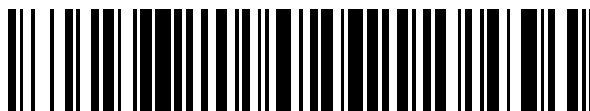


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 136**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)
A61K 31/245 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2011 E 11808394 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2651972**

54 Título: **Biomarcador novedoso y usos del mismo en el diagnóstico, tratamiento de autismo**

30 Prioridad:

16.12.2010 SE 1051330
16.12.2010 US 423636 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.08.2016

73 Titular/es:

AUTISM BIOTECH LIMITED (100.0%)
35 Richmond Road
Reading, Berkshire RG4 7PR, GB

72 Inventor/es:

MOMENI, NAGHI y
PERSSON, BENGT, L.

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 580 136 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

Biomarcador novedoso y usos del mismo en el diagnóstico, tratamiento de autismo.

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a péptidos biológicos, métodos para analizar dichos péptidos, particularmente en muestras biológicas, y métodos relacionados de diagnósticos para trastornos neurológicos y/o neuropsiquiátricos, en particular autismo. La presente invención se refiere adicionalmente al tratamiento del autismo.

10

Antecedentes de la invención

En el campo de la medicina, existe una demanda constante de nuevos y mejores marcadores biológicos (biomarcadores) para diagnosticar o pronosticar afecciones patológicas y para evaluar la eficacia de un tratamiento a aplicar. En general, la concentración de un biomarcador de la muestra de paciente es por asociación estadística tomada como indicación de la presencia de, la gravedad de, o el riesgo de una afección patológica. Un subconjunto ampliamente estudiado de biomarcadores son los péptidos en fluidos biológicos, tales como sangre, líquido cefalorraquídeo u orina. El número de péptidos diferentes presentes en la muestra biológica puede variar de decenas a decenas de miles, dependiendo del método de análisis y el tipo de muestra. Por lo tanto, resulta evidente que están aún por descubrir muchos biomarcadores peptídicos médicamente relevantes.

Una proteína humana llamada complemento C3 es un componente muy estudiado del sistema inmunitario innato, y circulan en la sangre cantidades importantes del complemento C3. La ruta clásica del complemento requiere típicamente complejos de antígeno:anticuerpo para su activación (respuesta inmune específica), mientras que las rutas alternativas de lectina de unión a manosa pueden activarse por la hidrólisis C3 o antígenos sin la presencia de anticuerpos (respuesta inmune no específica). En las tres rutas, una C3-convertasa se escinde y activa el componente C3, generando C3a y C3b, y causando una cascada de eventos de escisión y activación adicionales.

Se conoce en la bibliografía varios fragmentos peptídicos del complemento C3 útiles como biomarcadores. Por ejemplo, el documento WO/2004/079371 desvela fragmentos peptídicos del complemento C3 como marcadores útiles en el diagnóstico del autismo. Como otro ejemplo, el documento US20050048584A1 desvela un método para detectar la enfermedad de Alzheimer y diferenciar la enfermedad de Alzheimer de otras enfermedades de demencia usando biomarcadores peptídicos que se originan del complemento C3.

El autismo es un trastorno neuropsiquiátrico con grados variables de gravedad que afecta aproximadamente a 2-5 de 1000 niños en todo el mundo y tal vez hasta 1:110 en Estados Unidos. La etiología del autismo no se entiende, pero se cree que contribuyen tanto factores genéticos como ambientales. El diagnóstico de autismo requiere la evaluación experta del comportamiento del niño y dadas las enormes implicaciones de un diagnóstico para el niño y la familia, establecer un diagnóstico firme a menudo conlleva un tiempo y esfuerzo significativos. Como tal, se demanda en gran medida un ensayo clínico basado en mediciones objetivas de variables biológicas para el diagnóstico de autismo.

El tratamiento del autismo incluye entrenamiento y gestión conductual usando refuerzo positivo, autoayuda y habilidades sociales para mejorar el comportamiento y la comunicación. Se han desarrollado varias series de tratamientos diferentes, incluyendo el análisis conductual aplicado (ABA), el tratamiento y educación de niños con autismo y problemas de comunicación relacionados (TEACCH), e integración sensorial. Las terapias especializadas incluyen logopedia, terapia ocupacional y física. No existe ningún tratamiento médico estándar para el autismo, pero las conductas problemáticas y los síntomas a veces se tratan con fármacos tales como antidepresivos, antipsicóticos, anticonvulsivos y fenidato de metilo. Sin embargo, no existe ningún tratamiento que modifique la enfermedad.

Ciertos objetos de la invención

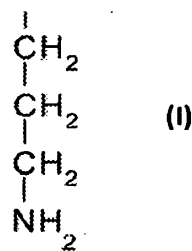
Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo marcador biológico útil en el diagnóstico. Es un objeto adicional de la invención proporcionar métodos analíticos para la determinación de la concentración del marcador novedoso en muestras, por ejemplo, muestras biológicas, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Además, es un objeto de la invención proporcionar nuevos y mejores métodos basados en marcadores biológicos para el diagnóstico de trastornos neurológicos y/o neuropsiquiátricos, tales como autismo en particular, pero también de síndrome de Asperger, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica,

esclerosis múltiple, esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar. Aún un objeto adicional de la invención es proporcionar un tratamiento para el autismo que modifique la enfermedad y no sea meramente sintomático.

Sumario de la invención

5

En un primer aspecto, la invención proporciona un péptido que tiene la secuencia aminoacídica $\text{NH}_2\text{-SSKITHRIHWESASLLR}^*\text{-COOH}$ (SEQ ID NO: 1), en el que el residuo C-terminal representado con R^* tiene una cadena lateral como se representa en la Fórmula (I):



10

En un segundo aspecto, se proporciona un método para análisis, que comprende la etapa de determinar la presencia, ausencia y/o concentración de un péptido de acuerdo con el primer aspecto en una muestra. La muestra es preferiblemente una muestra biológica. Más preferiblemente, la muestra biológica se selecciona entre el grupo que consiste en: una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de plasma heparinizado, una muestra de plasma EDTA, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva, una muestra de lagrime, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de ascitis, una muestra de tejido y una biopsia. Mucho más preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de plasma heparinizado.

15

La determinación de la presencia, ausencia y/o concentración del péptido puede realizarse por medio de un método basado en espectrometría de masas, tales como MALDI-TOF, SELDI-TOF, LC-MS o LC-MS/MS; o por medio de un ensayo inmunológico, tales como ELISA, RIA, FIA o DELFIA.

20

En un tercer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo específico para un péptido de acuerdo con el primer aspecto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

25

En un cuarto aspecto, se proporciona un paquete de producto para su uso en diagnóstico, que comprende un péptido de acuerdo con el primer aspecto y/o un anticuerpo de acuerdo con el tercer aspecto. El paquete de producto puede comprender adicionalmente uno o más de: inhibidores de proteasa; instrucciones para determinar la concentración del péptido del primer aspecto; un péptido de la SEQ ID NO: 2; un péptido de la SEQ ID NO: 3; un anticuerpo específico para la SEQ ID NO: 2; un anticuerpo específico para la SEQ ID NO: 3.

30

En un quinto aspecto, se proporciona un método de diagnóstico para un trastorno neurológico o neuropsiquiátrico, que comprende las etapas de:

35

- proporcionar u obtener una muestra del sujeto a diagnosticar;
- determinar la concentración de un péptido del primer aspecto en dicha muestra; y
- comparar dicha concentración con un valor de referencia basado en la concentración del péptido del primer aspecto en una muestra similar de un sujeto de control sano;

40

en el que una concentración inferior a la del valor de referencia en la muestra es indicativa de la presencia de un trastorno neurológico o neuropsiquiátrico.

El método del quinto aspecto puede comprender adicionalmente las etapas de

45

- determinar la concentración de un péptido con la secuencia:

SSKITHRIHWESASLLR (SEQ ID NO: 3) y/o
 SSKITHRIHWESASLL (SEQ ID NO: 2) en dicha muestra; t

50

- comparar dicha concentración con un valor de referencia basado en la concentración del mismo péptido o

péptidos en una muestra similar de un sujeto de control sano;

en el que una concentración mayor que el valor de referencia en la muestra es indicativa adicionalmente de la presencia de un trastorno neurológico o neuropsiquiátrico.

