

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 591**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08862392 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2232269**

54 Título: **Métodos y biomarcadores para diagnosis y monitorización de trastornos esquizofrénicos**

30 Prioridad:

19.12.2007 GB 0724735

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

04.03.2014

73 Titular/es:

**PSYNOVA NEUROTECH LIMITED (50.0%)
St John's Innovation Centre Cowley Road
Cambridge CB4 0WS, GB y
CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEVIN, YISHAI;
BAHN, SABINE;
WANG, LAN;
SCHWARZ, EMANUEL y
MCALLISTER, GEORGE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 445 591 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

Métodos y biomarcadores para diagnosis y monitorización de trastornos esquizofrénicos

Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere a métodos de diagnosis o de monitorización de trastornos esquizofrénicos, v.g. que utilizan biomarcadores. La exposición se refiere también al uso de biomarcadores en cribado clínico, evaluación de prognosis, evaluación de terapia, cribado de fármacos y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y métodos en los cuales se emplean pueden utilizarse para ayudar a la diagnosis, y para evaluar la aparición y el desarrollo de trastornos esquizofrénicos.

Antecedentes de la Invención

- 10 La identificación de biomarcadores para trastornos esquizofrénicos permite la integración de procedimientos de diagnosis y regímenes terapéuticos. En la actualidad, existen retardos importantes en la determinación del tratamiento eficaz, y no ha sido posible hasta ahora realizar una evaluación rápida de la respuesta a los fármacos. Tradicionalmente, muchas terapias anti-esquizofrénicas han requerido pruebas de tratamiento que duran semanas hasta meses para un método terapéutico dado.
- 15 Yang *et al.* (2006), Anal, Chem. 78, 3571-6, da a conocer niveles alterados de proteínas en el plasma de pacientes con esquizofrenia. Los resultados se refieren a marcadores de eficacia de los fármacos. Aparentemente no existe diferencia alguna entre los pacientes tratados y no tratados. No se da resultado cuantitativo alguno.

WO 2007/045865 describe psicosis y otros trastornos y la necesidad de biomarcadores. Los biomarcadores descritos en dicho documento incluyen el péptido ApoA1 (apolipoproteína).

- 20 WO 2008/090319 y Maes *et al.* 1997 dan a conocer biomarcadores adicionales. Los mismos incluyen el precursor de clusterina, el inhibidor de inter-alfa-tripsina, la apolipoproteína A2 y la glicoproteína alfa2 HS.

Sumario de la Invención

- 25 Basándose en un enfoque del tipo descrito en WO 2007/045865, se han identificado biomarcadores adicionales. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de diagnosis, determinación de una predisposición a o monitorización del tratamiento de un trastorno esquizofrénico, que comprende los pasos de:

- (a) medir, en una muestra tomada de un individuo, los niveles de cada uno de los biomarcadores siguientes: Beta-2 Microglobulina, Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro, Calcitonina, IL-13, IL-7, Alfa-1 antitripsina, Apolipoproteína A1, Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo, Fibrinógeno, G-CSF, Hormona del Crecimiento, Glutación S-Transferasa, IgA, IgM, Leptina, MDC, PAI-1, RANTES, Amiloide P del Suero, Factor de Células Madre, SHBG, TNF RII, Anticuerpo T3, Anticuerpo H4 de Histona, Anticuerpo HSC 70, Rubéola, Anticuerpo SSB y V. zóster;
- 30 y
- (b) comparar el nivel del biomarcador presente en dicha muestra con el nivel del biomarcador en una muestra de control.

En una realización, el método comprende la medida de uno o más biomarcadores adicionales seleccionados de:

- 35 Alfa 2 Macroglobulina, ANG 2 (Angiopoyetina 2), Angiotensinógeno, Anticuerpo Anti-Nuclear, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína CIII, Apolipoproteína H, ASCA (Anticuerpo de *Saccharomyces cerevisiae*), Betacelulina, BMP 6, C. *trachomatis*, Proteína C Reactiva, Antígeno Carcinoembrionario, CD40, Ligando de CD40, Anticuerpo de la Proteína B del Centrómero, CgA (Cromogranina A), Toxina del Cólera, Anticuerpo de Colágeno Tipo 2, Anticuerpo de Colágeno Tipo 4, Complemento 3, Cortisol, Citomegalovirus, EGF, EGF R, ENA 78, Endotelina 1, Eotaxina 3, Antígeno Precoz del Virus Epstein Barr, Eritropoyetina, Factor VII, Ligando Fas, Ferritina, FGF básico, FSH (Hormona Estimulante del Folículo), *H. pylori*, Haptoglobina, Hepatitis A, Hepatitis B Núcleo, Ad de Superficie de la Hepatitis B, Ay de Superficie de la Hepatitis B, Hepatitis C Núcleo, Hepatitis C NS3, Hepatitis C NS4, Hepatitis D, Hepatitis E Virus orf 2,6KD, Hepatitis E Virus orf 3,3KD, Herpes Simplex Virus 1.2, HGF (factor de crecimiento de los hepatocitos), Anticuerpo de Histona, Anticuerpo de Histona H1, Anticuerpo de Histona H2a, Anticuerpo de Histona H2b, Anticuerpo de Histona H3, HIV 1 gp120, HIV 1 p24, Anticuerpo HSP 32 HO, Anticuerpo HSP 71, Anticuerpo HSP 90 alfa, Anticuerpo HSP 90 beta, ICAM 1, IGF BP.2, IL-10, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-1ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, Influenza A, Influenza A H3N2, Insulina, Anticuerpo de Insulina, *L. donovani*, LH (Hormona Luteinizante), Lyme, *M. pneumoniae*, MIF, MIP 1 alfa, MIP 1 beta, Anticuerpo Mitocondrial, Paperas, Mieloperoxidasa, Anticuerpo de Mieloperoxidasa pANCA, NrCAM, Anticuerpo GAD de las Células de los Islotes Pancreáticos, Polipéptido pancreático, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, PDGF, Péptido YY, Anticuerpo PM 1, Polio Virus, Prolactina, Fosfatasa Ácida Prostática, Anticuerpo de Proteinasa 3 cANCA, Resistina, Virus Respiratorio Sincitial, Anticuerpo P Ribosómico, Anticuerpo RNP, Rubéola, Anticuerpo Scl 70, SGOT, Anticuerpo Smith, Sortilina, sRAGE, Estreptolisina O SLO, TECK, Trombopoyetina, Anticuerpo Tiroglobulina, TIMP 1, TNF alfa, TRAIL R3, TSP 1, Anticuerpo de la Enfermedad Celiaca tTG (Transglutaminasa Tisular), VEGF y Factor

von Willebrand.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de monitorización de la eficacia de una terapia anti-psicótica en un individuo que sufre, se sospecha que sufre, o que está predispuesto a, un trastorno esquizofrénico, que comprende los pasos siguientes:

5 (a) medir el nivel de cada uno de los biomarcadores que se definen en esta memoria presentes en muestras tomadas en dos o más ocasiones del individuo; y

(b) comparar el nivel de cada uno de los biomarcadores en una muestra tomada del individuo con el nivel presente en una muestra tomada del individuo antes del comienzo de una terapia, y/o una muestra tomada del individuo en una etapa anterior de una terapia.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un kit para monitorización o diagnóstico de un trastorno esquizofrénico que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar los biomarcadores que se definen en esta memoria.

15 Aspectos adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones. La exposición incluye un método para monitorización de la eficacia de la terapia para un trastorno esquizofrénico en un individuo. Los métodos de monitorización de la invención pueden utilizarse para monitorizar la aparición, la progresión, la estabilización, la mejora y/o la remisión de un trastorno psicótico.

20 La exposición se refiere a un método de identificación de una sustancia capaz de estimular, promover o activar la generación de un biomarcador peptídico en un individuo, que comprende administrar una sustancia de test a un individuo animal y detectar y/o cuantificar los niveles del biomarcador peptídico presentes en una muestra de test del individuo.

Descripción de la Invención

25 En el uso de los métodos se apreciará que pueden utilizarse un solo biomarcador o más de uno, en una o más de una ocasión, y con respecto a una o más muestras. Puede hacerse referencia a biomarcadores proteínicos, y se apreciará que, dependiendo de las circunstancias, la referencia a una proteína de este tipo incluye fragmentos de la misma.

30 En el ensayo, según la exposición, un nivel alterado o disminuido de biomarcadores proteínicos plasmáticos en una muestra biológica de test con relación al nivel en un control normal es indicativo de la presencia de un trastorno esquizofrénico, o predisposición al mismo. Una disminución en el nivel de una proteína plasmática en una muestra biológica, preferiblemente en una muestra de sangre entera, plasma, o suero, a lo largo del tiempo puede ser indicativa de aparición o progresión, es decir, empeoramiento del trastorno, mientras que un aumento en el nivel de la proteína plasmática puede indicar mejora o remisión del trastorno.

35 Los métodos de monitorización y de diagnóstico son útiles para confirmar la existencia de un trastorno, o predisposición al mismo, para monitorizar el desarrollo del trastorno por evaluación de la aparición y progresión, o para evaluar la mejora o regresión del trastorno. Los métodos de monitorización y de diagnóstico son útiles también en métodos para evaluación de cribado clínico, prognosis, elección de terapia, evaluación de beneficio terapéutico, es decir para cribado de fármacos y desarrollo de fármacos.

40 Los métodos eficientes de diagnóstico y monitorización proporcionan "soluciones para el paciente" muy potentes con el potencial para prognosis mejorada, por establecimiento de la diagnosis correcta, haciendo posible una identificación rápida del tratamiento más apropiado (aminorando así una exposición innecesaria a efectos secundarios perjudiciales de los fármacos), y reduciendo el "tiempo de parada" y las tasas de relapso.

Los métodos para monitorización de la eficacia de una terapia pueden utilizarse para monitorizar la eficacia terapéutica de terapias existentes y terapias nuevas en individuos humanos y en animales no humanos (v.g. en modelos animales). Estos métodos de monitorización pueden incorporarse en cribados para nuevas sustancias fármaco y combinaciones de sustancias.

45 La modulación de un nivel de biomarcador peptídico es útil como indicador del estado del trastorno esquizofrénico o predisposición al mismo. Una disminución en el nivel de un biomarcador peptídico a lo largo del tiempo es indicativa de aparición o progresión, es decir empeoramiento del trastorno, mientras que un aumento en el nivel de biomarcador peptídico indica mejora o remisión del trastorno.

