstico también son útiles en los métodos para evaluación del cribado clínico, el pronóstico, la elección de la terapia, la evaluación del beneficio terapéutico, es decir, para el cribado y desarrollo de fármacos.

40 Los métodos eficaces de diagnóstico y monitorización proporcionan "soluciones a los paciente" muy convincentes con el potencial de mejorar el pronóstico, estableciendo el diagnóstico correcto, permitiendo una rápida identificación del tratamiento más adecuado (disminuyendo, por tanto, la exposición innecesaria a efectos secundarios nocivos de los fármacos), reduciendo los índices de "periodo de inactividad" y de recaída.

45 También se proporciona un método de monitorización de la eficacia de una terapia para la esquizofrenia en un sujeto que tiene dicho trastorno, que se sospecha que tiene dicho trastorno o que está predispuesto a él, que comprende detectar y/o cuantificar el péptido presente en una muestra biológica de dicho sujeto. En los métodos de monitorización, las muestras de ensayo se pueden tomar en dos o más ocasiones. El método puede comprender además comparar el nivel del(de los) biomarcador(es) presente(s) en la muestra de ensayo con uno o más controles y/o con una o más muestras de ensayo previas tomadas anteriormente del mismo sujeto de ensayo, por ejemplo, antes del comienzo de la terapia y/o del mismo sujeto de ensayo en una etapa anterior a la terapia. El método puede comprender detectar un cambio en el nivel del(de los) biomarcador(es) en las muestras de ensayo tomadas en diferentes ocasiones.

55 La invención proporciona un método para monitorizar la eficacia de la terapia para la esquizofrenia en un sujeto, que comprende:

(a) cuantificar la cantidad del biomarcador peptídico; y

(b) comparar la cantidad de dicho péptido en dicha muestra de ensayo con la cantidad presente en uno o más controles y/o una o más muestras de ensayo previas tomadas en un momento anterior del mismo sujeto de ensayo.

5 Una disminución del nivel del biomarcador peptídico en la muestra de ensayo con relación al nivel en una muestra de ensayo previa tomada anteriormente del mismo sujeto de ensayo es indicativa de un efecto beneficioso, por ejemplo, la estabilización o mejoría, de dicha terapia sobre el trastorno, sospecha de trastorno o predisposición a él.

10 Se pueden usar métodos de monitorización de la eficacia de una terapia para monitorizar la eficacia terapéutica de las terapias existentes y nuevas terapias en seres humanos y en animales no humanos (por ejemplo, en modelos animales). Estos métodos de monitorización se pueden incorporar en los cribados de nuevas sustancias farmacéuticas y combinaciones de sustancias.

15 Adecuadamente, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras de un sujeto sometido a diagnóstico o monitorización será 3 días, 5 días, una semana, dos semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 o 12 meses. Se pueden tomar muestras antes y/o durante y/o después de una terapia anti-depresiva. Se pueden tomar muestras a intervalos durante el resto de la vida, o parte de ella, de un sujeto.

20 El término "detección" como se usa en la presente memoria significa confirmar la presencia del biomarcador peptídico presente en la muestra. La cuantificación de la cantidad del biomarcador presente en una muestra puede incluir la determinación de la concentración del biomarcador peptídico presente en la muestra. La detección y/o cuantificación se pueden realizar directamente en la muestra, o indirectamente en uno de sus extractos, o en una de sus diluciones.

En aspectos alternativos de la invención, la presencia del biomarcador peptídico se evalúa por la detección y/o cuantificación de anticuerpos, o uno de sus fragmentos, capaces de unirse específicamente al biomarcador que son generados por el cuerpo de un sujeto en respuesta al péptido y por lo tanto están presentes en una muestra biológica de un sujeto que tiene esquizofrenia o una predisposición a ella.

25 La detección y/o cuantificación se pueden realizar mediante cualquier método adecuado para identificar la presencia y/o cantidad de una proteína específica en una muestra biológica de un paciente o una purificación o extracto de una muestra biológica o una de sus diluciones. En los métodos de la invención, la cuantificación se puede realizar midiendo la concentración del biomarcador peptídico en la muestra o muestras. Las muestras biológicas que pueden ser analizadas en un método de la invención incluyen líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre completa, suero sanguíneo, plasma, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, líquido lacrimal, líquido sinovial, esputo), aliento, por ejemplo, aliento condensado, o uno de sus extractos o purificaciones, o de sus diluciones. Las muestras biológicas también incluyen homogeneizados de tejidos, cortes de tejidos y muestras de biopsia de un sujeto vivo, o tomadas post-mortem. Las muestras se pueden preparar, por ejemplo, diluyéndolas o concentrándolas adecuadamente y almacenándolas en la forma habitual.