5

En el método del quinto aspecto, la etapa de determinar la concentración puede realizarse por medio de un método del segundo aspecto.

El trastorno neurológico o neuropsiquiátrico del quinto aspecto puede seleccionarse entre autismo, síndrome de Asperger, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar. Mucho más preferiblemente, el trastorno es autismo.

En un sexto aspecto, se proporciona el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto en un método de diagnóstico. Preferiblemente, el péptido se usa en el diagnóstico de autismo, síndrome de Asperger, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esquizofrenia, depresión o trastorno bipolar. Mucho más preferiblemente, el péptido se usa en el diagnóstico de autismo.

En un séptimo aspecto, se proporciona un método de diagnóstico de autismo, que comprende las etapas de:

- 20 a. proporcionar u obtener una muestra del sujeto a diagnosticar;
b. determinar el nivel de actividad del factor de complemento I en dicha muestra; y
c. comparar dicha actividad con un valor de referencia basado en el nivel de actividad del factor de complemento I en una muestra similar de un sujeto de control sano;

25 en el que una actividad mayor que el valor de referencia en una muestra es indicativa de la presencia de autismo en el sujeto como en la reivindicación 12.

La muestra en el método del séptimo aspecto puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de plasma heparinizado, una muestra de plasma EDTA, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva, una muestra de lagrime, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de ascitis, una muestra de tejido y una biopsia. Preferiblemente, la muestra es una muestra de plasma.

El método de séptimo aspecto puede comprender adicionalmente realizar el método del quinto aspecto para diagnosticar autismo, y añadir los resultados para producir un diagnóstico más sensible y/o selectivo de autismo.

El método del quinto aspecto para diagnosticar autismo puede comprender adicionalmente realizar el método del séptimo aspecto, y añadir los resultados para producir un diagnóstico más sensible y/o selectivo de autismo.

40 En un octavo aspecto, se proporciona un método de tratamiento del autismo, que comprende administrar un compuesto inhibidor del factor de complemento I a un sujeto que necesita el mismo.

En un noveno aspecto, se proporciona un uso de un compuesto inhibidor del factor de complemento I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de autismo.

45

En un décimo aspecto, se proporciona un compuesto inhibidor del factor de complemento I para su uso en el tratamiento de autismo.

El compuesto inhibidor del factor de complemento I del octavo, noveno o décimo aspectos puede seleccionarse entre el grupo que consiste en p-guanidinobenzoato dimetanosulfonato de 6-amidino-2-naftilo (FUT-175), serpina, un fluoruro de bencenosulfonilo tal como Pefabloc[®] SC, suramina, un inhibidor de tipo WAP tal como un inhibidor específico de elastasa (elafina). Preferiblemente, el compuesto se selecciona entre FUT-175, elafina y suramina.

En un decimoprimer aspecto, se proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de autismo en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a. determinar un valor inicial para el nivel de biomarcador de acuerdo con el primer aspecto en el sujeto antes del tratamiento;
- b. administrar el tratamiento a evaluar al sujeto;

- c. después de (b), determinar el nivel del biomarcador del primer aspecto en el sujeto; y
- d. comparar los niveles obtenidos en (a) y (c);

en el que un aumento en el nivel del biomarcador de acuerdo con el primer aspecto es indicativo de una respuesta terapéutica al tratamiento como en la reivindicación 13.

En un decimosegundo aspecto, se proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para el autismo en un sujeto, comprendiendo las etapas de:

- 10 a. determinar un valor inicial para el nivel de actividad del factor de complemento I en el sujeto antes del tratamiento;
- b. administrar el tratamiento a evaluar al sujeto;
- c. después de (b), determinar los niveles de actividad del factor de complemento I en el sujeto; y
- 15 d. comparar los niveles obtenidos en (a) y (c);

en el que un descenso en la actividad del factor de complemento I es indicativo de una respuesta terapéutica al tratamiento.

El método del decimoprimer aspecto puede comprender adicionalmente realizar el método del decimosegundo aspecto, y añadir los resultados para producir una mejor sensibilidad y/o selectividad.

El método del decimosegundo aspecto puede comprender adicionalmente realizar el método del decimoprimer aspecto, y añadir los resultados para producir una mejor sensibilidad y/o selectividad.

25 Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** ilustra la modificación de la cadena lateral de la arginina C-terminal en el biomarcador peptídico novedoso de SEQ ID NO: 1. A) Cadena lateral normal de arginina. B) Estructura de la cadena lateral modificada de la arginina C-terminal en el biomarcador peptídico novedoso de la invención. Dicho aminoácido con cadena lateral modificada se conoce como ornitina.

La **figura 2** muestra espectros de masa representativos para muestras obtenidas a partir de 4 sujetos diferentes con diagnóstico de autismo (representado por D) y 4 sujetos diferentes de niños de control sanos (representados por C). Los marcadores de posición de 1865 (SEQ ID NO: 2), 1978 (SEQ ID NO: 1) y 2021 (SEQ ID NO: 3) se indican en la parte superior. Es evidente que los marcadores 1865 y 2021 se elevan en sujetos con autismo, mientras que el marcador 1978 se reduce en sujetos autistas en comparación con los sujetos sanos. Unidades del eje Y: μ A. Eje X: PM aparente (Daltons). El eje Y se escaló automáticamente para revelar el pico relevante. Las escalas próximas al eje Y para cada panel son como se indican a continuación: D1: 0-700; D2: 0-1000; D3: 0-350; D4: 0-800; C1: 0-300; C2: 0-400; C3: 0-650; C4: 0-650.

La **figura 3** muestra las mediciones del Ejemplo 3 para el marcador 1978 (SEQ ID NO: 1) (valores en la Tabla I) en forma de gráfica. El grupo representado "0" contiene resultados de sujetos de control sanos, mientras que el grupo representado "1" contiene resultados de sujetos autistas.

La **figura 4** ilustra la relación recíproca que existe entre un criterio de corte, la selectividad y la sensibilidad.

La **figura 5** representa una curva de características operativas del receptor (ROC) del biomarcador peptídico novedoso de la invención (SEQ ID NO: 1) en el diagnóstico de autismo en base a los datos del Ejemplo 3.

La **figura 6** es un ejemplo comparativo que representa una curva de características operativas del receptor (ROC) del biomarcador peptídico conocido de SEQ ID NO: 3 en el diagnóstico del autismo en base a los datos del Ejemplo 3.

La **figura 7** representa una curva de características operativas del receptor (ROC) obtenida combinando el biomarcador peptídico novedoso de SEQ ID NO: 1 con el marcador conocido de SEQ ID NO: 3 para diagnosticar autismo en base a los datos del Ejemplo 3. Es evidente una mejor sensibilidad y selectividad en comparación con el marcador en aislamiento.

La **figura 8** representa una curva de características operativas del receptor (ROC) obtenida combinando el biomarcador peptídico novedoso de SEQ ID NO: 1 con marcadores conocidos de SED IQ NO: 2 y SEQ ID NO: 3 para diagnosticar autismo en base a los datos del Ejemplo 3. Es evidente una mejor sensibilidad.

Figura 9: Intensidad de fluorescencia de liberación de 7-amino-4-metil cumarina en función del periodo de incubación en plasma (media $\pm$ DE; 1 h (974 ± 44.2), 2 h (1995 ± 45.2) y 3 h (2374 ± 1.2)).

Figura 10: (a) Actividad del factor de complemento I en plasma EDTA de niños con trastorno del espectro autista (TEA) (n = 30) y niños de control sanos (n = 30). Se muestra un diagrama de dispersión de la

- 5 actividad del factor I para cada individuo. Se muestran muestras de niños con TEA que no estaban con medicación en el momento de la investigación, los que estaban con medicación de Risperdal, Ritalín, una combinación de los mismos, u otros medicamentos, tales como antipsicóticos (tioridazina) o anticonvulsivos (fenobarbital y valproato sódico). (b) Se muestran los valores medios y errores estándar de la actividad del factor de complemento en plasma EDTA para los diferentes grupos de edad y géneros tanto para niños con TEA como el grupo de control sano. En el grupo TEA; edad ≤ 5 años: varones (n = 17), chicas (n = 4) y edad > 5 años: varones (n = 6), chicas (n = 3). En el grupo de control sano; edad ≤ 5 años: varones (n = 4), chicas (n = 10) y edad > 5 años: varones (n = 9), chicas (n = 7).