50 La detección de un biomarcador peptídico puede utilizarse para cribado de individuos antes de su participación en pruebas clínicas. El biomarcador proporciona un medio para indicar la respuesta terapéutica, el fallo de respuesta, el perfil desfavorable de efectos secundarios, el grado de acatamiento de la medicación y el alcance de niveles adecuados de fármaco en suero. El biomarcador puede utilizarse para proporcionar aviso de respuesta adversa a un fármaco, un problema importante encontrado con todas las medicaciones psicotrópicas. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias cerebrales personalizadas, dado que la evaluación de la respuesta puede utilizarse

para dosificación de ajuste fino, minimización del número de medicaciones prescritas, reducción del retardo en el alcance de una terapia eficaz y evitación de reacciones adversas al fármaco. Así pues, por monitorización de un biomarcador, puede adaptarse la atención del paciente con precisión para ajustarse a las necesidades dictaminadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del paciente; el biomarcador puede utilizarse con ello para valorar la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva, e identificar aquellos pacientes con alto riesgo de efectos secundarios severos.

5

Los tests basados en biomarcadores proporcionan una evaluación de primera línea de pacientes 'nuevos', y proporcionan medidas objetivas para diagnosis exacta y rápida, en un marco de tiempo y con precisión, no alcanzables utilizando las medidas subjetivas actuales.

10 Adicionalmente, los tests de biomarcadores de diagnosis son útiles para identificar miembros de familia o pacientes en la "fase prodrómica", es decir, aquéllos que se encuentran en riesgo alto de desarrollar esquizofrenia manifiesta. Esto permite la iniciación de terapia apropiada, por ejemplo antipsicóticos en dosis baja, o medidas preventivas, v.g. la gestión de factores de riesgo tales como estrés, uso de fármacos ilícitos o infecciones virales. Estos métodos se han reconocido como métodos mejoradores del resultado y pueden evitar la aparición manifiesta del trastorno.

15 Los métodos de monitorización con biomarcadores, biosensores y kits son también vitales como herramientas de monitorización del paciente, para permitir al médico determinar si el relapso es debido a una aparición súbita genuina o empeoramiento de la enfermedad, acatamiento deficiente del paciente o abuso de sustancias. Si se evalúa que el tratamiento farmacológico es inadecuado, entonces puede restablecerse o aumentarse la terapia. Para una enfermedad de aparición súbita genuina, puede producirse un cambio en la terapia en caso apropiado. Dado que el biomarcador es sensible al estado del trastorno, el mismo proporciona una indicación del impacto de la terapia con el fármaco o del abuso de sustancias.

20

Las tecnologías de cribado de alta capacidad basadas en los biomarcadores, usos y métodos de la invención, v.g. configuradas en un formato de red, son adecuadas para monitorizar biomarcadores para la identificación de compuestos terapéuticos potencialmente útiles, v.g. ligandos tales como compuestos naturales, compuestos químicos sintéticos (v.g. de genotecas combinatorias), péptidos, anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos de los mismos, capaces de modular la expresión de los biomarcadores.

25

El término "biomarcador" significa un indicador distintivo biológico o derivado biológicamente de un proceso, evento o afección. Los biomarcadores peptídicos pueden utilizarse en métodos de diagnosis, v.g. cribado clínico, y evaluación de prognosis; y en monitorización de los resultados de una terapia, a fin de identificar los pacientes que responden más probablemente a un tratamiento terapéutico particular, así como en el cribado y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y usos de los mismos son valiosos para identificación de nuevos tratamientos con fármacos y para descubrimiento de nuevas dianas para tratamiento con fármacos.

30

La expresión "paciente naif a los fármacos" como se utiliza en esta memoria, significa un individuo que no ha sido tratado con sustancia terapéutica alguna contra la esquizofrenia. En un ejemplo preferido, la exposición se refiere a un método en el cual la muestra de test procede de un individuo de test en el cual el individuo de test es un individuo de primera aparición naif a los fármacos, y la muestra se toma antes de la administración de cualquier terapia anti-esquizofrénica al individuo. En un ejemplo, el individuo es naif a los fármacos. La muestra de control es preferiblemente una muestra de un individuo normal.

35

El término "diagnosis", como se utiliza en esta memoria, abarca identificación, confirmación, y/o caracterización de un trastorno esquizofrénico o predisposición al mismo. El término "predisposición", como se utiliza en esta memoria, significa que un individuo no padece en la actualidad el trastorno, pero es propenso a verse afectado por el trastorno con el tiempo. Los métodos de diagnosis son útiles para confirmar la existencia de un trastorno, o la predisposición al mismo. Los métodos de diagnosis son útiles también en métodos para evaluación de cribado clínico, prognosis, elección de terapia, evaluación de beneficio terapéutico, es decir, para cribado de fármacos y desarrollo de fármacos.

40

La expresión "trastorno psicótico", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un trastorno en el cual la psicosis es un síntoma reconocido, que incluye trastornos neuropsiquiátricos (depresión psicótica y otros episodios psicóticos) y del desarrollo neurológico (especialmente trastornos de espectro autista), trastornos neurodegenerativos, depresión, manía, y en particular, trastornos esquizofrénicos (esquizofrenia paranoide, catatónica, desorganizada, no diferenciados y residual) y trastornos bipolares.

50

Muestras biológicas que pueden testarse en un método de la invención incluyen sangre entera, suero o plasma sanguíneo, orina, saliva, fluido cerebroespinal (CSF) u otro fluido corporal (heces, fluido lacrimal, fluido sinovial, esputo), aliento, v.g., como aliento condensado, o un extracto o purificación del mismo, o dilución del mismo. Las muestras biológicas incluyen también homogeneizados de tejido, secciones de tejido y especímenes de biopsia de un individuo vivo, o tomados post-mortem. Las muestras se pueden preparar, por ejemplo en caso apropiado diluidas o concentradas, y guardarse de la manera usual.

55

Pueden utilizarse cierto número de técnicas espectroscópicas para generar espectros, que incluyen espectroscopia NMR y espectrometría de masas. En métodos preferidos, el análisis espectral se realiza por espectroscopia NMR,

preferiblemente espectroscopia ^1H NMR. Pueden generarse uno o más espectros; puede medirse un conjunto de espectros, con inclusión de uno para moléculas pequeñas y otro para perfiles de macromoléculas. Los espectros obtenidos pueden someterse a técnicas de edición espectral. Pueden realizarse espectroscopias NMR mono- o bi-dimensionales.

- 5 Una ventaja de la utilización de la espectroscopia NMR para estudiar biomixturas complejas es que las medidas pueden realizarse a menudo con preparación mínima de la muestra (usualmente sólo con la adición de 5-10% de D_2O) y puede obtenerse un perfil analítico detallado de la muestra biológica entera.

Los volúmenes de muestra son pequeños, típicamente 0,3 a 0,5 ml para sondas estándar, y tan bajos como 3 μl para microsondas. La adquisición de los espectros NMR simples es rápida y eficiente utilizando tecnología de inyección de flujo. Usualmente es necesario suprimir la resonancia NMR del agua.

- 10 La espectroscopia NMR de alta resolución (en particular ^1H NMR) es particularmente apropiada. Las principales ventajas de la utilización de espectroscopia ^1H NMR son la velocidad del método (obteniéndose los espectros en 5 a 10 minutos); el requerimiento de una preparación mínima de la muestra, y el hecho de que la misma proporciona un detector no selectivo para todos los metabolitos en el biofluido con indiferencia de su tipo estructural, con la única condición de que los mismos estén presentes por encima del límite de detección del experimento NMR y que contengan átomos de hidrógeno no intercambiables.

Los estudios NMR de fluidos corporales deberían realizarse idealmente en condiciones del campo magnético máximo disponible para obtener dispersión y sensibilidad máximas, y la mayoría de los estudios ^1H NMR se realizan a 400 MHz o más, v.g. 600 MHz.

- 20 Usualmente, para asignar los espectros ^1H NMR, se realiza una comparación con espectros de control de materiales auténticos y/o por adición estándar de un estándar de referencia auténtico a la muestra. Los espectros de control empleados pueden ser espectros de control normales, generados por análisis espectral de una muestra biológica de un individuo normal, y/o espectros de control de trastornos psicóticos, generados por análisis espectral de una muestra biológica de un individuo que padece un trastorno psicótico.

- 25 La confirmación adicional de asignaciones se busca usualmente por aplicación de otros métodos NMR, que incluyen, por ejemplo, métodos NMR bidimensionales (2D), particularmente COSY (espectroscopia de correlación), TOCSI (espectroscopia de correlación total), métodos de correlación heteronuclear detectada con inversión tales como HMBC (correlación heteronuclear de enlaces múltiples), HSQC (coherencia cuántica heteronuclear simple), y HMQC (coherencia cuántica heteronuclear múltiple), métodos 2D de resolución J (JRES), métodos espín-eco, edición de relajación, edición por difusión (v.g., tanto 1D NMR como 2D NMR, tales como TOCSY editada por difusión), y filtración cuántica múltiple.

Por comparación de los espectros con espectros de control normales y/o de trastornos psicóticos, los espectros de test pueden clasificarse como de perfil normal, perfil de trastorno psicótico, o perfil de predisposición a trastornos psicóticos.

- 35 La comparación de los espectros puede realizarse sobre espectros enteros o sobre regiones seleccionadas de los espectros. La comparación de los espectros puede implicar una evaluación de la variación en regiones espectrales sensibles a la desviación con respecto al perfil espectral normal, y en particular la evaluación de la variación en uno o más biomarcadores dentro de dichas regiones.

- 40 Un factor limitante en la comprensión de la información bioquímica tanto de los espectros de biofluidos NMR 1D como 2D, tales como plasma, es su complejidad. La vía más eficiente para comparar e investigar estos datos multiparamétricos complejos consiste en emplear el método metabonómico NMR 1D o 2D, en combinación con métodos de "reconocimiento de patrones" (PR) basados en computadora, y sistemas expertos.

- 45 Aunque la utilidad del método metabonómico está perfectamente establecida, su potencial total no ha sido aprovechado hasta ahora. La variación metabólica es a menudo sutil, y se requieren métodos potentes de análisis para detección de analitos particulares, especialmente cuando los datos (v.g., los espectros NMR) son tan complejos.