35 La detección y/o cuantificación de biomarcadores peptídicos se pueden realizar por detección del biomarcador peptídico o de uno de sus fragmentos, por ejemplo, un fragmento con truncamiento del C-terminal o con truncamiento del N-terminal. Los fragmentos tienen una longitud adecuadamente mayor que 4 aminoácidos, preferiblemente una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

40 El biomarcador puede ser detectado directamente, por ejemplo, por espectrometría de masas SELDI- o MALDI-TOF. Alternativamente, el biomarcador puede ser detectado directa o indirectamente por interacción con un ligando o ligandos, tal como un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión al biomarcador, u otro péptido, o ligando, por ejemplo, aptámero, o un oligonucleótido, capaz de unirse específicamente al biomarcador. El ligando puede poseer un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente o radiactivo y/o una etiqueta de afinidad.

45 Por ejemplo, la detección y/o cuantificación se pueden realizar por uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), un análisis a base de gel 1-D, un análisis a base de gel 2-D, espectro de masas (MS), cromatografía de líquidos (LC) en fase inversa (RP), permeabilidad por tamaños (filtración en gel), intercambio iónico, afinidad, HPLC, UPLC y otras técnicas basadas en cromatografía de líquidos o cromatografía de líquidos combinada con espectrometría de masas (abreviadamente LC MS por sus iniciales en inglés). Técnicas apropiadas de LC MS incluyen ICAT® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.) o iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). También se podrían utilizar cromatografía de líquidos (por ejemplo, cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) o cromatografía de líquidos a baja presión (LPLC)), cromatografía en capa fina o espectroscopia de RMN (resonancia magnética nuclear).

55 Los métodos de diagnóstico o monitorización de acuerdo con la invención pueden comprender el análisis de una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) por SELDI-TOF o MALDI-TOF para detectar la presencia o nivel del biomarcador peptídico. Estos métodos también son adecuados para cribado clínico, pronóstico, monitorización de los resultados de la terapia, identificación de pacientes con más probabilidades de responder a un tratamiento terapéutico.

co particular, para el cribado y desarrollo de fármacos y la identificación de nuevas dianas para el tratamiento con fármacos.

La detección y/o cuantificación de los biomarcadores peptídicos se pueden realizar utilizando un método inmunológico, que implica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, capaz de unirse específicamente al biomarcador peptídico. Métodos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos de tipo sándwich, tales como ELISA de tipo sándwich, en los que la detección de los biomarcadores peptídicos se realiza utilizando dos anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en un biomarcador peptídico; radioinmunoensayos (RIA), ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) directo, indirecto o competitivo, inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos de fluorescencia (FIA), transferencia de Western, inmunoprecipitación y cualquier inmunoensayo basado en partículas (por ejemplo, utilizando partículas de oro, plata o látex, partículas magnéticas o Q-dots). Los métodos inmunológicos se pueden realizar, por ejemplo, en una placa de microtitulación o en formato de tiras.

Los métodos inmunológicos de acuerdo con la invención pueden basarse, por ejemplo, en cualquiera de los métodos siguientes.

La inmunoprecipitación es el método de inmunoensayo más simple; mide la cantidad de precipitado que se forma después de que el anticuerpo reactivo se haya incubado con la muestra y reaccione con el antígeno diana presente para formar un agregado insoluble. Las reacciones de inmunoprecipitación pueden ser cualitativas o cuantitativas.

En inmunoensayos de partículas, varios anticuerpos se unen a la partícula y simultáneamente la partícula es capaz de unirse a muchas moléculas de antígeno. Esto acelera en gran medida la velocidad de la reacción visible. Esto permite la detección rápida y sensible del biomarcador.

En inmunonefelometría, la interacción de un anticuerpo y un antígeno diana en el biomarcador da como resultado la formación de complejos inmunes que son demasiado pequeños para precipitar. Sin embargo, estos complejos dispersarán la luz incidente que se puede medir usando un nefelómetro. La concentración de antígeno, es decir del biomarcador, se puede determinar pocos minutos después de la reacción.

Los métodos de radioinmunoensayo (RIA) emplean isótopos radiactivos, tales como ^{125}I para marcar bien el antígeno o el anticuerpo. El isótopo utilizado emite rayos gamma, que generalmente se miden después de la separación del radiomarcador no unido (libre). Las principales ventajas de los RIA, en comparación con otros inmunoensayos, son mayor sensibilidad, fácil detección de la señal y ensayos rápidos bien establecidos. Las principales desventajas son los riesgos para la salud y la seguridad planteados por el uso de radiación y el tiempo y los gastos asociados con el mantenimiento de un programa autorizado de seguridad a la radiación y eliminación de residuos. Por esta razón, RIA ha sido sustituido en gran medida en la práctica habitual de laboratorio clínico por inmunoensayos enzimáticos.

Los inmunoensayos enzimáticos (EIA) fueron desarrollados como una alternativa a los radioinmunoensayos (RIA). Estos métodos utilizan una enzima para marcar bien el anticuerpo o el antígeno diana. La sensibilidad de EIA se aproxima a la de RIA, sin el peligro que representan los isótopos radiactivos. Uno de los métodos EIA más ampliamente utilizados para detección es el ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA). Los métodos ELISA pueden usar dos anticuerpos uno de los cuales es específico para el antígeno diana y el otro está acoplado a una enzima, la adición del sustrato para la enzima da como resultado la producción de una señal quimioluminiscente o fluorescente.