10 Definiciones

Los términos *autismo* y *trastorno del espectro autista (TEA)* tienen el mismo significado en el contexto de la presente invención y se refieren a un diagnóstico de autismo de acuerdo con los criterios del DSM-IV (Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría).

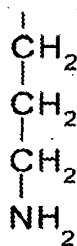
- 15 El término *sensibilidad* en el contexto de la presente invención se refiere a la proporción de sujetos positivos reales que se identifican correctamente como tales (por ejemplo, el porcentaje de sujetos autistas identificados correctamente como que tienen la afección).
- 20 El término *especificidad* en el contexto de la presente invención se refiere a la proporción de sujetos negativos reales que se identifican correctamente como tales (por ejemplo, el porcentaje de sujetos sanos identificados correctamente como que no tienen autismo).

- En el presente documento, en ocasiones los biomarcadores se identifican usando su peso molecular aproximado observado como nombre. La tabla II muestra las relaciones entre el peso/nombre molecular observado, la secuencia y la SEQ ID NO.
- 25

Descripción detallada de la invención

- 30 *Biomarcador peptídico modificado novedoso*

- En un primer aspecto, la presente invención desvela un péptido modificado que tiene la secuencia aminoacídica $\text{NH}_2\text{-SSKITHRIHWESASLLR}^*\text{-COOH}$ (SEQ ID NO: 1), en el que la cadena lateral del residuo C-terminal representado con R^* carece del resto $\text{NH}_2\text{-C=NH}$ normalmente presente en una arginina, por lo que el cadena lateral del residuo R^* tiene la estructura como se representa en la Fórmula (I):
- 35



(I).

- Para una ilustración adicional de la naturaleza de la modificación de la cadena lateral, se hace referencia a la figura 1. Un aminoácido con la cadena lateral de fórmula (I) se conoce como ornitina, pero no ocurre normalmente en polipéptidos.
- 40

Métodos de análisis

- 45 En un segundo aspecto, la presente invención desvela un método para analizar la presencia, ausencia y/o concentración del péptido del primer aspecto, preferiblemente en una muestra biológica. El análisis puede realizarse por medios conocidos en la técnica adecuados para dichos análisis, tales como métodos basados en espectrometría de masas (incluyendo MALDI-TOF, SELDI-TOF, LC-MS, LC-MS/MS y similares) o métodos inmunoquímicos conocidos adecuados (incluyendo ELISA, RIA, DELFIA, y similares). También es posible combinar métodos

inmunoquímicos y métodos basados en espectrometría de masa para el análisis, tales como, usando un chip revestido con anticuerpo en SELDI-TOF. En algunos casos, la muestra puede concentrarse y purificarse antes del análisis. La concentración es especialmente preferible para diluir muestras, tales como orina y líquido cefalorraquídeo. Dicha concentración y/o purificación pueden realizarse, por ejemplo, usando ultrafiltración (preferiblemente con un corte de PM adecuado de aproximadamente 1,0-1,5 kD si se desea la retención del biomarcador; como alternativa, puede usarse un corte de PM de aproximadamente 10 kD para eliminar proteínas de mayor peso molecular), mediante la precipitación selectiva de proteínas o evaporando todo o parte del fluido en la muestra. También están disponibles técnicas cromatográficas tanto para concentrar la muestra, así como para realizar una purificación. Las características de unión a la superficie CM10 a pH 7 (Ejemplo 3) proporcionan un punto de partida adecuado para optimizar un esquema de purificación por cromatografía.

Preferiblemente, la muestra biológica se selecciona entre: una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de plasma tratada con heparina, una muestra de plasma EDTA, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva, una muestra de lagrime, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de ascitis, una muestra de tejido y una biopsia. Más preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de plasma en heparina. Mucho más preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de plasma en heparina tratada con inhibidores de proteasa, tal como un cóctel inhibidor libre de EDTA (Halt protease inhibitor de Thermo Scientific, Estados Unidos) (por ejemplo, 10 µl/ml de plasma) y Pefablock® SC (Pentapharm Ltd Suiza) (por ejemplo, 20 µl/ml de plasma).

Anticuerpos

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo específico para el péptido del primer aspecto. Con la ayuda de la divulgación del propio péptido presentado en el presente documento, el experto será capaz de aplicar métodos ya conocidos en la técnica para obtener y caracterizar anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el péptido.

Productos de diagnóstico

En un cuarto aspecto, se desvela un producto de diagnóstico (tal como un kit), que comprende un péptido del primer aspecto y/o un anticuerpo del tercer aspecto. Preferiblemente, el producto de diagnóstico comprende adicionalmente uno o más de: direcciones para su uso; inhibidores de proteasa; un péptido de la SEQ ID NO: 2; un péptido de la SEQ ID NO: 3; un anticuerpo específico para la SEQ ID NO: 2; un anticuerpo específico para la SEQ ID NO: 3. Los péptidos pueden servir como controles positivos/muestras de referencia y los anticuerpos pueden servir como reactivos de detección para su uso en un método de análisis inmunológico.

Métodos de diagnóstico

En un quinto aspecto, se desvela un método de diagnóstico para un trastorno neurológico y/o neuropsiquiátrico, basado en la determinación del marcador peptídico del primer aspecto, preferiblemente por medio de un método del segundo aspecto. El marcador peptídico de SEQ ID NO: 1 puede combinarse ventajosamente con la determinación de marcadores de diagnóstico conocidos, tales como los desvelados en el documento WO/2004/079371 (preferiblemente SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3). La combinación de los resultados del marcador peptídico del primer aspecto con marcadores adicionales proporciona un método de diagnóstico con una mejor especificidad y/o sensibilidad.

Con el fin de ser diagnósticamente útil, la concentración del marcador o marcadores anteriores debe compararse con un valor de referencia (también conocido como un "corte"). De forma adecuada, el valor de referencia se obtiene determinando las concentraciones de los mismos marcadores (mucho más preferiblemente usando métodos similar y muestras similares) de un sujeto de control sano o, más preferiblemente, obteniendo un valor medio de un grupo de sujetos de control sanos. El marcador del primer aspecto se encuentra en sujetos sanos pero tiende a estar ausente o tener una concentración inferior en sujetos con un trastorno neurológico y/o neuropsiquiátrico, tal como autismo.

El experto apreciará que el nivel de diferencia del valor de referencia que se toma como indicativo de la presencia de un trastorno variará con cada caso, como en la mayoría de los casos reales, las concentraciones del marcador en la población sana y en la población con un trastorno se superpondrán parcialmente en un grado. La necesidad de una mayor diferencia aumentará la especificidad del método de diagnóstico pero sacrifica la sensibilidad; la necesidad de una menor diferencia aumentará la sensibilidad a costa de una menor especificidad (véase la figura 4 para

ilustración). Los niveles deseables de sensibilidad y especificidad variarán dependiendo de la disposición: por ejemplo, en un procedimiento de cribado que ensaya con sujetos sin sospecha previa de un trastorno es necesaria una especificidad muy alta para evitar un gran número de falsos positivos; al ensayar con sujetos ya sospechosos de padecer un trastorno, puede priorizarse en su lugar una alta sensibilidad y aceptarse una baja especificidad. La concentración o concentraciones determinadas del marcador o marcadores también son propensas a variar dependiendo de las características del método analítico particular usado para ensayar las concentraciones, así como el tipo de muestra y manipulación de la muestra. Todas estas consideraciones se conocen bien por el experto. Asimismo, las soluciones a los problemas que se han presentado anteriormente (por ejemplo, determinar los valores de corte) están dentro del alcance del experto combinando las enseñanzas en el presente documento con una simple experimentación y optimización de rutina.

Una herramienta estadística útil en la determinación de los valores de corte se conoce como curva de características operativas del receptor (ROC), que puede construirse como se indica a continuación. Clasificar todos los sujetos (pacientes más controles) después del parámetro medido. Partir de la parte superior de la tabla y calcular, sucesivamente para cada nuevo valor médico, la sensibilidad y la especificidad de 100 para todos los sujetos (sensibilidad = posP/allP , donde posP es el número de pacientes (pacientes se refiere a los sujetos con la enfermedad) que se clasificarán como poseedores de la enfermedad este valor medido y la especificidad es negC/allC , donde negC se refiere a los controles que no están clasificados como poseedores de la enfermedad). Representar estos valores en un diagrama x-y donde "especificidad 100 es x" y sensibilidad es y, dando como resultado una curva ROC.