- 50 Los métodos metabonómicos (que emplean análisis estadísticos multivariantes y técnicas de reconocimiento de patrones (PR), y opcionalmente técnicas de filtración de datos) de análisis de los datos (v.g. espectros NMR) de una población de test producen modelos matemáticos exactos que pueden utilizarse subsiguientemente para clasificar una muestra o individuo de test, y/o en diagnosis.

- 55 La comparación de los espectros puede incluir uno o más análisis quimiométricos de los espectros. El término "quimiométricos" se aplica para describir el uso de métodos de reconocimiento de patrones (PR) y métodos estadísticos multivariantes afines para datos numéricos químicos. La comparación puede comprender por tanto uno o más métodos de análisis de reconocimiento de patrones, que pueden ser realizados por uno o más métodos supervisados y/o no supervisados.

Los métodos de reconocimiento de patrones (PR) pueden utilizarse para reducir la complejidad de series de datos, para generar hipótesis científicas y para testar hipótesis. En general, el uso de algoritmos de reconocimiento de patrones permite la identificación, y, con algunos métodos, la interpretación de cierto comportamiento no aleatorio en un sistema complejo que puede oscurecerse por ruido o variaciones aleatorias en los parámetros que definen el sistema. Asimismo, el número de parámetros utilizados puede ser muy grande, de tal modo que la visualización de las regularidades o irregularidades, que para el cerebro humano es óptima en no más de 3 dimensiones, puede ser difícil.

Usualmente el número de descriptores medidos es mucho mayor que tres y por tanto no pueden utilizarse representaciones gráficas de dispersión simple para visualizar cualquier similitud o disparidad entre las muestras. Los métodos de reconocimiento de patrones han sido utilizados ampliamente para caracterizar muchos tipos diferentes de problema comprendidos por ejemplo dentro de la lingüística, la huella genética, la química y la psicología.

En el contexto de los métodos descritos en esta memoria, el reconocimiento de patrones es el uso de estadísticas multivariantes, tanto paramétricas como no paramétricas, para analizar datos espectroscópicos, y por consiguiente para clasificar muestras y predecir el valor de cierta variable dependiente basándose en una gama de medidas observadas. Existen dos enfoques principales. Una serie de métodos se denomina "no supervisada" y éstos reducen simplemente la complejidad de los datos de una manera racional y producen también gráficas de presentación que pueden ser interpretadas por el ojo humano. El otro enfoque se denomina "supervisado", en el que una serie de muestras de aprendizaje con clase o resultado conocido se utiliza para producir un modelo matemático y este se evalúa luego con series de datos de validación independiente.

Las técnicas no supervisadas se utilizan para establecer si existe cualquier agrupación intrínseca dentro de una serie de datos y están constituidas por métodos que mapean las muestras, a menudo por reducción de dimensiones, según sus propiedades, sin referencia a ninguno otro conocimiento independiente, v.g. sin conocimiento previo de la clase de muestra. Ejemplos de métodos no supervisados incluyen el análisis de componentes principales (PCA), el mapeado no lineal (NLM) y métodos de agrupación tales como análisis jerárquico de agrupaciones.

Una de las técnicas PR no supervisadas más útiles y fácilmente aplicadas es el análisis de componentes principales (PCA) (véase, por ejemplo, Kowalski *et al.*, 1986). Los componentes principales (PCs) son variables nuevas creadas a partir de combinaciones lineales de las variables iniciales con coeficientes de ponderación apropiados. Las propiedades de estos PCs son tales que: (i) cada PC es ortogonal con respecto a (no correlacionado con) la totalidad de los restantes PCs, y (ii) el primer PC contiene la mayor parte de la varianza de la serie de datos (contenido de información) conteniendo los PCs subsiguientes cantidades correspondientemente menores de la varianza.

El PCA, una técnica de reducción de dimensiones) parte de n objetos o muestras, descritos cada uno por valores en K dimensiones (vectores de descripción), y extrae una serie de vectores propios, que son combinaciones lineales de los vectores de descripción. Los vectores propios y valores propios se obtienen por diagonalización de la matriz de covarianza de los datos. Los vectores propios pueden considerarse como una nueva serie de ejes ortogonales de representación gráfica, denominados componentes principales (PCs). La extracción de las variaciones sistemáticas en los datos se realiza por proyección y modelización de la estructura de varianza y covarianza de la matriz de datos. El eje primario es un vector propio simple que describe la variación máxima en los datos, y se denomina componente principal uno (PC1). PCs subsiguientes, clasificados por valor propio decreciente, describen una variabilidad sucesivamente menor. La variación en los datos que no ha sido descrita por los PCs se denomina varianza residual y significa el grado de bondad con que el modelo se ajusta a los datos. Las proyecciones de los vectores descriptores sobre los PCs se definen como registros, que revelan la relación entre las muestras u objetos. En una representación gráfica (una "gráfica de registros" o proyección de vector propio), los objetos o muestras que tienen vectores descriptores similares se agruparán en racimos. Otra representación gráfica se conoce como una gráfica de cargas, y ésta conecta los PCs con los vectores descriptores individuales, y presenta a la vez la importancia de cada vector descriptor para la interpretación de un PC y la relación entre vectores descriptores en dicho PC. De hecho, un valor de carga es simplemente el coseno del ángulo que forma el vector descriptor original con el PC.

Los vectores descriptores que caen cerca del origen en esta gráfica proporcionan poca información en el PC, mientras que los vectores descriptores distantes del origen (carga alta) son importantes para la interpretación. Así pues, una gráfica de los dos o tres primeros registros del PC proporciona la representación "óptima", en términos de contenido de información, de la serie de datos en dos o tres dimensiones, respectivamente. Una gráfica de los primeros registros de los dos componentes principales, PC1 y PC2, proporciona el contenido máximo de información de los datos en dos dimensiones. Tales mapas PC pueden utilizarse para visualizar el comportamiento de agrupación inherente, por ejemplo, para fármacos y toxinas basados en semejanza de sus respuestas metabólicas y por consiguiente su mecanismo de acción. Por supuesto, la información de agrupación puede encontrarse en PCs menores y éstos pueden examinarse también.

El Análisis Jerárquico de Agrupaciones, otro método de reconocimiento de patrones no supervisado, permite la agrupación de puntos de datos que son similares en virtud de estar "próximos" unos a otros en cierto espacio

multidimensional. Los puntos de datos individuales pueden ser, por ejemplo, las intensidades de señal para picos particulares asignados en un espectro NMR. Se construye una "matriz de semejanza" S , con elementos $s_{ij} = 1 - r_{ij}/r_{ijmax}$ donde r_{ij} es la distancia interpuntual entre los puntos i y j (v.g., la distancia euclídea interpuntual), y r_{ijmax} es la distancia interpuntual máxima para todos los puntos.

- 5 El par de puntos más distante tendrá s_{ij} igual a 0, dado que r_{ij} es igual entonces a r_{ijmax} . Inversamente, el par de puntos más próximo tendrá el s_{ij} máximo, aproximándose a 1. La matriz de semejanza se escanea para el par de puntos más próximo. El par de puntos se consigna con su distancia de separación, y a continuación se delecionan los dos puntos y se reemplazan con un solo punto combinado. El proceso se repite luego iterativamente hasta que queda un solo punto. Cierta número de métodos diferentes pueden utilizarse para determinar de qué modo pueden unirse dos agrupaciones, por inclusión del método del vecino más próximo (conocido también como método de un solo enlace), el método más próximo adicional, y el método centroide (que incluye enlace centroide, enlace incremental, enlace mediano, enlace medio del grupo, y variaciones de enlace flexibles).

- 10 Las conectividades comunicadas se representan luego gráficamente como un dendrograma (un gráfico de tipo árbol que permite la visualización de la agrupación), que representa conectividades muestra-muestra frente a la distancia de separación creciente (o equivalentemente, frente a semejanza decreciente). En el dendrograma, las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias entre las diversas agrupaciones y por consiguiente la longitud de las ramas que enlazan una muestra a la siguiente es una medida de su semejanza. De este modo, los puntos de datos similares pueden identificarse algorítmicamente.

- 15 Los métodos de análisis supervisados utilizan la información de clase dada para un conjunto de aprendizaje de datos de muestras para optimizar la separación entre dos o más clases de muestra. Estas técnicas incluyen modelización suave independiente de la analogía de clase, métodos de mínimos cuadrados parciales (PLS), tales como la proyección al análisis discriminante latente (PLS DA), el análisis del vecino k más próximo y redes neurales. Las redes neurales son un método no lineal de modificación de datos. Se utiliza un conjunto de datos de aprendizaje para desarrollar algoritmos que 'aprenden' la estructura de los datos y pueden hacer frente a funciones complejas.
- 20 Varios tipos de red neural han sido aplicados con éxito para predecir toxicidad o enfermedad a partir de información espectral.

Técnicas estadísticas tales como el análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA) pueden emplearse también para analizar los datos.

- 25 Los métodos de la invención que implican análisis espectral pueden realizarse para proporcionar espectros a partir de muestras biológicas tomadas en dos o más ocasiones a partir de un individuo de test. Los espectros de muestras biológicas tomadas en dos o más ocasiones de un individuo de test pueden compararse para identificar diferencias entre los espectros de muestras tomadas en ocasiones diferentes. Los métodos pueden incluir análisis de espectros de muestras biológicas tomadas en dos o más ocasiones de un individuo de test a fin de cuantificar el nivel de uno o más biomarcadores presentes en las muestras biológicas, y comparar el nivel del uno o más biomarcadores presentes en muestras biológicas tomadas en dos o más ocasiones. En una realización, el nivel de cada biomarcador se cuantifica en una muestra ulterior tomada del individuo.

- 30 Los métodos de diagnóstico y monitorización son útiles en métodos de evaluación de la prognosis de un trastorno esquizofrénico, en métodos de monitorización de la eficacia de una sustancia terapéutica administrada en un individuo que padece, se sospecha que padece, o que está predispuesto a, un trastorno esquizofrénico y en métodos de identificación de una resonancia antipsicótica o pro- psicótica. Tales métodos pueden comprender comparar el nivel del uno o más biomarcadores en una muestra biológica de test tomada de un individuo de test con el nivel presente en una o más muestras tomadas del individuo de test antes de la administración de la sustancia, y/o una o más muestras tomadas del individuo de test en una etapa anterior durante el tratamiento con la sustancia.
- 35 Adicionalmente, estos métodos pueden comprender la detección de un cambio en el nivel del uno o más biomarcadores en muestras biológicas tomadas de un individuo de test en dos o más ocasiones.