El inmunoensayo fluorescente (FIA) se refiere a inmunoensayos que utilizan un marcador fluorescente o un marcador enzimático que actúa sobre el sustrato formando un producto fluorescente. Las mediciones fluorescentes son inherentemente más sensible que las mediciones colorimétricas (espectrofotométricas). Por lo tanto, los métodos de FIA tienen mayor sensibilidad analítica que los métodos de EIA, que emplean la medición de la absorbancia (densidad óptica).

Los inmunoensayos quimioluminiscentes utilizan un marcador quimioluminiscente, que produce luz cuando es excitado por energía química; las emisiones se miden usando un detector de luz.

Los métodos inmunológicos de acuerdo con la invención se pueden realizar por lo tanto utilizando métodos bien conocidos. Se puede utilizar cualquier procedimiento directo (por ejemplo, que utiliza un chip sensor) o indirecto en la detección de biomarcadores peptídicos de la invención.

Los sistemas de biotina-avidina o biotina-estreptavidina son sistemas de marcación genéricos que se pueden adaptar para uso en métodos inmunológicos de la invención. Un miembro de una pareja de unión (hapteno, antígeno, ligando, aptámero, anticuerpo, enzima, etc.) se marca con biotina y el otro miembro (superficie, por ejemplo, pocillo, perla, sensor, etc) se marca con avidina o estreptavidina. Esta es una tecnología convencional para inmunoensayos, ensayos con sondas génicas y (bio)sensores, pero es una vía de inmovilización indirecta en lugar de una directa. Por ejemplo, un ligando biotinilado (por ejemplo, anticuerpo o aptámero) específico para un biomarcador peptídico de la invención se puede inmovilizar sobre una superficie de avidina o estreptavidina, a continuación el ligando inmovilizado se puede exponer a una muestra que contiene o que se sospecha que contiene el biomarcador peptídico con el fin de detectar y/o cuantificar un biomarcador peptídico de la invención. A continuación se puede realizar la

detección y/o cuantificación del antígeno inmovilizado por un método inmunológico como se describe en la presente memoria.

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente memoria incluye, aunque sin limitación: anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria se refiere también a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de moléculas de inmunoglobulina.

La identificación de biomarcadores clave específicos para una enfermedad es fundamental para la integración de los procedimientos de diagnóstico y los regímenes terapéuticos. Usando biomarcadores predictivos, se pueden desarrollar herramientas de diagnóstico adecuadas, tales como biosensores, en consecuencia, en métodos y usos de la invención, se pueden realizar la detección y cuantificación usando un biosensor, sistema microanalítico, sistema fabricado por microingeniería, sistema de microseparación, sistema de inmunocromatografía u otros dispositivos analíticos adecuados. El biosensor puede incorporar un método inmunológico para la detección del(de los) biomarcador(es), con tecnologías eléctrica, térmica, magnética, óptica (por ejemplo, holograma) o acústica. Usando estos biosensores, es posible detectar el(los) biomarcador(es) diana a las concentraciones esperadas que se encuentran en las muestras biológicas.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un aparato para diagnosticar o monitorizar la esquizofrenia, que comprende un sistema de microseparación y/o de inmunocromatografía con biosensor, microanalítico, fabricado por microingeniería, configurado para detectar y/o cuantificar cualquiera de los biomarcadores definidos en la presente memoria.

El(los) biomarcador(es) de la invención se puede(n) detectar usando un biosensor que incorpora tecnologías basadas en hologramas "inteligentes", o sistemas acústicos de alta frecuencia, siendo tales sistemas particularmente susceptibles de configuraciones de "código de barras" o de matrices.

En los sensores de hologramas inteligentes (*Smart Holograms Ltd*, Cambridge, Reino Unido), una imagen holográfica se almacena en una película delgada de polímero que está sensibilizada para reaccionar específicamente con el biomarcador. Por exposición, el biomarcador reacciona con el polímero lo que conduce a una alteración de la imagen presentada por el holograma. La lectura del resultado del ensayo puede ser un cambio en el brillo óptico, la imagen, el color y/o la posición de la imagen. Para aplicaciones cualitativas y semi-cuantitativas, un holograma sensor puede ser leído a simple vista, eliminando así la necesidad de un equipo de detección. Se puede utilizar un sencillo sensor de color para leer la señal cuando se requieren mediciones cuantitativas. La opacidad o el color de la muestra no interfieren con el funcionamiento del sensor. El formato del sensor permite la multiplexación para la detección simultánea de varias sustancias. Se pueden diseñar sensores reversibles e irreversibles para satisfacer diferentes requisitos y es factible la monitorización continua de un biomarcador de interés particular.

Adecuadamente, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores de la invención combinan el reconocimiento biomolecular con medios apropiados para convertir en una señal la detección de la presencia, o cuantificación, del biomarcador en la muestra. Los biosensores se pueden adaptar para ensayos de diagnóstico en "sitios alternativos", por ejemplo, en servicio hospitalario, en ambulatorio, quirófano, residencia, hospital de campaña y lugar de trabajo.

Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores de la invención incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmón, holográficos y fabricados por microingeniería. Se pueden emplear elementos de reconocimiento impresos, tecnología de transistores de película delgada, resonadores acústicos-magnéticos y otros nuevos sistemas acústico-eléctricos en biosensores para la detección del uno o más biomarcadores de la invención.

Los métodos que implican la detección y/o cuantificación de uno o más biomarcadores peptídicos de la invención se pueden realizar en instrumentos de mesa de laboratorio o se pueden incorporar en plataformas desechables, de diagnóstico o de monitorización que se pueden utilizar en un ambiente que no es de laboratorio, por ejemplo, en la consulta del médico o al lado de la cama del paciente. Los biosensores adecuados para la realización de los métodos de la invención incluyen tarjetas de "crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores se pueden configurar para permitir que los datos recogidos sean transmitidos electrónicamente al médico para su interpretación y por lo tanto puedan constituir la base para la neuromedicina electrónica (abreviadamente e-neuromedicina).

Cualquier animal adecuado puede ser utilizado como un animal no humano sujeto de estudio, por ejemplo, un primate no humano, caballo, vaca, cerdo, cabra, oveja, perro, gato, peces, roedores, por ejemplo, cobaya, rata o ratón; insecto (por ejemplo, *Drosophila*), anfibio (por ejemplo, *Xenopus*) o *C. elegans*.

La sustancia de ensayo puede ser una sustancia química o farmacéutica conocida, tal como, aunque sin limitación, una sustancia terapéutica para tratamiento anti-depresivo de un trastorno; o la sustancia de ensayo puede ser una nueva entidad química natural o sintética o una combinación de dos o más de las sustancias antes mencionadas.

5 Se proporciona un método de identificación de una sustancia capaz de promover o suprimir la generación del biomarcador peptídico en un sujeto, que comprende exponer una célula de ensayo a una sustancia de ensayo y monitorizar el nivel del biomarcador peptídico dentro de dicha célula de ensayo, o secretado por dicha célula de ensayo.

10 La célula de ensayo podría ser procariota, sin embargo se prefiere que se emplee una célula eucariota en los métodos de ensayo basados en células. Adecuadamente, la célula eucariota es una célula de levadura, célula de insecto, célula de *Drosophila*, célula de anfibio (por ejemplo, de *Xenopus*), célula de *C. elegans* o es una célula de origen humano, de primate no humano, equino, bovino, porcino, caprino, ovino, canino, felino, de peces, de roedores o de móridos.

En los métodos para la identificación de sustancias de uso terapéutico potencial, se pueden utilizar células o animales no humanos que sean capaces de expresar el péptido.

15 Los métodos de cribado también abarcan un procedimiento para identificar un ligando capaz de unirse al biomarcador peptídico de acuerdo con la invención, que comprende incubar una sustancia de ensayo en presencia del biomarcador peptídico en condiciones adecuadas para su unión, y detectar y/o cuantificar la unión del péptido a dicha sustancia de ensayo.

20 Las tecnologías de cribado de alto rendimiento basadas en el biomarcador, los usos y los métodos de la invención, por ejemplo, configurados en un formato de matrices, son adecuadas para monitorizar las "firmas" de los biomarcadores para la identificación de compuestos terapéuticos potencialmente útiles, por ejemplo, ligandos tales como compuestos naturales, compuestos químicos sintéticos (por ejemplo, de quimiotecas combinatorias), péptidos, anticuerpos monoclonales o policlonales o sus fragmentos, que pueden ser capaces de unirse al biomarcador.

25 Los métodos de la invención se pueden realizar en formato de matrices, por ejemplo, en un chip, o como una matriz de múltiples pocillos. Los métodos se pueden adaptar a plataformas para ensayos individuales, o ensayos múltiples idénticos o ensayos múltiples no idénticos, y se pueden realizar en formato de alto rendimiento. Los métodos de la invención pueden comprender realizar uno o más diferentes ensayos adicionales diferentes para confirmar o descartar el diagnóstico, y/o para caracterizar adicionalmente un estado.

30 La invención proporciona además una sustancia, por ejemplo, un ligando, identificado o identificable por un método de identificación o de cribado o uso de la invención. Tales sustancias pueden ser capaces de inhibir, directa o indirectamente, la actividad del biomarcador peptídico, o de suprimir la generación del biomarcador peptídico. El término "sustancias" incluye sustancias que no se unen directamente al biomarcador peptídico y no modulan directamente una función, pero en cambio modulan indirectamente una función del biomarcador peptídico. Los ligandos también se incluyen en las sustancias finales; ligandos de la invención (por ejemplo, un compuesto químico natural o sintético, péptido, aptámero, oligonucleótido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) son capaces de unirse, preferiblemente de modo específico, al péptido.

35 La invención proporciona además una sustancia de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de la esquizofrenia, o la predisposición a ella.