Los cortes se ajustan siempre a la situación real, incluyendo la prevalencia de la enfermedad y especialmente el grado de gravedad de la enfermedad, pero los programas estadísticos (que no saben nada sobre la situación clínica) normalmente calculan los cortes minimizando la distancia de la esquina izquierda superior de la curva ROC, es decir, minimizando $((\text{sensibilidad } 100)^2 + (\text{especificidad } 100)^2)$, donde $\wedge$ significa cuadrado (teorema de Pitágoras). Los valores del "Criterio" (que se refiere al corte), sensibilidad y selectividad mostrados en las figuras 5-8 se obtuvieron usando este método.

En cuanto a combinaciones de biomarcadores, es importante aclarar que en realidad son independientes en el sentido de que contribuyen a la discriminación de pacientes y controles (por lo menos hasta cierto punto - lo que quiere decir, por ejemplo, que un pico, aunque esté acoplado a otro pico, tiene algo extra para contribuir al poder discriminatorio). Pueden usarse varios métodos estadísticos conocidos, por ejemplo, análisis discriminantes o regresión logística. Para más adicionales, el lector experto se remite al manual del software MedCalc® (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica) disponible en línea en: <http://www.medcalc.org/manual/index.php>.

Considerando lo anterior, se realizó un análisis ejemplar (Ejemplo 5). El análisis mostró que el marcador 1978 novedoso (SEQ ID NO: 1) tenía claramente un potencial considerable en la diferenciación de sujetos con y sin autismo que tenía poder discriminatorio a la par con los marcadores conocidos 2021 (SEQ ID NO: 3) y 1865 (SEQ ID NO: 2) (Tabla III, figuras 3, 5 y 6). Para probar la hipótesis de que la combinación del marcador 1978 novedoso con uno o ambos marcadores conocidos 1865 y 2021 se traducirá en un mejor método de diagnóstico, también se idearon curvas ROC (después de un análisis discriminante) para la combinación de 1978 con 2021 (figura 7) y la combinación de 1865, 1978 y 2021 (figura 8). Resulta evidente a partir de la comparación de la curva ROC de la figura 7 con las curvas de la figura 5 y la figura 6 que la combinación del marcador 1978 novedoso con el marcador 2021 conocido produce mejores resultados que cualquier marcador en aislamiento. La adición del segundo marcador conocido 1865 al análisis da aún mejores resultados (figura 8 en comparación con la figura 7).

Preferiblemente, la enfermedad neurológica o neuropsiquiátrica a diagnosticar se selecciona entre autismo, síndrome de Asperger, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar. Mucho más preferiblemente, la enfermedad neurológica o neuropsiquiátrica a diagnosticar es autismo.

En un séptimo aspecto, se proporciona un método de diagnóstico para el autismo, que comprende las etapas de:

- a. proporcionar u obtener una muestra del sujeto a diagnosticar;
- b. determinar el nivel de actividad del factor de complemento I en dicha muestra; y
- c. comparar dicha actividad con un valor de referencia basado en el nivel de actividad del factor de complemento I en una muestra similar de un sujeto de control sano;

en el que una actividad mayor que el valor de referencia en una muestra es indicativa de la presencia de autismo en

el sujeto.

La muestra en el método del séptimo aspecto puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de plasma heparinizado, una muestra de plasma EDTA, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva, una muestra de lagrime, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de ascitis, una muestra de tejido y una biopsia. Preferiblemente, la muestra es una muestra de plasma.

La determinación del nivel de actividad del factor de complemento I puede realizarse usando un ensayo fluorógeno como se describe en el Ejemplo 6 (véase la sección 6.1.2.2). Naturalmente también pueden usarse otros métodos para la determinación.

El valor de referencia para el factor de complemento I puede obtenerse como se ha desvelado anteriormente, *mutatis mutandis*.

El método del séptimo aspecto puede comprender adicionalmente realizar el método del quinto aspecto para diagnosticar autismo, y añadir los resultados para producir un diagnóstico más sensible y/o selectivo de autismo. La agregación puede realizarse, por ejemplo, usando el método ROC que se ha descrito anteriormente, donde la actividad del factor de complemento I se toma como un determinante.

El método del quinto aspecto para diagnosticar autismo puede comprender adicionalmente realizar el método del séptimo aspecto, y añadir los resultados para producir un diagnóstico más sensible y/o selectivo del autismo.

La presente invención también desvela el uso de un péptido del primer aspecto en un método de diagnóstico, preferiblemente un método para diagnosticar autismo.

Tratamiento del autismo

Momeni y col. han desvelado (Autism Research and Treatment Volume 2012 (2012), Artículo ID 868576, doi: 10.1155/2012/868576) que los niños con trastornos del espectro autista tienen una alta actividad del factor de complemento I en plasma (Ejemplo 6).

El factor de complemento I es una serina proteasa presente en el plasma humano que está implicada en la degradación de la proteína del complemento C3b. La deficiencia en la actividad del factor de complemento I está asociada a un aumento de la incidencia de infecciones en seres humanos.

En dicho documento, Momeni y col. muestran que el nivel medio de la actividad del factor de complemento I en el grupo TEA es significativamente mayor que en el grupo de control de niños desarrollados típicamente y sanos, lo que sugiere que la alta actividad del factor de complemento I podría tener un impacto sobre el desarrollo de TEA.

Por lo tanto, se proporciona un tratamiento para el autismo usando un inhibidor del factor de complemento I. Se conocen varios compuestos y clases de compuestos inhibidores del factor de complemento I, incluyendo p-guanidinobenzoato dimetanosulfonato de 6-amidino-2-naftilo (FUT-175), serpina, fluoruros de bencenosulfonilo, tal como Pefabloc® SC, suramina, inhibidores de tipo WAP, tal como inhibidor específico de elastasa (elafina) (Ejemplo 7).

El establecimiento de la dosis apropiada del inhibidor del factor de complemento I puede realizarse por un experto en la técnica por medio de una simple experimentación y optimización de rutina. En casos de compuestos conocidos en los que se conoce un intervalo de dosis de seguridad para su uso en seres humanos, el punto de partida natural para la experimentación es dicho intervalo. La eficacia del tratamiento (mejora de la función) puede seguirse en comparación con el valor inicial (es decir, antes del inicio del tratamiento) mediante evaluaciones repetidas (por ejemplo, semanalmente) bajo el paradigma descrito en los Ejemplos de la sección 6.1.1.

FUT-175 puede administrarse por vía oral. La dosificación puede iniciarse con 0,1 mg/kg/día (dividida en dos dosis diarias), y cuando sea necesario, puede aumentarse a 0,25 mg/kg/día (dividida en dos o cuatro dosis diarias) y posteriormente a 0,5 mg/kg/día (dividida en cuatro dosis diarias).

La suramina puede administrarse por inyección intravenosa, partiendo de 0,1 g por inyección intravenosa semanal. Cuando sea necesario, la dosis se aumenta en incrementos de 0,1 g hasta 1 g por inyección.

La elafina puede administrarse por inyección intravenosa, partiendo de 10 mg dos veces al día. Cuando sea necesario, la dosis se aumenta a 20, 100, 200 y después 400 mg por inyección.

5 Métodos para evaluar la eficacia de un tratamiento para el autismo

En un decimoprimer aspecto, se proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para el autismo en un sujeto, que comprende las etapas de:

- 10 a. determinar un valor inicial para el nivel de biomarcador de acuerdo con el primer aspecto en el sujeto antes del tratamiento;
- b. administrar el tratamiento a evaluar al sujeto;
- c. después de (b), determinar el nivel del biomarcador del primer aspecto en el sujeto; y
- 15 d. comparar los niveles determinados en (a) y (c);

en el que un aumento en el nivel del biomarcador de acuerdo con el primer aspecto es indicativo de una respuesta terapéutica al tratamiento.

La determinación de los valores puede realizarse de la manera desvelada para el quinto aspecto.