En los métodos, en particular aquéllos en los cuales se emplea análisis espectral, y en particular cuando la muestra biológica es sangre o se deriva de sangre, v.g. plasma o suero, un biomarcador adecuado es como se enumera en esta memoria.

- 40 Un método puede comprender la comparación del nivel de uno o más biomarcadores en una muestra biológica tomada de un individuo de test con el nivel presente en una o más muestras tomadas del individuo de test antes del comienzo de una terapia, y/o una o más muestras tomadas del individuo de test en una etapa anterior de una terapia. Tales métodos pueden comprender la detección de un cambio en la cantidad del uno o más biomarcadores en muestras tomadas en dos o más ocasiones. Métodos como los expuestos son particularmente útiles en la evaluación de terapias anti-psicóticas.

- 45 Un método de diagnóstico o de monitorización puede comprender la cuantificación del uno o más biomarcadores en una muestra biológica de test tomada de un individuo de test, y comparar el nivel del uno o más biomarcadores presentes en dicha muestra de test con uno o más controles. El control puede seleccionarse de un control normal y/o un control de trastorno psicótico. El control utilizado en un método puede ser uno o más controles seleccionados

del grupo constituido por: el nivel del biomarcador encontrado en una muestra de control normal de un individuo normal, un nivel de biomarcador normal; una gama de biomarcadores normales, el nivel en una muestra de un individuo con un trastorno esquizofrénico, trastorno bipolar, trastorno de tipo psicótico, o una predisposición diagnosticada a ellos; un nivel de marcador de trastorno esquizofrénico, un nivel de marcador de trastorno bipolar, un nivel de marcador de trastorno de tipo psicótico, una gama de marcadores de trastorno esquizofrénico, una gama de marcadores de trastorno bipolar y una gama de marcadores de trastorno de tipo psicótico.

Las muestras biológicas pueden tomarse a intervalos a lo largo del resto de la vida, o una parte de la misma, de un individuo. Convenientemente, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras de un individuo sometido a diagnosis o monitorización será 3 días, 5 días, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, 3 meses, 6 ó 12 meses. Las muestras pueden tomarse antes de y/o durante y/o después de una terapia anti-psicótica, tal como una terapia de trastorno anti-esquizofrénico.

La medida del nivel de un biomarcador puede realizarse por cualquier método adecuado para identificar la cantidad del biomarcador en una muestra biológica tomada de un paciente o una purificación o extracto de la muestra o una dilución de la misma. La medición del nivel de un biomarcador presente en una muestra puede incluir la determinación de la concentración del biomarcador presente en la muestra. Dicha cuantificación puede realizarse directamente sobre la muestra, o indirectamente sobre un extracto de la misma, o sobre una dilución de la misma. En los métodos, además de medir la concentración del biomarcador en una muestra biológica, que es preferiblemente sangre entera, plasma o suero, la concentración del biomarcador puede testarse en una muestra biológica diferente tomada del individuo de test, v.g. CSF, orina, saliva, u otro fluido corporal (heces, fluido lacrimonal, fluido sinovial, esputo), aliento, v.g., como aliento condensado, o un extracto o purificación del mismo, o dilución del mismo. Las muestras biológicas incluyen también homogeneizados de tejido, secciones de tejido y especímenes de biopsia de un individuo vivo, o tomadas post-mortem. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo en caso apropiado diluidas o concentradas, y guardarse de la manera usual.

Los niveles de biomarcadores pueden ser medidos por uno o más métodos seleccionados del grupo constituido por: métodos espectroscópicos tales como NMR (resonancia magnética nuclear), o espectroscopia de masas (MS); SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), un análisis 1-D basado en gel, un análisis 2-D basado en gel, cromatografía líquida (v.g. cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de baja presión (LPLC)), cromatografía en capa delgada, y técnicas basadas en LC-MS. Técnicas LC MS apropiadas incluyen ICAT® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.), o iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.).

La medida de un biomarcador puede realizarse por un método de detección directo o indirecto. Un biomarcador puede detectarse directa, o indirectamente, por interacción con uno o más ligandos, tal como una enzima, un receptor de fijación o proteína de transporte, anticuerpo, péptido, aptámero, u oligonucleótido, o cualquier receptor o compuesto químico sintético capaz de fijar específicamente el biomarcador. El ligando puede poseer una etiqueta detectable, tal como una etiqueta luminiscente, fluorescente o radiactiva y/o un identificador de afinidad.

El término "anticuerpo", como se utiliza en esta memoria incluye, pero sin carácter limitante: 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 fijación de epítipo de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo", como se utiliza en esta memoria, se refiere también a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se fija específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (v.g., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclases de molécula de inmunoglobulina.

Los biomarcadores de metabolitos como se describen en esta memoria se miden convenientemente por métodos convencionales químicos o enzimáticos (que pueden ser directos o indirectos y/o pueden o no estar acoplados), electroquímicos, fluorimétricos, luminométricos, espectrofotométricos, fluorimétricos, luminométricos, espectrométricos, polarimétricos, cromatográficos (v.g. HPLC) o técnicas similares.

Para los métodos enzimáticos, el consumo de un sustrato en la reacción, o la generación de un producto de la reacción, puede detectarse, directa o indirectamente, como medio de medida.

En una realización, el nivel de proteínas plasmáticas se detecta por uno o más métodos seleccionados de absorbancia ultravioleta y un método colorimétrico.

Los biomarcadores de la invención se detectan y se miden preferiblemente utilizando técnicas basadas en espectrometría de masas; técnicas basadas en cromatografía; sistemas de detección enzimáticos (por medidas directa o indirecta); o utilizando sensores, v.g. con sistemas sensores con transductores amperométricos, potenciométricos, conductimétricos, de impedancia, magnéticos, ópticos, acústicos o térmicos.

Un sensor puede incorporar un sistema de detección físico, químico o biológico. Un ejemplo de un sensor es un biosensor, es decir un sensor con un sistema de reconocimiento biológico, v.g., basado en un ácido nucleico, tal como una sonda oligonucleotídica o aptámero, o una proteína tal como una enzima, proteína de fijación, proteína receptora, proteína de transporte o anticuerpo.

El biosensor puede incorporar un método inmunológico para detección del biomarcador, una tecnología eléctrica, térmica, magnética, óptica (v.g. holograma) o acústica. Utilizando tales biosensores, es posible detectar el biomarcador diana a las concentraciones previstas encontradas en muestras biológicas.

5 Los métodos de la descripción son adecuados para cribado clínico, evaluación de prognosis, monitorización de los resultados de una terapia, identificación de pacientes más propensos a responder a un tratamiento terapéutico particular, para cribado y desarrollo de fármacos, y para facilitar la identificación de nuevas dianas para tratamiento con fármacos. La identificación de biomarcadores clave específicos para una enfermedad es fundamental para la integración de procedimientos de diagnosis y regímenes terapéuticos.

10 Los métodos pueden comprender adicionalmente una o más evaluaciones para diagnosticar y/o monitorizar un trastorno esquizofrénico en un individuo. La evaluación puede ser una evaluación clínica, realizada por un profesional de clínica según protocolos de evaluación aceptados, v.g. registro de funcionamiento global (GAF) o SCID, y/o puede implicar una auto-evaluación por el individuo. Pueden utilizarse escalas de clasificación para ayudar a la diagnosis y/o monitorización. GAF y SCID se evalúan sobre la base de una entrevista clínica. Se prefiere que las evaluaciones, tales como el registro de funcionamiento global, se realicen en el momento (es decir el mismo día que) o alrededor del momento (es decir dentro de varios días de) de la recogida de la muestra biológica de test del individuo. Esto es particularmente útil como herramienta para diagnóstico y monitorización de individuos del sexo femenino, en los cuales se ha encontrado que los niveles de VLDL y LDL tienen una correlación inversa muy estrecha con la evaluación clínica tal como se determina por registro de funcionamiento global.

20 Utilizando biomarcadores predictivos tales como los descritos en esta memoria, pueden desarrollarse herramientas diagnósticas apropiadas tales como sensores y biosensores, y según ello, en los métodos y usos de la invención, la detección y cuantificación de uno o más biomarcadores puede realizarse utilizando un sensor o biosensor.

25 El sensor o biosensor puede incorporar métodos y sistemas de detección como se describen en esta memoria para la detección del biomarcador. Los sensores o biosensores pueden emplear tecnologías eléctricas (v.g. sistemas de detección amperométricos, potenciométricos, conductimétricos, o de impedancia), térmicas (v.g. transductores), magnéticas, ópticas (v.g. hologramas) o acústicas. En un sensor o biosensor según la invención el nivel de uno, dos o tres biomarcadores puede detectarse por uno o más métodos seleccionados de: técnicas enzimáticas directas, indirectas o acopladas, espectrofotométricas, fluorimétricas, luminométricas, espectrométricas, polarimétricas y cromatográficas. Sensores o biosensores particularmente preferidos comprenden una o más enzimas utilizadas directa o indirectamente por la vía de un mediador, o utilizando una proteína de fijación, receptora o transportadora, acoplada a un transductor eléctrico, óptico, acústico, magnético o térmico. Utilizando tales biosensores, es posible detectar el nivel de biomarcadores diana a las concentraciones anticipadas que se encuentran en muestras biológicas.

35 Un biomarcador puede detectarse utilizando un sensor o biosensor que incorpore tecnologías basadas en hologramas "inteligentes", o sistemas acústicos de alta frecuencia (siendo tales sistemas particularmente susceptibles de configuraciones en "código de barras" o de red. En los sensores de hologramas inteligentes (Smart Holograms Ltd., Cambridge, Reino Unido), se almacena una imagen holográfica en un film delgado de polímero que está sensibilizado para reaccionar específicamente con el biomarcador. Durante la exposición, el biomarcador reacciona con el polímero conduciendo a una alteración en la imagen presentada por el holograma. La lectura resultante del test 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 del sensor puede ser leído a simple vista, eliminando de este modo la necesidad de equipo de detección. Puede utilizarse un sensor monocolor para leer la señal cuando se requieren medidas cuantitativas. La opacidad o el color de la muestra no interfiere con la operación del sensor. El formato del sensor permite el multiplexado para detección simultánea de varias sustancias. Pueden diseñarse sensores reversibles e irreversibles para satisfacer requerimientos diferentes, y es factible la monitorización continua de un biomarcador particular de interés.