También se proporciona el uso de una sustancia de acuerdo con la invención en el tratamiento de la esquizofrenia, o la predisposición a ella.

40 También se proporciona el uso de una sustancia de acuerdo con la invención como medicamento.

Incluso se proporciona adicionalmente el uso de una sustancia de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esquizofrenia, o de la predisposición a ella.

45 Se proporciona un kit para diagnosticar o monitorizar la esquizofrenia, o la predisposición a ella. Adecuadamente, un kit de acuerdo con la invención puede contener uno o más componentes seleccionados del grupo: un ligando específico para el biomarcador peptídico o un compuesto mimético estructural/conformacional del biomarcador peptídico, uno o más controles, uno o más reactivos y uno o más productos consumibles; opcionalmente junto con instrucciones para uso del kit.

50 La identificación de biomarcadores para la esquizofrenia u otros trastornos psicóticos permite la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. Actualmente hay retrasos significativos en la determinación del tratamiento eficaz y hasta ahora no ha sido posible llevar a cabo una evaluación rápida de la respuesta a los fármacos. Tradicionalmente, muchas de las terapias antidepresivas han requerido pruebas de tratamiento que duran semanas a meses para un enfoque terapéutico dado. La detección de un biomarcador peptídico de la invención se puede utilizar para cribar sujetos antes de su participación en las pruebas clínicas. Los biomarcadores proporcionan medios para indicar la respuesta terapéutica, la falta de respuesta, el perfil de efectos secundarios desfavorables, el grado de cumplimiento de la medicación y la consecución de niveles séricos adecuados del fármaco. Los biomarca-

55

dores se pueden usar para proporcionar una advertencia de respuesta adversa al fármaco. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas del cerebro, puesto que la evaluación de la respuesta se puede utilizar para ajustar la dosis, reducir al mínimo el número de medicamentos prescritos, reducir el retraso en la consecución de la terapia eficaz y evitar las reacciones adversas a los fármacos. Por lo tanto, mediante la monitorización de un biomarcador de la invención, la atención al paciente puede ser adaptada con precisión para que coincida con las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del paciente, el biomarcador por lo tanto se puede utilizar para valorar la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar los pacientes con alto riesgo de efectos secundarios graves.

Los ensayos basados en biomarcadores proporcionan una evaluación de primera línea de "nuevos" pacientes, y proporcionan medidas objetivas para el diagnóstico preciso y rápido, en un plazo de tiempo y con precisión, no alcanzables con las medidas subjetivas actuales.

Además, los ensayos de biomarcadores para diagnóstico son útiles para identificar miembros de una familia o pacientes con alto riesgo de desarrollar esquizofrenia u otros trastornos psicóticos. Esto permite la iniciación de la terapia apropiada, o medidas preventivas, por ejemplo, la gestión de los factores de riesgo. Se reconoce que estos enfoques mejoran el resultado y pueden prevenir la aparición manifiesta del trastorno.

Los métodos de monitorización de biomarcadores, los biosensores y los kits también son de vital importancia como herramientas de monitorización de pacientes, permitiendo al médico determinar si la recaída es debido al empeoramiento del trastorno, al mal cumplimiento por el paciente o al abuso de sustancias. Si el tratamiento farmacológico se considerara inadecuado, entonces la terapia se puede restablecer o aumentar; si es adecuado se puede realizar un cambio en la terapia. Como los biomarcadores son sensibles al estado del trastorno, proporcionan una indicación del impacto de la terapia con fármacos o del abuso de sustancias.

En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos de la invención mencionados anteriormente, la invención puede comprender, además, el uso de uno o más péptidos seleccionados de factor de coagulación 13, apolipoproteína C1, apolipoproteína D, serina/treonina proteína quinasa, miembro 6 de la subfamilia B del casete de unión a ATP mitocondrial, proteína ligasa E3 de ubiquitina, haptoglobina, proteína 2 que contiene el dominio AAA de la familia de la ATPasa. cadena beta de espectrina eritrocítica, proteína de la matriz oligomérica del cartílago, proteína C de unión a manosa, integrina beta-3, proteína 2 asociada a microtúbulos, cathepsina L2, factor B del complemento, componente 5 del complemento, vitronectina; proteína S, clusterina (ApoJ), proteína 2 de unión al hialuronano y DNA topoisomerasa 2-alfa.

El siguiente estudio ilustra la invención.

Estudio

Utilizando perfiles proteómicos globales, se identificaron una serie de biomarcadores circulantes que diferencian los pacientes en los que se había detectado por primera vez la esquizofrenia y que no habían recibido tratamiento con fármacos de los controles sanos. El objetivo del estudio fue establecer la utilidad de estos marcadores para: 1) el diagnóstico precoz de la esquizofrenia, 2) la predicción de las respuestas a fármacos enfocada a los efectos secundarios metabólicos, 3) la selección de los tratamientos con fármacos apropiados en la primera aparición y 4) la medicina traslacional que se centra en la validación de modelos preclínicos para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. En particular, estos biomarcadores se analizaron para la selección de los pacientes y para la monitorización de sus respuestas a los nuevos tratamientos terapéuticos.