- 20 En un decimosegundo aspecto, se proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para el autismo en un sujeto, que comprende las etapas de:

- 25 a. determinar un valor inicial para el nivel de actividad del factor de complemento I en el sujeto antes del tratamiento;
- b. administrar el tratamiento a evaluar al sujeto;
- c. después de (b), determinar el nivel de la actividad del factor de complemento I en el sujeto; y
- d. comparar los niveles determinados en (a) y (c);

- 30 en el que un descenso en la actividad del factor de complemento I es indicativo de una respuesta terapéutica al tratamiento.

La determinación de los valores puede realizarse de la manera desvelada para el séptimo aspecto.

- 35 El método del decimoprimer aspecto puede comprender adicionalmente realizar el método del decimosegundo aspecto, y añadir los resultados para producir una mejor sensibilidad y/o selectividad.

El método del decimosegundo aspecto puede comprender adicionalmente realizar el método del decimoprimer aspecto, y añadir los resultados para producir una mejor sensibilidad y/o selectividad.

- 40 *Observaciones finales*

Los siguientes ejemplos se considerarán como no limitantes. Las referencias usadas en el presente documento se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

- 45 **Ejemplos**

1. Selección de pacientes y controles

- 50 Todos los niños con trastorno del espectro autista (TEA) se examinaron por expertos clínicos en autismo. Un psiquiatra infantil examinó a todos los niños que también fueron examinados por un neurólogo infantil o un psicólogo infantil. Todos los especialistas estaban de acuerdo en el diagnóstico de autismo según los criterios del DSM-IV (Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría). El grupo de control consistió en niños sanos sin signos de trastornos neurológicos y/o neuropsiquiátricos incluidos de la
- 55 misma área. Los niños de control que tuvieron cualquier tipo de enfermedad infecciosa dos semanas antes del momento del examen fueron excluidos de este estudio.

No hubo diferencias significativas en edad y género. Los niños en el grupo TEA fueron reclutados del centro de rehabilitación de autismo.

2. Muestreo

Se extrajo sangre venosa en tubos de heparina de 3 ml (Sistema Vacutainer; Becton-Dickinson Inc., Plymouth, Reino Unido) y el plasma se separó inmediatamente por centrifugación en 1300 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, a la muestra de plasma producida se le añadió un cóctel de inhibidor libre de EDTA (Halt protease inhibitor de Thermo Scientific, Estados Unidos) (10 µl/ml de plasma) y 20 µl/ml más de Pefablock SC (Pentapharm Ltd, Suiza). El plasma producido estaba en alícuotas en pequeñas porciones, inmediatamente se congeló en hielo seco, y posteriormente se transportó a (-80 °C) para un almacenamiento adicional. Todo el procedimiento desde la extracción de sangre hasta la congelación se completó en 20 minutos.

3. Análisis espectrométrico de masas (SELDI-TOF)

Se prepararon superficies de matrices de chip de proteína CM10 de acuerdo con el protocolo estándar de BioRad. Las matrices de chip de proteína CM10 (que tienen el grupo funcional COOH) con 8 puntos se equilibraron mediante 100 µl de tampón (acetato de Na 0,1 M de baja astringencia, pH 4) durante 5 min y se repitió una vez. Se usó tampón fosfato Na (25 mM, pH-7,0) para preparar diluciones de plasma (dilución 1:50). El plasma diluido se aplicó en el pocillo bioprocesador. La matriz de chip se incubó durante 45 min con agitación vigorosa. Después de la incubación, las muestras se lavaron tres veces con 150 µl de tampón fosfato Na 25 mM pH-7 (igual que el tampón de dilución) seguido de dos aclarados rápidos con 150 µl de HEPES 1 mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico), pH 7. La matriz de chip se eliminó del bioprocesador y se secó al aire. Más tarde, se añadieron 0,8 µl de CHCA saturado (25 mg/ml) a cada punto y se dejó secar al aire, y esta etapa se repitió 1 vez más. Posteriormente, las matrices de chip se leyeron por un lector económico de proteínas BioRad Edición personal del sistema SELDI (lector PCS 4000). Antes de leer las matrices de chip, se hizo una calibración externa usando el "estándar peptídico todo en uno" Biorad que es una mezcla de 7 péptidos diferentes que varían de aproximadamente 1000-7000 Da.

En el estudio, se analizaron muestras de 22 controles y 25 pacientes por SELDI-TOF como se ha especificado anteriormente. Los datos medidos se normalizaron por logaritmos naturales (Tabla I, figura 3).

Se detectaron varios péptidos expresados diferencialmente tales como los que tenían pesos moleculares observados de 1865, 1978 y 2021 en los espectros de niños de control sanos y el grupo TEA. Los espectros SELDI-TOF representativos de 8 sujetos (4 pacientes diferentes y 4 controles diferentes) se muestran en la figura 2.

Tabla I: Intensidades máximas normalizadas (logaritmo natural) para marcadores que tienen pesos moleculares (PM) de aproximadamente 1865, 1978 y 2021, respectivamente

Grupo	ID	1865	1978	2021
Controles	c1	2,451	5,237	4,61
Controles	c10	2,397	5,146	5,06
Controles	c11	3,231	3,972	5,19
Controles	c12	3,33	3,963	5,136
Controles	c13	3,436	5,154	4,256
Controles	c17	3,426	5,781	3,847
Controles	C18	3,415	5,046	5,206
Controles	c2	3,827	4,28	4,592
Controles	c20	3,633	5,287	5,308
Controles	c21	3,105	4,689	4,733
Controles	c22	2,819	4,782	4,355
Controles	c23	5,327	6,463	6,723
Controles	c24	2,549	5,526	4,516
Controles	c25	3,476	5,307	4,292
Controles	c26	3,543	4,542	4,207
Controles	c28	3,041	5,766	4,708
Controles	c29	2,801	4,116	4,52
Controles	c3	2,734	4,464	5,199
Controles	c31	2,978	3,653	4,454
Controles	c33	2,567	5,514	4,739
Controles	c4	3,908	4,742	5,003

Grupo	ID	1865	1978	2021
Controles	c6	3,519	4,917	4,976
Controles	c7	2,361	3,925	5,039
Controles	c8	2,508	3,112	5,038
Controles	c9	2,628	4,078	4,358
Pacientes	d10	4,253	4,504	6,548
Pacientes	d11	3,534	5,209	7,229
Pacientes	d13	6,522	4,731	5,353
Pacientes	d14	5,462	4,483	6,577
Pacientes	d15	3,427	4,244	5,13
Pacientes	d17	3,934	4,358	5,135
Pacientes	d19	3,811	3,522	5,055
Pacientes	d20	1,937	3,214	5,328
Pacientes	d21	3,616	3,517	6,03
Pacientes	d22	3,623	3,883	5,791
Pacientes	d25	3,229	3,064	6,077
Pacientes	d26	3,497	3,467	4,5
Pacientes	d27	3,288	4,105	5,311
Pacientes	d28	2,662	3,312	5,547
Pacientes	D3	5,297	5,76	6,936
Pacientes	d30	3,379	6,022	4,273
Pacientes	d4	3,311	4,072	4,987
Pacientes	D5	3,745	4,116	5,153
Pacientes	D6	4,652	4,146	4,651
Pacientes	d7	5,667	4,016	6,23
Pacientes	d8	3,528	3,448	6,404
Pacientes	d9	3,559	3,362	5,15