45 Convenientemente, los biosensores para detección del biomarcador están acoplados, es decir, combinan el reconocimiento biomolecular con medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores pueden estar adaptados para testado de diagnosis de "sitios alternados", v.g. en la sala hospitalaria, en el departamento de pacientes ambulatorios, cirugía, hogar, campo y puesto de trabajo.

Los biosensores para detectar el biomarcador incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmones, holográficos y de microingeniería. Pueden emplearse elementos de reconocimiento impresos, tecnología de transistores de película fina, dispositivos de resonadores magneto-acústicos y otros sistemas nuevos acústico-eléctricos en los biosensores para detección de los biomarcadores.

55 Los métodos que implican la detección y/o cuantificación del biomarcador pueden realizarse utilizando instrumentos de sobremesa, o pueden incorporarse en plataformas desechables, de diagnosis o de monitorización que pueden utilizarse en un ambiente distinto del laboratorio, v.g. en la consulta del médico o junto a la cama del paciente. Sensores o biosensores adecuados para la realización de los métodos de la invención incluyen tarjetas de "crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los sensores o biosensores pueden configurarse para permitir que los datos

recogidos sean transmitidos electrónicamente al médico para interpretación y por consiguiente puedan constituir la base para e-neuromedicina.

5 Los métodos para monitorización de la eficacia de una terapia pueden utilizarse para monitorizar la eficacia terapéutica de terapias existentes y nuevas terapias en individuos humanos y en animales no humanos (v.g. en modelos animales). Estos métodos de monitorización pueden incorporarse en métodos de cribado para nuevas sustancias fármaco y combinaciones de sustancias.

Un aumento en el nivel del biomarcador peptídico en la muestra de test con relación al nivel en una muestra de test previa tomada anteriormente del mismo individuo de test es indicativo de un efecto beneficioso, v.g. estabilización o mejora, de dicha terapia en cuanto al trastorno, trastorno sospechado o predisposición al mismo.

10 Convenientemente, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras de un individuo sometido a diagnosis o monitorización será 3 días, 5 días, una semana, 2 semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 ó 12 meses. Pueden tomarse muestras antes de y/o durante y/o después de una terapia de trastorno anti-esquizofrénico. Las muestras pueden tomarse a intervalos a lo largo del resto de la vida, o una parte de la misma, de un individuo.

15 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 puede realizarse directamente sobre la muestra, o indirectamente sobre un extracto de la misma, o sobre una dilución de la misma.

20 La detección y/o cuantificación puede realizarse por cualquier método adecuado para identificar la presencia y/o cantidad de una proteína específica en una muestra biológica de un paciente o una purificación de un extracto de una muestra biológica o una dilución de la misma. En los métodos, la cuantificación puede realizarse por medida de la concentración del biomarcador peptídico en la muestra o muestras. Muestras biológicas que pueden ensayarse en un método de la invención incluyen fluido cerebroespinal (CSF), sangre entera, suero sanguíneo, orina, saliva, u otro fluido corporal (heces, fluido lacrimal, fluido sinovial, esputo), aliento, v.g. como aliento condensado, o un extracto o purificación del mismo, o dilución del mismo. Las muestras biológicas incluyen también homogeneizados de tejidos, secciones tisulares, y especímenes de biopsia de un individuo vivo, o tomadas post-mortem. Preferiblemente, la muestra es CSF o suero sanguíneo. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, en caso apropiado diluidas o concentradas, y guardarse de la manera usual.

25 La detección y/o cuantificación de biomarcadores peptídicos puede realizarse por detección del biomarcador peptídico o de un fragmento del mismo, v.g. un fragmento con truncación C-terminal, y/o con truncación N-terminal. Los fragmentos son usualmente de longitud mayor que 4 aminoácidos. Preferiblemente, los fragmentos están comprendidos en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud.

30 El biomarcador puede detectarse directamente, v.g. por SELDI o MALDI-TOF. Alternativamente, el biomarcador puede detectarse, directa o indirectamente, por interacción con un ligando o ligandos tal como un anticuerpo o fragmento de fijación de biomarcador del mismo, u otro péptido, o ligando, v.g. aptámero, u oligonucleótido, capaz de fijar específicamente el biomarcador. El ligando puede poseer una etiqueta detectable, tal como una etiqueta luminiscente, fluorescente o radiactiva, y/o un identificador de afinidad. Los ligandos incluyen, por ejemplo:

(1) *In vivo*: T3, T4 (hormonas tiroideas), vitamina A (indirectamente por interacción con proteína sérica fijadora de retinol), apolipoproteína A1 (Apo1), productos de oxidación de noradrenalina, y pterinas.

35 (2) *In vitro* (la mayoría de ellos agentes farmacológicos): algunos fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), contaminantes ambientales, tales como bifenilos polihalogenados y compuestos tiromiméticos, derivados de xantona, así como flavonoides naturales y sintéticos.

40 Por ejemplo, métodos relacionados con la detección, monitorización, diagnosis y/o cuantificación pueden llevarse a cabo por uno o más métodos seleccionados del grupo constituido por: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), un análisis 1-D basado en gel, un análisis 2-D basado en gel, espectrometría de masas (MS), y técnicas basadas en LC y LC-MS. Técnicas LC MS apropiadas incluyen ICAT® (Applied Biosystems, CA, USA), o iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, USA).

45 Podrían utilizarse también la cromatografía líquida (v.g. cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de baja presión (LPLC)), cromatografía de capa delgada, y espectroscopia NMR (resonancia magnética nuclear).

50 Métodos para diagnosis o monitorización pueden comprender el análisis de una muestra biológica, v.g. fluido cerebroespinal (CSF) o suero, por SELDI-TOF, MALDI-TOF y otros métodos utilizando espectrometría de masas para detectar la presencia o nivel del biomarcador peptídico. Tales técnicas pueden utilizarse para cuantificación relativa y absoluta así como para evaluar la ratio del biomarcador con otros biomarcadores que puedan estar presentes. Estos métodos son adecuados también para cribado clínico, prognosis, monitorización de los resultados de la terapia, identificación de pacientes que responden más probablemente a un tratamiento terapéutico particular, para cribado y desarrollo de fármacos, e identificación de nuevas dianas para tratamiento con fármacos.

55

- La espectrometría de masas por desorción-ionización láser mejorada en superficie (SELDI) es una herramienta poderosa para identificación de una "huella dactilar" característica de proteínas y péptidos en fluidos y tejidos corporales para una afección dada, v.g. tratamientos con fármacos y enfermedades. Esta tecnología utiliza chips de proteínas para capturar proteínas/péptidos y un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (tof-MS) a fin de cuantificar y calcular la masa de compuestos que van desde moléculas pequeñas y péptidos de menos de 1000 Da hasta proteínas de 500 kDa. Diferencias cuantificables en patrones proteína/péptido pueden evaluarse estadísticamente utilizando programas automáticos de computadora que representan cada proteína/péptido medido en el espectro biofluido como una coordenada en un espacio multi-dimensional. Este método ha alcanzado gran éxito en el campo del descubrimiento de biomarcadores clínicos, dado que puede utilizarse como herramienta de diagnóstico sin conocer la identidad de los biomarcadores. El sistema SELDI tiene también capacidad para ejecutar centenares de muestras en un solo experimento. Adicionalmente, todas las señales de la espectrometría de masas SELDI se derivan de proteínas/péptidos naturales (al contrario que algunas otras tecnologías de proteómica que requieren digestión con proteasas), reflejando así directamente la fisiología subyacente de una afección dada.
- La detección y/o cuantificación del biomarcador peptídico puede realizarse utilizando cualquier método basado en reconocimiento inmunológico, peptídico, de aptámeros o sintético. Por ejemplo, el método puede implicar un anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de fijarse específicamente al biomarcador peptídico.
- Cualquier animal adecuado puede utilizarse como individuo. El mismo puede ser un animal humano o no humano, por ejemplo un primate no humano, caballo, vaca, cerdo, cabra, pez cebra, oveja, perro, gato, pez, roedor, v.g. cobayo, rata o ratón, insecto (v.g. *Drosophila*), anfibio (v.g. *Xenopus*) o *C. elegans*.
- Cuando se utiliza en un método de identificación, la sustancia de test puede ser una sustancia química o farmacéutica conocida, tal como, pero sin carácter limitante, un agente terapéutico para un trastorno anti-esquizofrénico, o una entidad química sintética o natural, o una combinación de dos o más de las sustancias indicadas anteriormente.
- La identificación de una sustancia capaz de estimular, promover o activar la generación de un biomarcador peptídico, en un individuo, puede comprender la exposición de una célula de test a una sustancia de test y monitorización de los niveles del biomarcador peptídico en dicha célula de test, o secretados por dicha célula de test. La célula de test podría ser procarionta; sin embargo, se prefiere emplear una célula eucariota en los métodos de test basados en células. Convenientemente, la célula eucariota es una célula de levadura, célula de insecto, célula de *Drosophila*, célula de anfibio (v.g. de *Xenopus*), célula de *C. elegans* o es una célula de origen humano, de primate no humano, de equino, bovino, porcino, cabrío, ovino, canino, felino, de pez, de roedor o murina. Pueden utilizarse animales no humanos o células que son capaces de expresar polipéptidos humanos.
- Los métodos de cribado abarcan también un método de identificación de un ligando capaz de fijarse a un biomarcador peptídico según la invención, que comprende incubar una sustancia de test en presencia del biomarcador peptídico en condiciones apropiadas para fijación, y detectar y/o cuantificar la fijación del péptido a dicha sustancia de test.
- Las tecnologías de cribado de alta capacidad basadas en los biomarcadores, usos y métodos de la invención, v.g. configuradas en un formato de red, patrón o signature, son adecuadas para monitorizar signatures de biomarcadores para la identificación de compuestos terapéuticos potencialmente útiles, v.g. ligandos tales como compuestos naturales, compuestos químicos sintéticos (v.g. procedentes de genotecas combinatorias), péptidos, anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos de los mismos, capaces de fijar el biomarcador.
- Los métodos pueden realizarse en un formato de red, patrón o signature, v.g. sobre un chip, o como una red multipocillo. Como se ha descrito arriba, pueden utilizarse también otras técnicas, tales como espectrometría de masas. Los métodos pueden adaptarse en plataformas para tests simples, o tests múltiples idénticos o múltiples no idénticos, y pueden realizarse en formato de alta capacidad. Los métodos de la invención pueden comprender la realización de uno o más tests diferentes adicionales para confirmar o excluir diagnóstico, y/o para caracterizar adicionalmente una afección.
- La exposición proporciona adicionalmente una sustancia, v.g. un ligando, identificado o identificable por un método de identificación o cribado. Tales sustancias pueden ser capaces de estimular, promover o activar, directa o indirectamente, la actividad de un biomarcador peptídico, o de estimular, promover o activar la generación del biomarcador peptídico. El término sustancias incluye sustancias que no fijan directamente el biomarcador peptídico e inducen directamente la expresión del biomarcador peptídico o promueven o activan una función, pero que en lugar de ello inducen indirectamente la expresión del biomarcador peptídico o promueven/activan una función del biomarcador peptídico. Los ligandos se incluyen también en el término sustancias; los ligandos (v.g. un compuesto químico natural o sintético, péptido, aptámero, oligonucleótido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) son susceptibles de fijación, preferiblemente fijación específica, a un biomarcador peptídico.
- Un kit para diagnóstico o monitorización de un trastorno esquizofrénico o predisposición al mismo puede contener uno o más componentes seleccionados de un ligando específico para un biomarcador peptídico, un biomarcador peptídico, controles, reactivos, y consumibles; opcionalmente junto con instrucciones para uso del kit.