Materiales y métodos

El primer conjunto investigada de 67 muestras de suero comprendía 22 muestras tomadas de pacientes en los que se había detectado por primera vez la esquizofrenia y que no habían recibido tratamiento con fármacos, 33 muestras tomadas de voluntarios sanos y 12 muestras de control de calidad. Los pacientes fueron preparados aleatoria y ciegamente. El segundo conjunto de 46 muestras de suero comprendía 20 muestras tomadas de pacientes en los que se había detectado por primera vez la esquizofrenia y que no habían recibido tratamiento con fármacos, 18 muestras tomadas de voluntarios sanos y 8 muestras de control de calidad. Los pacientes fueron preparados aleatoria y ciegamente.

Cada muestra se agotó de las 20 proteínas más abundantes usando cromatografía de inmunoafinidad (Proteo-Prep20, Sigma, St. Louis MO), cargando un total de 560 µg de proteína de cada muestra en la columna de agotamiento. El intercambio de tampón se realizó con bicarbonato de amonio 50 mM, usando columnas de centrifugación (Millipore, Bedford MA) con un corte de peso molecular de 5 kDa. Las proteínas se redujeron usando ditrioteitol 5 mM (Sigma, St. Louis MO) a 60°C durante 30 minutos, y se alquilaron con yodoacetamida 10 mM (Sigma, St. Louis MO) en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las proteínas se sometieron a digestión utilizando tripsina (Promega, Madison, WI), en una relación 1:50 (tripsina/proteína, p/p) durante 16 horas a 37°C. Las digestiones se detuvieron mediante la adición de 2,3 µl de HCl 8,8 M a cada muestra. Las muestras se conservaron a -80°C.

Cada muestra se inyectó y analizó 3 veces seguido por una inyección de un blanco (para asegurarse de que no hay traspaso de péptidos de una muestra a otra en este proceso secuencial). Para cada muestra, se cargaron 8 µl usan-

do un aparato de cromatografía de líquidos de prestaciones nanoUltra (abreviadamente en lo sucesivo UPLC por la expresión *nanoUltra Performance Liquid Chromatography*), usando inyección de tipo *split-less* (10 kpsi nanoAcquity, Waters, Milford MA). Los tampones utilizados fueron A: H₂O + ácido fórmico al 0,1%; B: Acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%. La desalación de las muestras se llevó a cabo en línea con 100% de tampón A durante 3 minutos, utilizando una columna de captura de fase inversa C18 en línea (diámetro interno 180 µm, longitud 20 mm y tamaño de partículas 5 µm) (Waters, Milford MA). Las muestras se separaron usando un nanocolumna C18 (diámetro interno 75 µm, longitud 200 mm, tamaño de partículas 1,7 µm) (Waters, Milford MA), a 300 nl/min.

El aparato de nanoUPLC se acopló en línea a través de un emisor nanoESI de una longitud de 7 cm y una punta de 10 µm (New Objective, Woburn, MA) a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo (Qtof Premier, Waters, Milford MA). Los datos fueron adquiridos en el modo MS^E (*Expression*). En este modo, el cuadrupolo se establece para transferir todos los iones, mientras que la celda de colisión cambia de energía de colisión baja a alta intermitentemente durante todo el tiempo de adquisición. En las exploraciones de baja energía, la energía de colisión se estableció en 4 eV, mientras que en las exploraciones de alta energía se subió de 20 a 43 eV. Este modo permite la medición de la masa exacta de ambos péptidos intactos, así como sus fragmentos, y la conservación del perfil cromatográfico para ambos péptidos intactos y sus fragmentos. La exactitud de la masa se mantuvo durante todo el análisis por el uso de un aparato LockSpray. Se infundió continuamente un compuesto de referencia (Glu-Fibrinopéptido B, Sigma, St. Louis MO) usando el LockSpray y se escaneó intermitentemente cada 30 segundos. Durante el procesamiento de los datos, los espectros del analito fueron corregidos sobre la base de la diferencia entre el pico m/z detectado y el pico m/z teórico (785,8426 [M +2 H] +) de Glu-Fibrinopéptido B.

20 *Procesamiento de datos e identificación de proteínas*

Los datos en bruto, adquiridos en formato continuo, fueron procesados con el programa informático ProteinLynx Global Server versión 2.3 (también conocido como *Identity^E*) (Waters, Milford MA). La Información tanto cuantitativa como cualitativa se produjo de forma automática por el programa informático, utilizando los parámetros por defecto.

Información cuantitativa

25 Las mediciones de intensidad se obtuvieron mediante la integración del volumen total de iones de cada ion extraído, reducido al estado de carga, desprovisto de isótopos y corregido en su masa a través del volumen de espectrometría de masas y cromatografía (una versión tridimensional del método del cromatograma de iones extraídos). En este tipo de adquisición, el perfil cromatográfico se mantiene reproducible en todo el conjunto de muestras, por lo tanto, es posible comparar directamente las intensidades de los iones precursores a través de todas las inyecciones de todas las muestras, después de la normalización sobre la base del patrón interno (enolasa digerida de *Saccharomyces cerevisiae*) que se añadió a cada muestra.