4. Determinación de estructuras de biomarcadores expresados diferencialmente

- La estructura de los biomarcadores expresados diferencialmente en el Ejemplo 3 se determinaron usando MALDI-TOF/TOF MS y se confirmaron por la información LC-FTICR MS/MS. Se identificaron y se secuenciaron los péptidos de interés (aquellos que se identificaron por SELDI-TOF y diferían significativamente entre el grupo de control y de autismo).
- Se diluyeron 100 µl de muestras de plasma con 300 µl de tampón (tampón fosfato Na 25 mM, pH 7,0) y 100 µl de acetonitrilo (AcN) y se mezclaron bien, posteriormente, se realizó una ultrafiltración mediante el uso de una membrana Microcon de corte de 10 kDa (Millipore Bedford, MA, Estados Unidos). El ultrafiltrado se secó en una centrífuga Speed vac, posteriormente, se reconstituyó en 10 µl de tampón (fosfato Na 25 mM, pH 7,0), y se desaló en una columna ZipTip® C₁₈ (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). Se aplicaron 5 µl de la muestra reconstituida en la diana CM-10 SELDI-TOF preparada (Biorad, Estados Unidos), se incubó, se lavó y se secó.
- Se añadieron 1,0 µl de CHCA de matriz saturada (25 mg/ml) a los puntos de muestra y se dejó secar al aire, y esta etapa se repitió 1 vez más.
- El instrumento MALDI-TOF-MS usado para la verificación de los péptidos fue un Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). El instrumento se equipó con un láser SmartBeam™. Todos los espectros se adquirieron usando el modo reflectrón. Para adquirir los espectros MS/MS, se realizó TOF/TOF con decaimiento post-fuente (PSD) por disociación inducida por láser.
- La diana de elección para el enfoque MALDI fue la diana SELDI-TOF (BioRad, Estados Unidos). La matriz/puntos de muestra preparados en la diana SELDI-TOF se introdujeron en el Ultraflex II y los espectros MS se registraron del punto de muestra preparado. La calibración usada fue una calibración de vecinos cercanos externa. Las muestras usadas para la calibración eran una mezcla de péptidos que incluían el intervalo de masa de 1000 a 5000 Da. A partir de las masas peptídicas adquiridas (datos TOF MS), el péptido candidato se seleccionó manualmente para experimentos/secuenciación posterior. Los espectros se anotaron con software de procesamiento de datos (FlexAnalysis™) y finalmente se interpretaron por un análisis de secuencias de novo asistido por software

(BioTools™). Los resultados para los péptidos expresados diferencialmente se muestran en la Tabla II a continuación.

Tabla II: Determinación de la estructura de péptidos expresados diferencialmente

PM/nombre observado	Secuencia aminoacídica	SEQ ID NO:
1978	SSKITHRIHWESASLLR* *representa arginina C-terminal modificada: el resto NH ₂ -C=NH se pierde de la cadena lateral (véase también la figura 1)	1
1865	SSKITHRIHWESASLL	2
2021	SSKITHRIHWESASLLR	3

5

5. Valor de diagnóstico de los biomarcadores expresados diferencialmente

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos en el Ejemplo 3 (Tabla I) usando programas informáticos, tales como el software MedCalc® (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

10

Todos los marcadores mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo de control y el grupo autista (prueba t bilateral). Véase la Tabla III.

Tabla III: Análisis estadístico de los datos mostrados en la Tabla II.

Marcador	Media autista	Media control	valor t	df	p	t separ.	var.est.	df	p bilateral	Desv. Est. Pacientes	Desv. Est. Controles
2021	5,608718	4,802606	4,05927	45	0,000194	3,96775		36,806	0,000323	0,798449	0,554487
1865	3,906028	3,160416	2,97598	45	0,004686	2,8918		34,333	0,006603	1,043658	0,65134
1978	4,116157	4,778406	-2,89728	45	0,005795	-2,89437		44,059	0,005888	0,788326	0,776276

El marcador 1978 novedoso muestra claramente un potencial considerable en la diferenciación de sujetos con y sin autismo que tiene poder discriminatorio a la par que los marcadores conocidos 2021 y 1865.

Para el marcador 1978, se elaboró una curva de características operativas del receptor (ROC) (figura 5). Para fines comparativos, también se elaboró una curva ROC para el marcador 2021 conocido (figura 6).

Para analizar la utilidad de la combinación de los biomarcadores anteriores, se usan análisis discriminantes dando los picos (valores logarítmicos) diferentes pesos de acuerdo con su contribución a la discriminación que puede usarse probablemente para diagnosticar clínicamente la enfermedad.

Tabla IV: Análisis discriminante de combinaciones de marcadores para la construcción de la curva ROC

Combinación de marcadores	Peso basado en los análisis discriminantes	Curva ROC resultante
1865 y 1978	$1865^*(1,73) + 1978^*(-1,87)$	No mostrada
1865 y 2021	$2021^*(1,48) + 1865^*(0,62)$	No mostrada
1978 y 2021	$2021^*(1,99) + 1978^*(-1,36)$	Figura 7
1865, 1978 y 2021	$2021^*(1,52) + 1978^*(-1,90) + 1865^*(1,33)$	Figura 8

Las curvas ROC de las figuras 7 y 8 indican claramente que las combinaciones del marcador novedoso 1978 con marcadores conocidos dan como resultado un mejor poder discriminatorio.

6. El factor de complemento I es hiperactivo en pacientes autistas

Este estudio se publicó anteriormente por Momeni y col. (Autism Research and Treatment Volume 2012 (2012), Artículo ID 868576, doi: 10.1155/2012/868576). Dicha publicación se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. A continuación se reproducen ciertas secciones clave.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Participantes

Treinta niños con TEA y treinta niños de control típicos participaron en este estudio. El grupo TEA comprendía 23 chicos y 7 chicas con una edad media de 4,5 años (rango de edad 3-9 años). El grupo de control comprendía 13 chicos y 17 chicas, edad media 6,0 años (rango de edad 3-12 años), (Tabla V).

Tabla V: Edad/a, género y medicación de los participantes. *Diferencia entre TEA y controles. Prueba U de Mann-Whitney para la edad y prueba exacta de Fisher para la categoría de edad y el género.

Parámetro		TEA (n = 30)	Controles (n = 30)	Valor P*
Edad	Media (DE)	4,8 (1,7)	6,1 (2,3)	
	Media (medad)	4,5 (3-9)	6 (3-12)	0,033
	≤ 5 años	21	14	
	>5 años	9	15	0,115
Género	Chicos	23	13	
	Chicas	7	17	0,017
Medicación	Sin mediación específica	8	30	-----
	Risperdal en solitario o en combinación	18	0	-----
	Ritaton en solitario o en combinación	4	0	-----

Los niños en el grupo TEA se reclutaron del Autism Rehabilitation Centre en la University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences en Teherán, Irán. Después de haber obtenido el consentimiento informado de los padres, se extrajeron muestras de sangre. Todos los niños con TEA se examinaron por especialistas clínicos en autismo. Un psiquiatra infantil y un neurólogo infantil o un psicólogo infantil examinaron a todos los niños. Todos los especialistas estaban de acuerdo en el diagnóstico de autismo según los criterios del DSM-IV. Sin embargo, los procedimientos de diagnóstico aplicados en Europa y en Estados Unidos/Canadá que usan la escala de observación para el diagnóstico del autismo (ADOS) y la entrevista para el diagnóstico del autismo revisada no se usaron en el proceso de diagnóstico aplicado en Irán. Este inconveniente se compensa por la amplia experiencia clínica por parte del neurólogo infantil/psiquiatra infantil que estaba familiarizado con las conductas principales en el autismo indicadas por la American Academy of Pediatrics en su Embargo de 2007. El grupo de control consistió en niños desarrollados típicamente y sanos sin signos de trastornos del desarrollo neural que se reclutaron de la misma área que los niños

con TEA. Los niños que tuvieron cualquier tipo de enfermedad infecciosa dos semanas antes del momento del examen fueron excluidos de este estudio.

El estudio se aprobó (MT/1247) por el comité de ética de la Iran University of Medical Sciences, Teherán.

5

6.1.2 Procedimiento

6.1.2.1 Extracción de muestra de sangre

- 10 Las muestras de sangre se extrajeron por una enfermera pediátrica, y las de los niños diagnosticados con autismo se recogieron bajo la supervisión de un psiquiatra infantil con preparación especial en el campo de la psicosis infantil. Se extrajo sangre venosa en tubos de EDTA de 3 ml (Sistema Vacutainer; Becton-Dickinson Inc., Plymouth, Reino Unido), y el plasma se separó inmediatamente posteriormente por centrifugación en 1.300 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se añadió un cóctel de inhibidores (30 µl por 1 ml de plasma) a la muestra de plasma
15 resultante (solución de inhibidor en cóctel: Tris 2,0 M, Na-EDTA 0,9 M, Benzamidina 0,2 M, E-64 92 µM, y Pepstatina 48 µM; Sigma, St. Louis, Mich, Estados Unidos). El plasma se almacenó a -80 °C.