Los términos "terapia" o "tratamiento" como se utilizan en esta memoria con referencia a los usos terapéuticos del biomarcador de la invención describen la atención o cuidado de un paciente para los propósitos de combatir una enfermedad, e incluyen la administración de los agentes activos a individuos asintomáticos, por ejemplo a fin de prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones (es decir la profilaxis).

- 5 El término "sustancia terapéutica" como se utiliza en esta memoria, define una sustancia que tiene propiedades terapéuticas, es decir curativas/beneficiosas y trata un trastorno esquizofrénico, alivia los síntomas del mismo o previene la aparición de un trastorno esquizofrénico. Así pues, la sustancia está destinada a uso en el tratamiento de la esquizofrenia.

Los ejemplos que siguen incluyen las pruebas en las que está basada la invención.

10 Ejemplo1

Este Ejemplo ilustra la utilidad de inmunoensayos sándwich miniaturizados y en paralelo, v.g. tests de Determinación del Perfil de Analitos Múltiples, sistemas de ensayo de alta sensibilidad que permiten la cuantificación exacta de un gran número de proteínas diana en fluidos corporales. Estos sistemas de ensayo multiplexados pueden reemplazar los tests simples tradicionales y permiten la determinación simultánea de un gran número de parámetros a partir de cantidades minúsculas de muestra.

15 La determinación del perfil de analitos múltiples (mapas), utilizando la plataforma de tecnología Luminex XMap® para medir los niveles de expresión relativos de 156 marcadores bioquímicos, se llevó a cabo sobre muestras de suero recogidas de pacientes esquizofrénicos de primera aparición, naïf respecto al fármaco (n = 33), pacientes prodrómicos (n = 17) y controles sanos bien identificados (n = 30). Varios marcadores bioquímicos estaban regulados significativamente hacia arriba o hacia abajo en los pacientes esquizofrénicos y/o prodrómicos de primera aparición comparados con los controles, y por consiguiente representan biomarcadores candidato para uso en el diagnóstico precoz de pacientes que sufren potencialmente esquizofrenia. Estos marcadores pueden tener también utilidad en la monitorización de pacientes durante el tratamiento o de hecho en la predicción o monitorización de la respuesta a los fármacos, eficacia, efectos secundarios y acatamiento. Los biomarcadores candidato estadísticamente significativos y los datos relevantes de expresión se resumen en las Tablas 1 a 3. El Análisis de ° Componentes Principales (PCA), utilizando 18 de los biomarcadores que cambian más significativamente, agrupa las muestras de esquizofrenia lejos de los controles con sensibilidad de 75% y selectividad de 79%. Utilizando los mismos componentes principales en las muestras de pacientes prodrómicos, se agrupan los mismos entre los esquizofrénicos y los controles.

30

Tabla 1

28 analitos cambiados en pacientes de esquizofrenia comparados con controles

Analito	Esquizofrenia	Control	Valor p	Cambio, veces
Beta-2 Microglobulina (µg/ml)	1,13 ± 0,2	1,3 ± 0,4	<i>p</i> =0,052	-1,15
BDNF (ng/ml)	19,28 ± 5,9	22 ± 5,9	<i>p</i> =0,072	-1,13
Calcitonina (pg/ml)	3,9 ± 2,3	1,8 ± 0,3	<i>p</i> =0,007	2,17
IL-13 (pg/ml)	24,69 ± 5,6	35,5 ± 12,5	<i>p</i> =0,001	-1,35
IL-7 (pg/ml)	44,54 ± 17,2	58,4 ± 23	<i>p</i> =0,009	-1,31
IL-15 (ng/ml)	0,305 ± 0,11	0,4 ± 0,1	<i>p</i> =0,009	-1,31
IL-18 (pg/ml)	122,1 ± 52,9	172,6 ± 89,7	<i>p</i> =0,010	-1,4
IL-3 (ng/ml)	0,032 ± 0,006	0,1 ± 0,023	<i>p</i> =0,070	-3,13
IL-1ra (pg/ml)	158,7 ± 146,1	90,3 ± 87,9	<i>p</i> =0,036	1,76
Linfotactina (ng/ml)	0,159 ± 0,054	0,2 ± 0,1	<i>p</i> =0,054	1,43
IgM (mg/ml)	0,68 ± 0,3	1,00 ± 0,46	<i>p</i> =0,004	-1,67
EN-RAGE (ng/ml)	92,3 ± 57,4	58,6 ± 38,2	<i>p</i> =0,009	1,57
Haptoglobina (mg/ml)	1,25 ± 0,8	0,9 ± 0,5	<i>p</i> =0,009	1,39
ICAM-1 (ng/ml)	77,9 ± 24,5	93,9 ± 21,9	<i>p</i> =0,01	
MMP-9 (ng/ml)	25,1 ± 16,7	25,8 ± 9,2	<i>p</i> =0,012	1,58
Fosfatasa ácida Prostática (ng/ml)	0,318 ± 0,11	0,4 ± 0,1	<i>p</i> =0,026	-1,25
Factor de Células Madre (pg/ml)	185,96 ± 66	218,3 ± 54,8	<i>p</i> =0,038	-1,76
Globulina de Fijación de Tiroxina (µg/ml)	57,2 ± 613,6	65,4 ± 32	<i>p</i> =0,073	-1,15
Factor Tisular (ng/ml)	0,74 ± 0,42	0,6 ± 0,2	<i>p</i> =0,045	1,23
Anticuerpo T3	1,79 ± 0,29	1,7 ± 0,33	<i>p</i> =0,085	1,05
Anticuerpo de Colágeno tipo 4	1,627 ± 0,17	1,5 ± 0,17	<i>p</i> =0,020	1,11
Anticuerpo HSP 71	2,8 ± 0,74	2,4 ± 0,63	<i>p</i> =0,042	- 1,16
Anticuerpo Jo-1	1,39 ± 0,13	1,3 ± 0,13	<i>p</i> =0,073	1,06
Anticuerpo de Paperas	9,6 ± 3,6	7,6 ± 3,6	<i>p</i> =0,031	1,26
Anticuerpo de Proteinasa 3 (cANCA)	3,8 ± 0,59	2,5 ± 0,63	<i>p</i> =0,07	
Anticuerpo RNP (c)	14,7 ± 4,15	12,5 ± 4,9	<i>p</i> =0,055	1,176
Rubéola	322 ± 143	240 ± 147	<i>p</i> =0,03	1,34
Anticuerpo SSB	2,16 ± 0,23	2,0 ± 0,26	<i>p</i> =0,027	1,08

Tabla 2

28 analitos cambiados en pacientes prodrómicos comparados con controles

Analito	Esquizofrenia	Control	Valor p	Cambio, veces
Beta-2 Microglobulina (µg/ml)	1,1 ± 0,28	1,3 ± 0,4	<i>p</i> =0,067	-1,18
BDNF (ng/ml)	17,9 ± 7,1	22 ± 5,9	<i>p</i> =0,052	-1,23
Calcitonina (pg/ml)	3,8 ± 1,4	1,8 ± 0,3	<i>p</i> =0,0009	2,11
IL-13 (pg/ml)	26,8 ± 7,7	33,5 ± 12,5	<i>p</i> =0,028	-1,25
IL-7 (pg/ml)	47,7 ± 16,9	58,4 ± 23	<i>p</i> =0,074	-1,22
Alfa-1 Antitripsina (mg/ml)	1,7 ± 0,4	2 ± 0,5	<i>p</i> =0,058	-1,18
Apolipoproteína A1 (mg/ml)	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	<i>p</i> =0,015	-1,33
CTGF (ng/ml)	5,3 ± 1,6	6,6 ± 2,9	<i>p</i> =0,0475	-1,25
Fibrinógeno (mg/ml)	0,016 ± 0,01	0,030 ± 0,019	<i>p</i> =0,0023	-1,88
G-CSF (pg/ml)	6,8 ± 2	9,2 ± 3,1	<i>p</i> =0,032	-1,35
Hormona del Crecimiento (ng/ml)	3,9 ± 4,5	1,6 ± 3,1	<i>p</i> =0,075	2,44
Glutación S- Transferasa (ng/ml)	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,3	<i>p</i> =0,015	-1,33
IgA (mg/ml)	1,1 ± 0,6	1,7 ± 1,1	<i>p</i> =0,015	-1,54
IgM (mg/ml)	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,5	<i>p</i> =0,0006	-1,67
Leptina (ng/ml)	3,1 ± 2,4	8,1 ± 7,9	<i>p</i> =0,003	-2,63
MDC (pg/ml)	274,4 ± 90,5	349,8 ± 137,9	<i>p</i> =0,03	-1,28
PAI-1 (ng/ml)	108,3 ± 50,4	145,6 ± 62,3	<i>p</i> =0,031	-1,35
RANTES (ng/ml)	17,4 ± 6,0	25,2 ± 12,7	<i>p</i> =0,0062	-1,45
Amiloide P del Suero (µg/ml)	18,2 ± 7,8	24,4 ± 11,2	<i>p</i> =0,033	-1,33
Factor de Células Madre (pg/ml)	192,4 ± 43,6	218,3 ± 54,8	<i>p</i> =0,083	-1,18
SHBG (nmol/l)	44,0 ± 32,4	93,0 ± 102,6	<i>p</i> =0,021	-2,13
TNF RII (ng/ml)	2,1 ± 0,6	2,7 ± 0,8	<i>p</i> =0,007	-1,28
Anticuerpo T3	1,91 ± 0,37	1,7 ± 0,33	<i>p</i> =0,023	1,12
Anticuerpo de Histona H4	1,88 ± 0,34	2,1 ± 0,4	<i>p</i> =0,04	-1,22
Anticuerpo HSC 70	2,2 ± 0,72	1,9 ± 0,38	<i>p</i> =0,078	1,16
Rubéola	348,0 ± 158,7	240,2 ± 147,6	<i>p</i> =0,029	1,45
Anticuerpo SSB	2,18 ± 0,21	2,0 ± 0,26	<i>p</i> =0,021	1,09
V. zóster	24,0 ± 11,7	15,8 ± 7,2	<i>p</i> =0,015	1,52