35 El conjunto de datos se filtró luego utilizando el paquete de programas informáticos libre R (www.r-project.org) y sólo se incluyeron en el análisis los péptidos que se detectaron en al menos 2 de 3 inyecciones de cada muestra y al menos el 70% de las muestras. Los péptidos que no pasaron estos criterios de filtrado se excluyeron del análisis puesto que la información cuantitativa que generan es de poca confianza debido a la mala replicación.

Se calculó el valor medio de las intensidades de los péptidos correlacionantes de cada proteína identificada para producir la intensidad de proteína total en todas las muestras en las que se detectaron, tal como ha sido descrito por Schwarz *et al.* 2007.

40 Se realizó una prueba T de Student de dos colas sobre la base de las intensidades de las proteínas con un corte de significación de P<0,05. Los valores de P determinados fueron corregidos para la prueba de múltiples hipótesis según Benjamini y Hochberg, significación de Q <0,05.

Resultados

Nombre de la proteína	Registro	Prueba T (valor p)
Factor de coagulación 13	P05160 F13B_HUMAN	0,014
Apolipoproteína C1	P02654 APOC1_HUMAN	0,044
Apolipoproteína D	P05090 APOD_HUMAN	0,024
Importina 9	Q96P70 IPO9_HUMAN	0,0066
Serina/treonina proteína quinasa	Q9NRM7 LATS2_HUMAN	0,033
Miembro 6 de la subfamilia B del casete de unión a ATP mitocondrial	Q9NP58 ABCB6_HUMAN	0,035
Proteína ligasa E3 de ubiquitina E	Q81WV8 UBR2_HUMAN	0,038
NALP8	Q86W28 NALP8_HUMAN	0,0045
Proteína S dependiente de vitamina K	P07225 PROS_HUMAN	0,046
Alfa-1-antiquimotripsina	P01011 AACT_HUMAN	0,0064
Lumican	P51884 LUM_HUMAN	0,0169
Helicasa	Q15477 SKIV2_HUMAN	0,019

ES 2 426 123 T3

Haptoglobina	P00738 HPT_HUMAN	0,043
Relacionada con haptoglobina	P00739 HPTR_HUMAN	0,0022
Proteína 2 que contiene el dominio AAA de la familia de ATPasa	Q6PL18 ATAD2_HUMAN	0,0070
Cadena beta de espectrina eritrocítica	P11277 SPTB1_HUMAN	0,0084
Proteína ligasa E3 de ubiquitina LRSAM1	Q6UWE0 LRSM1_HUMAN	0,0121
Miembro 1B de la familia C similar a ANKRD26	A5A3E0 A26CB_HUMAN	0,0124
Proteína 2B que contiene el dominio AAA de la familia de ATPasa	Q9ULI0 ATD2B_HUMAN	0,0144
Proteína C9orf93 no caracterizada	Q6TFL3 CI093_HUMAN	0,0177
Proteína de la matriz oligomérica del cartílago	P49747 COMP_HUMAN	0,0241
Globulina de unión a tiroxina	P05543 THBG_HUMAN	0,0256
Miembro A1 de la familia que contiene el dominio mano EF	Q81YU8 EFHA1_HUMAN	0,0264
Proteína C de unión a manosa	P11226 MBL2_HUMAN	0,0289
Semialdehído sintasa alfa-aminoadípica, mitocondrial	Q9UDR5 AASS_HUMAN	0,0307
Integrina beta 3	P05106 ITB3_HUMAN	0,0318
1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma-1	P19174 PLCG1_HUMAN	0,0332
Carboxipeptidasa 2 citosólica	Q5U5Z8 CBPC2_HUMAN	0,0341
Alfa-1-antiquimotripsina	P01011 AACT_HUMAN	0,0344
Proteína 2 asociada a microtúbulos	P11137 MAP2_HUMAN	0,0349
Proteína FLJ36157 no caracterizada	Q8N9V7 YC009_HUMAN	0,0388
Catepsina L2	O60911 CATL2_HUMAN	0,0390
Atractina	O75882 ATR_N_HUMAN	0,0409
Rootletin	Q5TZA2 CROCC_HUMAN	0,0414
Componente 7 del complemento	P10643 CO7_HUMAN	0,021981
Factor B del complemento	P00751 CFAB_HUMAN	0,027791
Componente 5 del complemento	P01031 CO5_HUMAN	0,028466
IgMu	P01871 MUC_HUMAN	0,031597
Afamina	P43652 AFAM_HUMAN	0,038915
Proteína similar a kinesina	Q9ULI4 KI26A_HUMAN	0,0381939
Vitronectina; proteína S	P04004 VTNC_HUMAN	0,00111
Clusterina (ApoJ)	P10909 CLUS_HUMAN	0,04233
Poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP1)	P09874 PARP1_HUMAN	0,01680
Proteína 2 de unión al hialuronano	Q14520 HABP2_HUMAN	0,02213
Región de la cadena C de Ig gamma-1	P01857 IGHG1_HUMAN	0,03141
Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica	P27169 PON1_HUMAN	0,04709
Cadena pesada H2 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	P19823 ITIH2_HUMAN	0,01793
Cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Q14624 ITIH4_HUMAN	0,01890
Apolipoproteína C-III	P02656 APOC3_HUMAN	0,00538
Proteína de zona de embarazo	P20742 PZP_HUMAN	0,0445
DNA topoisomerasa 2-alfa	P11388 TOP2A_HUMAN	0,0241
Cofactor 2 de heparina	P05546 HEP2_HUMAN	0,0424
Subcomponente C1r del complemento	P00736 C1R_HUMAN	0,0489