6.1.2.2 Ensayo

- 20 Se han descrito previamente métodos basados en la hidrólisis de sustratos fluorógenos por Tsiftoglou y Sim (Journal of Immunology, vol. 173, Nº 1, págs. 367-375, 2004) y Gupta y col. (Journal of Autism and Developmental Disorders, vol. 26, Nº 4, págs. 439-452, 1996). Se descubrió que el siguiente procedimiento de ensayo era óptimo para ensayar la actividad del factor de complemento I (fI) en el plasma. Se incubaron 20 µl de plasma con 80 µl de tampón (tampón fosfato 100 mM, pH 7,5, que contenía EDTA 1 mM, DTT 1 mM y azida sódica 1 mM) durante 10 min a 37 °C
25 para conseguir equilibrio térmico. Después, se añadieron 100 µl de solución de sustrato (Boc-Asp(OBz)-Pro-Arg-7-amino-4-metilcumarina 200 µM; Bachem, Bubendorf, Suiza) en tampón fosfato 25 mM, pH 7,4, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min (véase la figura 9). La reacción se inhibió por la adición de 1 ml de ácido acético 1,5 M, y la liberación de 7-amino-4-metilcumarina se midió por un espectrofluorómetro (Hitachi-f 2000; λ_{ex} : 360 nm; λ_{em} : 440 nm; ancho de ranura: 2,5). Todas las mediciones se realizaron de forma aleatoria y por duplicado. La
30 fluorescencia de fondo en el ensayo se controló por el uso de plasma en ausencia de sustrato y se restó de los valores obtenidos en presencia de sustrato.

6.1.3 Análisis de datos y estadísticas

- 35 La actividad fI en plasma se distribuyó normalmente logarítmicamente y, por lo tanto, se usaron valores logarítmicos al analizar las diferencias entre el grupo TEA y el grupo de control. Para el ajuste por edad (dicotomizado usando el valor medio, 5 años) y el género, se usó ANOVA factorial. Un valor <0,05 se consideró estadísticamente significativo. Se usó Statistica 8.0 (StatSoft®, Tulsa, Okla, Estados Unidos). La variabilidad intra e interensayo de la actividad fI en plasma se expresó como el error estándar de una única determinación ($S_{\text{método}}$) usando la fórmula:

40

$$S_{\text{método}} = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{(2n)}} \quad (1)$$

donde d_i es la diferencia entre la medición emparejada de i :ésimo y n es el número de diferencias. El $S_{\text{método}}$ se expresó como el coeficiente de variación (%).

45

6.2 Resultados

- Hubo significativamente mayor actividad del fI en plasma en los niños con TEA (media geométrica (límite de confianza al 95 %): 523 (154-1776) cuando se comparó con el grupo de control: 361 (135-967; ANOVA $P = 0,015$,
50 ajustado por edad y género; figura 10a).

- No se encontraron interacciones estadísticamente significativas con respecto al género y la edad, y no se encontró ninguna asociación significativa entre la actividad del fI y la edad o el género (ANOVA; $p = 0,25$ para el género y 0,42 para los dos grupos de edad, figura 10b). En el grupo TEA, algunos niños con autismo grave se encontraban bajo
55 medicación con Risperdal para reducir la hiperactividad y la conducta violenta, y algunos estaban bajo medicación con Ritalín para mejorar la atención (Tabla V). Hubiera sido éticamente cuestionable suspender la medicación con el

fin de controlar el diseño experimental. Se han correlacionado los datos mostrados en la figura 10a con el tipo de medicación que recibían los niños en el grupo TEA. Aunque no se observó ninguna correlación clara entre la medicación y la distribución para los datos del diagrama de dispersión, no puede descartarse que algunas diferencias en el patrón puedan estar influenciadas por la medicación.

5

Los valores fueron mayores estadísticamente de forma significativa en los niños con TEA, y hubo una débil asociación con el género. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad.

- 10 El error metodológico intraensayo fue pequeño, 0,5 %. El error metodológico interensayo fue del 13 %. Se descubrió una actividad enzimática del factor de complemento I significativamente mayor en los niños con TEA en comparación con el grupo control de aproximadamente la misma edad. Esto es, por lo que sabemos, el primer informe en relación con la disfunción de la actividad fl en niños con TEA. Aunque no es estadísticamente significativo, los varones solían mostrar una actividad fl más alta que las mujeres, y la diferencia entre el grupo control y el grupo TEA fue más
- 15 convincente entre los niños más pequeños, como se muestra en la figura 10. Debido al papel del fl como factor regulador de la ruta del sistema del complemento, una anomalía del fl podría desempeñar un papel en la aparición de TEA. Un defecto en esta ruta hace al individuo más vulnerable a diversas inflamaciones.

7. Tratamiento de autismo con un inhibidor del factor de complemento I

20

Suramina

Los pacientes diagnosticados con autismo se tratan con suramina, partiendo de 0,1 g por inyección intravenosa semanal. Cuando sea necesario, la dosis se aumenta en incrementos de 0,1 g hasta 1 g por inyección. La

25 dosificación se ajusta adicionalmente de forma individual por el médico supervisor. En casos de efectos adversos graves, la dosis se reduce o el tratamiento se interrumpe. La mejora de la función se sigue en comparación con el valor inicial mediante evaluaciones semanales bajo el paradigma que se ha descrito en la sección 6.1.1 anterior. Se observan mejoras significativas en el funcionamiento durante el transcurso del tratamiento en comparación con el valor inicial.

30

FUT-175 (p-guanidinobenzoato dimetonasulfonato de 6-amidino-2-naftilo)

Los pacientes diagnosticados con autismo se tratan por vía oral con FUT-175. La dosificación se inicia con 0,1 mg/kg/día (dividida en dos dosis diarias), y cuando sea necesario, se aumenta a 0,25 mg/kg/día (dividida en dos o

35 cuatro dosis diarias) y posteriormente a 0,5 mg/kg/día (dividida en cuatro dosis diarias). La dosificación se ajusta adicionalmente de forma individual por el médico supervisor. La mejora de la función se sigue en comparación con el valor inicial mediante evaluaciones semanales bajo el paradigma que se ha descrito en la sección 6.1.1 anterior. Se observan mejoras significativas en el funcionamiento durante el transcurso del tratamiento en comparación con el valor inicial.

40

Elafina

Los pacientes diagnosticados con autismo se tratan con elafina por inyección intravenosa, partiendo de 10 mg dos veces al día. Cuando sea necesario, la dosis se aumenta a 20, 100, 200 y después 400 mg por inyección. La

45 dosificación se ajusta adicionalmente de forma individual por el médico supervisor. En casos de efectos adversos graves, la dosis se reduce o el tratamiento se interrumpe. La mejora de la función se sigue en comparación con el valor inicial mediante evaluaciones semanales bajo el paradigma que se ha descrito en la sección 6.1.1 anterior. Se observan mejoras significativas en el funcionamiento durante el transcurso del tratamiento en comparación con el valor inicial.

50

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Autism Bigdiagnostics Ltd
Momeni, Naghi
55 Persson, Bengt

<120> COMPUESTO NOVEDOSO Y MÉTODOS PARA USAR EL MISMO

<130> 229905

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Arg C-terminal modificado: Resto NH₂-C=NH perdido de la cadena lateral (véase la figura 1 para una ilustración adicional).

<400> 1

Ser	Ser	Lys	Ile	Thr	His	Arg	Ile	His	Trp	Glu	Ser	Ala	Ser	Leu	Leu
1				5					10					15	
Arg															

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser	Ser	Lys	Ile	Thr	His	Arg	Ile	His	Trp	Glu	Ser	Ala	Ser	Leu	Leu
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

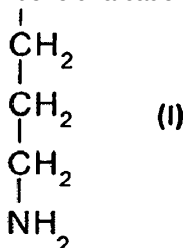
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser	Ser	Lys	Ile	Thr	His	Arg	Ile	His	Trp	Glu	Ser	Ala	Ser	Leu	Leu
1				5					10					15	
Arg															

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene la secuencia aminoacídica $\text{NH}_2\text{-SSKITHRIHWESASLLR}^*\text{-COOH}$ (SEQ ID NO: 1), en el que el residuo C-terminal representado con R^* tiene una cadena lateral como se representa en la Fórmula (I):



5

2. Un método para análisis, que comprende la etapa de determinar la presencia, ausencia y/o concentración de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra.

- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la muestra es una muestra biológica seleccionada entre el grupo que consiste en: una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de plasma heparinizado, una muestra de plasma EDTA, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva, una muestra de lagrime, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de ascitis, una muestra de tejido y una biopsia.