Tabla 3

9 analitos que cambian significativamente tanto en pacientes esquizofrénicos de primera aparición naïf frente al fármaco como en pacientes prodrómicos comparados con controles sanos

Analito	Esquizofrenia	Prodrómico	Control
Beta-2 Microglobulina	1,13 ± 0,2 <i>p</i> =0,052	1,1 ± 0,3 <i>p</i> =0,067	1,3 ± 0,4
BDNF	19,28 ± 5,9 <i>p</i> =0,072	17,9 ± 7,1 <i>p</i> =0,052	22 ± 5,9
Calcitonina	3,9 ± 2,3 <i>p</i> =0,007	3,8 ± 1,4 <i>p</i> =0,001	1,8 ± 0,3
IL-13	24,69 ± 5,6 <i>p</i> =0,001	26,8 ± 7,7 <i>p</i> =0,029	35,5 ± 12,5
IL-7	44,54 ± 17,2 <i>p</i> =0,009	47,7 ± 16,9 <i>p</i> =0,074	58,4 ± 23
Anticuerpo T3	1,79 ± 0,286 <i>p</i> =0,085	1,91 ± 0,368 <i>p</i> =0,023	1,7 ± 0,33
IgM	0,68 ± 0,3 <i>p</i> =0,004	0,6 ± 0,22 <i>p</i> =0,00056	1,00 ± 0,46
Rubéola	322 ± 143 <i>p</i> =0,03	348 ± 158,7 <i>p</i> =0,029	240 ± 147

- 5 El análisis de los datos del Ejemplo 1 indicaba que un subconjunto de los componentes de la reacción de fase aguda (APR) estaba alterado significativamente tanto en pacientes de esquizofrenia como en pacientes prodrómicos. Tanto las proteínas reaccionantes en la fase aguda positivas como las negativas estaban cambiadas significativamente: la haptoglobina aumentaba 1,39 veces entre los esquizofrénicos de primera aparición naïf al fármaco, y los controles ($p \leq 0,029$), el fibrinógeno disminuía -1,89 veces ($p \leq 0,02$), ICAM-1 disminuía -1,2 veces ($p \leq 0,010$), antitripsina α -1 disminuía -1,76 veces ($p = 0,058$) y el Amiloide P del suero disminuía -1,43 veces ($p = 0,033$).
- 10

Ejemplo 2

Biomarcadores candidato adicionales han sido identificados de igual manera, con los resultados siguientes:

Tabla 4

Analito	Valor p	FC
Alfa.1.Antitripsina	0,049989	1,082551
Alfa.2.Macroglobulina	9,75E-05	1,204169
ANG.2. (Angiopoyetina.2.)	0,000961	1,321552
Angiotensinógeno	0,022697	0,479122
Anticuerpo Anti-Nuclear.	0,000155	1,277376
Apolipoproteína.A1	0,012815	0,855212
Apolipoproteína.CIII	0,031684	0,84917
Apolipoproteína.H	0,023332	1,103593
ASCA. (Anticuerpo de Saccharomyces cerevisiae.)	0,026127	1,277587
BDNF. (Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro).	0,009522	0,868904
Beta.2.Microglobulina	6,09E-05	1,186813
Betacelulina	5,14E-05	2,552562
BMP.6	0,001154	2,084057
C.trachomatis	3,67E-06	1,723647
Proteína C reactiva	0,028894	2,606907

ES 2 445 591 T3

Antígeno Carcinoembrionario	0,00013	1,710968
CD40.Ligando	0,002223	0,645895
Anticuerpo de Proteína B del Centr6mero	2,73E-05	1,420568
CgA. (Cromogranina.A)	0,007539	1,296562
Toxina del C6lera.	0,002769	1,142152
Anticuerpo de Col6geno Tipo 2	0,002749	1,483716
Anticuerpo de Col6geno Tipo 4	0,009621	1,089017
Complemento.3	0,03407	1,073186
Cortisol	0,021819	1,136634
CTGF. (Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo).	0,006032	1,15326
Citomegalovirus	0,037969	1,38126
EGF	8,00E-06	0,483268
EGF.R	0,047045	1,105742
ENA.78	0,021286	1,25662
Endotelina.1	0,024661	0,432167
Eotaxina.3	0,002065	2,3159
Ant6geno Precoz del Virus Epstein. Barr	0,007651	1,554542
Eritropoyetina	0,000553	0,509612
Factor.VII	0,015475	0,873992
Ligando Fas.	0,00559	0,575667
Ferritina	0,034533	1,366948
FGF.b6sico	0,023096	0,684196
Fibrin6geno	9,57E-10	0,5385
FSH. (Hormona Estimulante del Fol6culo).	0,008361	2,435721
GM.CSF	0,026716	0,528146
GST	7,35E-09	1,305712
H.pylori	0,029218	4,081442
Haptoglobina	6,08E-05	1,655459
Hepatitis.A	0,00024	1,532017
Hepatitis.B.N6cleo	0,01446	1,274912
Hepatitis.B.Superficie.Ad.	0,000859	0,571632,
Hepatitis.B.Superficie.Ay.	0,002927	1,207407
Hepatitis.C.N6cleo	0,000144	1,578016
Hepatitis.C.NS3	0,003394	1,332285
Hepatitis.C.NS4	0,005992	1,511292
Hepatitis.D	0,011377	1,46535
Hepatitis.E.Virus.orf2.6KD.	0,037865	1,225447
Hepatitis.E.Virus.orf3.3KD.	0,0083	0,843731
Herpes.Simplex.Virus.1.2	0,025897	1,40042
HGF.Factor de Crecimiento de los Hepatocitos.	0,016633	1,360862
Anticuerpo de Histona	6,85E-10	1,686243
Anticuerpo de Histona H1	2,61E-11	2,799757
Anticuerpo de Histona H2a	0,044772	1,224073
Anticuerpo de Histona H2b	0,001089	0,788924
Anticuerpo de Histona H3	1,72E-10	2,415176
HIV.1.gp120	1,66E-06	1,789048
HIV.1.p24	0,038881	1,156733

ES 2 445 591 T3

Anticuerpo HSC.70.	0,00624	1,137019
Anticuerpo HSP.32..HO.	0,004803	0,885912
HSP.71.Antibody	0,00045	1,252665
HSP.90.alfa.Antibody	0,001539	1,791473
HSP.90.beta.Antibody	0,001354	1,623366
ICAM.1	0,009792	1,149373
IgA	0,049771	0,881591
IGF.BP.2	0,018181	1,227532
IL.10	0,000352	1,221097
IL.12p40	0,000201	0,250575
IL.13	0,017859	1,181867
IL.15	0,000165	1,256579
IL.16	0,036951	0,859916
IL.17	5,98E-07	1,677291
IL.18	0,01689	1,22484
IL.1ra	0,005946	1,510124
IL.3	0,008796	0,653955
IL.5	0,00209	0,664767
IL.6	0,012493	43,66667
IL.7	0,019808	1,132941
IL.8	0,005011	1,507679
Influenza.A	0,004233	1,414848
Influenza.A.H3N2	0,000495	1,554768
Insulina	0,025327	1,935424
Anticuerpo de Insulina	0,025375	0,856373
L.donovani	0,001109	0,857349
LH.Hormona Luteinizante	0,000997	1,682294
Lyme	0,032584	1,625076
M.pneumoniae	0,046329	1,316456
MDC	0,006304	1,223947
MIF	0,035924	1,725573
MIP.1alfa	0,000169	1,327078
MIP.1beta	0,038342	0,846427
Anticuerpo Mitocondrial	3,88E-06	1,354705
Paperas	0,001229	1,591415
Mieloperoxidasa	0,049584	0,758069
Anticuerpo de Mieloperoxidasa pANCA	0,002673	1,239712
NrCAM	0,029407	0,677036
PAI.1	0,007411	1,182768
Anticuerpo GAD de las Células de los Islotes Pancreáticos	0,007054	1,109422
Polipéptido pancreático	0,024602	1,653974
Parainfluenza.1	4,81E-08	2,050935
Parainfluenza.2	0,018508	1,492113
Parainfluenza.3	0,000614	1,674902
PDGF	0,001027	1,379009

Péptido.YY	0,03996	4,420843
Anticuerpo PM.1	1,81E-05	1,180055
Polio.Virus	2,52E-05	1,284177
Prolactina	0,039821	1,799276
Fosfatasa Ácida Prostática	0,003273	0,821328
Proteinase.3.cANCA..Antibody	0,000947	1,233907
RANTES	0,039282	1,170133
Resistina	0,008188	0,798165
Virus Respiratorio Sincitial	0,002998	1,542918
Anticuerpo Ribosómico P	0,002013	1,160539
Anticuerpo RNP	0,000327	1,146123
Rubella	0,043988	1,288998
Rubéola	6,81E-05	1,415315
Anticuerpo Scl.70	6,94E-05	2,140715
Amiloide.P del Suero	0,00095	1,272045
SGOT	0,000575	1,232216
SHBG	0,045618	0,694279
Anticuerpo de Smith	8,36E-06	1,20085
Sortilina	1,82E 05	0,753436
sRAGE	0,031466	0,751375
Anticuerpo SSB.	4,39E-06	1,193772
Estreptolisina.O.SLO.	0,029488	1,367316
Anticuerpo T3	0,002543	0,849731
TECK	0,014213	1,261096
Trombopoyetina	0,000449	0,838376
Anticuerpo de tiroglobulina	0,010796	0,847769
TIMP.1	0,00226	1,179578
TNF.alfa	0,040404	1,164689
TNF.RII	0,004678	1,164465
TRAIL.R3	0,031641	0,833379
TSP.1	3,99E-05	0,818264
Anticuerpo de la Enfermedad Celiaca tTG (Transglutaminasa	0,002152	1,369371
Tiular) V.zóster	2,65E-05	1,846248
VEGF	0,003456	0,821183
Factor von.Willebrand	0,000742	1,51545

5 Algunos o la totalidad de los biomarcadores candidato identificados en esta memoria tendrán utilidad potencia en la diagnosis y monitorización de pacientes con esquizofrenia de primera aparición, episodios psicóticos agudos u otros trastornos psiquiátricos afines. Estos biomarcadores están asociados con diversos caminos bioquímicos: reacción de fase aguda, estrés por oxidación, respuesta de los macrófagos, metabolismo de los lípidos; crecimiento y proliferación celulares; y regulación de hormonas tiroideas. El análisis de estos caminos bioquímicos sugiere otros biomarcadores candidato potenciales con posible utilidad en la diagnosis y monitorización de pacientes con esquizofrenia de primera aparición, episodios psicóticos agudos u otros trastornos psiquiátricos afines.