REIVINDICACIONES

1. El uso *in vitro* de importina 9, como un biomarcador para la esquizofrenia, o la predisposición a ella.
2. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el uso de uno o más péptidos adicionales seleccionados de NALP8, proteína S dependiente de la vitamina K, alfa-1-antiquimotripsina, lumican, helicasa, relacionado con haptoglobina, miembro 1B de la familia C similar a ANKRD26, proteína 2B que contiene el dominio AAA de la familia de ATPasa, proteína C9orf93 no caracterizada, globulina de unión a tiroxina, miembro A1 de la familia que contiene el dominio mano EF, semialdehído sintasa alfa-aminoacídica mitocondrial, 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma-1, carboxipeptidasa 2 citosólica, proteína FLJ36157 no caracterizada, atractina, rootletin, componente 7 del complemento, afamina, proteína similar a la quinesina, poli[ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP1), región de la cadena C de Ig gamma-1, paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica, cadena H2 pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina, cadena H4 pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína C-III, proteína de zona del embarazo, cofactor 2 de la heparina y subcomponente C1r del complemento, como un biomarcador para la esquizofrenia o para la predisposición a ella.
3. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además el uso de uno o más péptidos adicionales seleccionados de proteína ligasa E3 de ubiquitina LRSAM1, IgMu, factor 13 de coagulación, apolipoproteína C1, apolipoproteína D, serina/treonina-proteína quinasa, miembro 6 de la subfamilia B del cassette de unión a ATP mitocondrial, proteína ligasa E3 de ubiquitina, haptoglobina, proteína 2 que contiene el dominio AAA de la familia de ATPasa, cadena beta de espectrina eritrocítica, proteína de la matriz oligomérica del cartílago, proteína C de unión a manosa, integrina beta-3, proteína 2 asociada a microtúbulos, catepsina L2, factor B del complemento, componente 5 del complemento, vitronectina; proteína S, clusterina (ApoJ), proteína 2 de unión a hialurano y DNA-topoisomerasa 2-alfa, como un biomarcador para la esquizofrenia o para la predisposición a ella.
4. Un método para diagnosticar o monitorizar la esquizofrenia, o la predisposición a ella, que comprende detectar y/o cuantificar, en una muestra de un sujeto de ensayo, el biomarcador citado en la reivindicación 1.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además detectar y/o cuantificar, en una muestra de un sujeto de ensayo, uno o más de los biomarcadores peptídicos adicionales de la lista de la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
6. Un método de monitorizar la eficacia de una terapia en un sujeto que tiene, que se sospecha que tiene, o que está predispuesto a la esquizofrenia, que comprende detectar y/o cuantificar, en una muestra de dicho sujeto, el biomarcador citado en la reivindicación 1.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además detectar y/o cuantificar, en una muestra de dicho sujeto, uno o más de los biomarcadores peptídicos adicionales de las listas de la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que se lleva a cabo sobre muestras tomadas en dos o más ocasiones de un sujeto de ensayo.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que comprende además comparar el nivel del biomarcador presente en muestras tomadas en dos o más ocasiones.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que comprende comparar la cantidad del biomarcador en dicha muestra de ensayo con la cantidad presente en una o más muestras tomadas de dicho sujeto antes del comienzo de la terapia y/o una o más muestras tomadas de dicho sujeto en una fase anterior de la terapia.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que comprende además detectar un cambio en la cantidad del biomarcador en muestras tomadas en dos o más ocasiones.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, que comprende comparar la cantidad del biomarcador presente en dicha muestra de ensayo con uno o más controles.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en el que las muestras se toman antes y/o durante y/o después de la terapia para la esquizofrenia.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en el que la muestra biológica es líquido cefalorraquídeo, sangre completa, suero sanguíneo, plasma, orina, saliva, u otro líquido corporal, o aliento, aliento condensado, o uno de sus extractos o una de sus purificaciones o diluciones.
15. El uso de un kit para monitorizar o diagnosticar la esquizofrenia, en el que dicho kit comprende un biosensor que detecta y/o cuantifica el biomarcador citado en la reivindicación 1, en el que dicho biosensor comprende un ligando capaz de unirse específicamente al biomarcador citado en la reivindicación 1.