10 Otros cambios del sistema de respuesta autoinmune se observaron en pacientes esquizofrénicos comparados con los controles. Por ejemplo, se observaron disminuciones significativas en la expresión de G-CSF (74% del control; $P < 0,034$), ICAM-1 (83%; $P < 0,010$), IL-3 (32%; $P < 0,074$), IL-7 (76%; $P < 0,009$), IL-13 (74%; $P < 0,001$) e IL-15 (76%; $P < 0,009$) y un incremento acusado en IL-1RA (1,76-veces; $P < 0,036$). Tales cambios indican producción disminuida de glóbulos blancos, inflamación (respuesta de los macrófagos y liberación de histamina), reacción de las células B y respuestas RA en pacientes esquizofrénicos de primera aparición.

Adicionalmente, un estudio separado que utilizaba MS/MS Q-tof demostró que CD5L disminuía significativamente (43% $p \leq 0,002$) en individuos esquizofrénicos comparada con controles sanos. CD5L es capaz de fijar y activar células específicas del sistema inmune (monocitos y linfocitos), y juega un papel importante en la regulación de este sistema.

- 5 Los datos sugieren también que la totalidad o algunos de estos biomarcadores candidato (G-CSF, ICAM-1, 3, 7, 13 y 15 con expresión incrementada de IL-1RA) pueden utilizarse como parte de un panel de ensayo de biomarcadores para la detección precoz de la esquizofrenia.

- Se deduce también de este trabajo que los pacientes de esquizofrenia de primera aparición pueden exhibir alteraciones en las respuestas de los macrófagos, así como de las células T adyuvantes, células T asesinas y células B. Por tanto, otros marcadores potenciales que se encuentran ya en uso para clasificación o caracterización de estas células se investigarán en cuanto a su aplicación potencial en los diagnósticos de la esquizofrenia. Éstos incluyen 27E10 y Factor XIII-A para activación y diferenciación de los macrófagos, CPM para maduración de los macrófagos, quitotriosidasa y CD14 para estimulación de los macrófagos, así como CD4 y CD8 para diferenciación de las células T asesinas y CD28, CD80 y CD86 para activación de las células T asesinas. Tales biomarcadores candidato pueden utilizarse como parte de un panel de ensayo de biomarcadores para la detección precoz de la esquizofrenia.
- 10
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico, determinación de una predisposición a, o monitorización del tratamiento de un trastorno esquizofrénico, que comprende los pasos de:

(a) medir, en una muestra tomada de un individuo, los niveles de cada uno de los biomarcadores siguientes:

5 Beta-2 Microglobulina a, Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro, Calcitonina a, IL-13, IL-7, Alfa-1 antitripsina, Apolipoproteína A1, Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo, Fibrinógeno, G-CSF, Hormona del Crecimiento, Glutación S-Transferasa, IgA, IgM, Leptina, MDC, PAI-1, RANTES, Amiloide P del Suero, Factor de Células Madre, SHBG, TNF RII, Anticuerpo T3, Anticuerpo H4 de Histona, Anticuerpo HSC 70, Rubéola, Anticuerpo SSB y V. zóster; y

10 (b) comparar el nivel del biomarcador presente en dicha muestra con el nivel del biomarcador en una muestra de control.

2. El método que se define en la reivindicación 1, que comprende la medición de uno o más biomarcadores adicionales seleccionados de: Alfa 2 Macroglobulina, ANG 2 (Angiopoyetina 2), Angiotensinógeno, Anticuerpo Anti-Nuclear, Apolipoproteína A1, Apolipoproteína CIII, Apolipoproteína H, ASCA (Anticuerpo *Saccharomyces cerevisiae*), Betacelulina, BMP 6, *C. trachomatis*, Proteína C Reactiva, Antígeno Carcinoembrionario, CD40, Ligando de CD40, Anticuerpo de la Proteína B del Centrómero, CgA (Cromogranina A), Toxina del Cólera, Anticuerpo de Colágeno Tipo 2, Anticuerpo de Colágeno Tipo 4, Complemento 3, Cortisol, Citomegalovirus, EGF, EGF R, ENA 78, Endotelina 1, Eotaxina 3, Antígeno Precoz del virus Epstein Barr, Eritropoyetina, Factor VII, Ligando Fas, Ferritina, FGF básico, FSH (Hormona Estimulante del Folículo), *H. pylori*, Haptoglobina, Hepatitis A, Hepatitis B Núcleo, Ad de Superficie de la Hepatitis B, Ay de Superficie de la Hepatitis B, Hepatitis C Núcleo, Hepatitis C NS3, Hepatitis C NS4, Hepatitis D, Hepatitis E Virus orf 2.6KD, Hepatitis E Virus orf 3.3KD, Herpes Simplex Virus 1.2, HGF (factor de crecimiento de los hepatocitos), Anticuerpo de Histona, Anticuerpo de Histona H1, Anticuerpo de Histona H2a, Anticuerpo de Histona H3, HIV 1 gp120, HIV 1 p24, Anticuerpo HSP 32 HO, Anticuerpo HSP 71, Anticuerpo HSP 90 alfa, Anticuerpo HSP 90 beta, ICAM 1, IGF BP.2, IL-10, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-1ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, Influenza A, Influenza A H3N2, Insulina, Anticuerpo de Insulina, *L. donovani*, LH (Hormona Luteinizante), Lyme, *M. pneumoniae*, MIF, MIP 1 alfa, MIP 1 beta, Anticuerpo Mitocondrial, Paperas, Mieloperoxidasa, Anticuerpo de Mieloperoxidasa pANCA, NrCAM, Anticuerpo GAD de las Células de los Islotes Pancreáticos, Polipéptido pancreático, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, PDGF, Péptido YY, Anticuerpo PM 1, Polio Virus, Prolactina, Fosfatasa Ácida Prostática, Anticuerpo de Proteinasa 3 cANCA, Resistina, Virus Respiratorio Sincitial, Anticuerpo P Ribosómico, Anticuerpo RNP, Rubeola, Anticuerpo Scl 70, SGOT, Anticuerpo Smith, Sortilina, sRAGE, Estreptolisina O SLO, TECK, Trombopoyetina, Anticuerpo Tiroglobulina, TIMP 1, TNF alfa, TRAIL R3, TSP 1, Anticuerpo de la Enfermedad Celiaca tTG (Transglutaminasa Tisular), VEGF y Factor von Willebrand.

3. Un método de monitorización de la eficacia de una terapia anti-psicótica en un individuo que padece, se sospecha que padece, o que está predispuesto a, un trastorno esquizofrénico, que comprende los pasos siguientes:

(a) medir el nivel de cada uno de los biomarcadores que se definen en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 presentes en muestras tomadas en dos o más ocasiones del individuo; y

(b) comparar el nivel de cada uno de los biomarcadores en una muestra tomada del individuo con el nivel presente en una muestra tomada del individuo antes del comienzo de una terapia, y/o una muestra tomada del individuo en una etapa anterior de una terapia.

4. Un método según cualquier reivindicación anterior, que comprende detectar un cambio en la cantidad del biomarcador en muestras tomadas en dos o más ocasiones.

5. Un método según la reivindicación 1, en donde el control es un control normal y/o un control de trastorno psicótico.

45 6. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde el nivel de cada biomarcador se detecta por análisis de espectros NMR.

7. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde el o cada nivel se detecta por un método seleccionado de NMR, SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), análisis 1-D basado en gel, análisis 2D basado en gel, espectrometría de masas (MS) y técnicas basadas en LC-MS.

50 8. Un método según cualquier reivindicación 1 a 6, en donde el o cada nivel se detecta por un método seleccionado de métodos enzimáticos directos o indirectos acoplados o no acoplados, técnicas electroquímicas, espectrofotométricas, fluorimétricas, luminométricas, espectrométricas, polarimétricas y cromatográficas, o un método inmunológico tal como ELISA.

55 9. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde el nivel de proteínas plasmáticas se detecta por uno o más métodos seleccionados de absorbancia ultravioleta y un método colorimétrico.

10. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde el nivel de cada biomarcador se detecta utilizando un sensor o biosensor que comprende una o más enzimas, proteínas de fijación, receptoras o de transporte, anticuerpos, receptores sintéticos u otras moléculas de fijación selectivas para detección directa o indirecta de los biomarcadores, estando acoplada dicha detección a un transductor eléctrico, óptico, acústico, magnético o térmico.
- 5
11. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra se selecciona de sangre entera, suero sanguíneo, plasma sanguíneo o un extracto o purificación del mismo, o dilución del mismo.
12. Un método según cualquier reivindicación anterior, que comprende cuantificar el nivel de cada biomarcador en una muestra ulterior tomada del individuo.
- 10
13. Un método según la reivindicación 12, en donde la muestra biológica adicional se selecciona de CSF, orina, saliva, u otro fluido corporal, o aliento, aliento condensado, o un extracto o purificación del mismo, o dilución del mismo.
14. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde el individuo es naif frente al fármaco.
- 15
15. Uso de un kit para monitorización o diagnosis de un trastorno esquizofrénico según la reivindicación 1, que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar los biomarcadores como se definen en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.