15

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que la determinación se realiza por medio de un método basado en espectrometría de masas, tal como MALDI-TOF, SELDI-TOF, LC-MS o LC-MS/MS; o por medio de un ensayo inmunoquímico, tal como ELISA, RIA, FIA o DELFIA.

- 20 5. Un anticuerpo específico para un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Un paquete de producto para su uso en diagnóstico, que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y/o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5.

- 25 7. El paquete de producto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el paquete de producto comprende adicionalmente uno o más de: inhibidores de proteasa; un péptido de la SEQ ID NO: 2; un péptido de la SEQ ID NO: 3; un anticuerpo específico para la SEQ ID NO: 2; un anticuerpo específico para la SEQ ID NO: 3.

- 30 8. Un método para el diagnóstico de un trastorno del espectro autista, que comprende las etapas de:

30

- proporcionar una muestra del sujeto que se va a diagnosticar;
- determinar la concentración de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en dicha muestra; y
- comparar dicha concentración con un valor de referencia basado en la concentración del péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra similar de un sujeto de control sano;

35

en el que una concentración inferior a la del valor de referencia en la muestra es indicativa de la presencia de un trastorno del espectro autista.

- 40 9. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente las etapas de

- determinar la concentración de un péptido con la secuencia:

SSKITHRIHWESASLLR (SEQ ID NO: 3) y/o
SSKITHRIHWESASLL (SEQ ID NO: 2)

45

en dicha muestra; y

- comparar dicha concentración con un valor de referencia basado en la concentración del mismo péptido o péptidos en una muestra similar de un sujeto de control sano;

- 50 en el que una concentración mayor que el valor de referencia en la muestra es indicativa adicionalmente de la presencia de un trastorno del espectro autista.

10. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de diagnóstico.

11. El péptido de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en un método de diagnóstico, en el que el
5 método sirve para diagnosticar un trastorno del espectro autista.

12. El método de la reivindicación 8 o 9, que comprende adicionalmente las etapas de:

- 10 a. proporcionar una muestra del sujeto que se va a diagnosticar;
b. determinar el nivel de actividad del factor de complemento I en dicha muestra; y
c. comparar dicha actividad con un valor de referencia basado en el nivel de actividad del factor de
complemento I en una muestra similar de un sujeto de control sano;

15 en el que una actividad mayor que el valor de referencia en una muestra es indicativa de la presencia de un
trastorno del espectro autista en el sujeto; y combinar los resultados de los métodos de las reivindicaciones 8 o 9
con los resultados obtenidos de este modo.

13. Un método *ex vivo* para evaluar la eficacia de un tratamiento para un trastorno del espectro autista en
un sujeto, que comprende las etapas de:

- 20 a. determinar un valor inicial para el nivel de biomarcador de acuerdo con la reivindicación 1 en el sujeto
antes del tratamiento;
b. posteriormente al tratamiento a evaluar que se ha administrado al sujeto, determinar el nivel del
biomarcador de acuerdo con la reivindicación 1 en el sujeto; y
25 c. comparar los niveles obtenidos en (a) y (b);

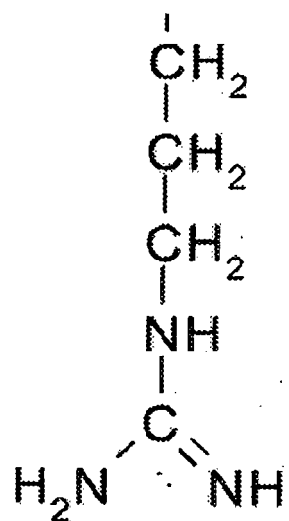
en el que un aumento en el nivel del biomarcador de acuerdo con la reivindicación 1 es indicativo de una respuesta
terapéutica.

30 14. El método de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente las etapas de:

- a. determinar un valor inicial para el nivel de actividad del factor de complemento I en el sujeto antes del
tratamiento;
35 b. posteriormente al tratamiento a evaluar que se ha administrado al sujeto, determinar los niveles de
actividad del factor de complemento I en el sujeto; y
c. comparar los niveles obtenidos en (a) y (b);

en el que un descenso en la actividad del factor de complemento I es indicativo de una respuesta terapéutica; y
combinar los resultados del método de la reivindicación 13 con los resultados obtenidos de este modo.

A



B

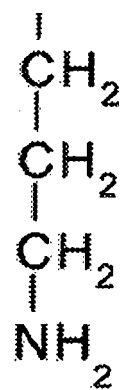
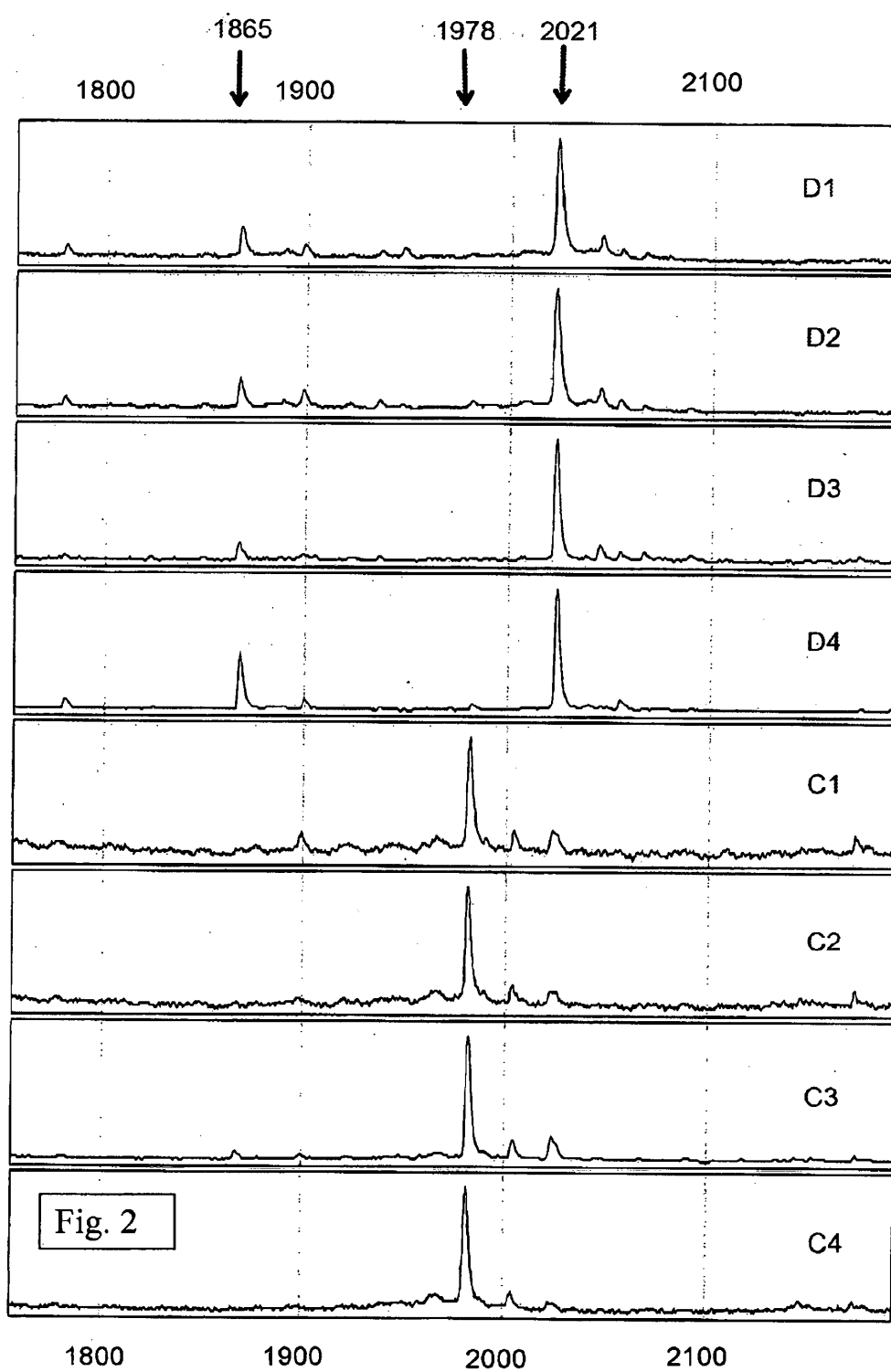


Fig. 1



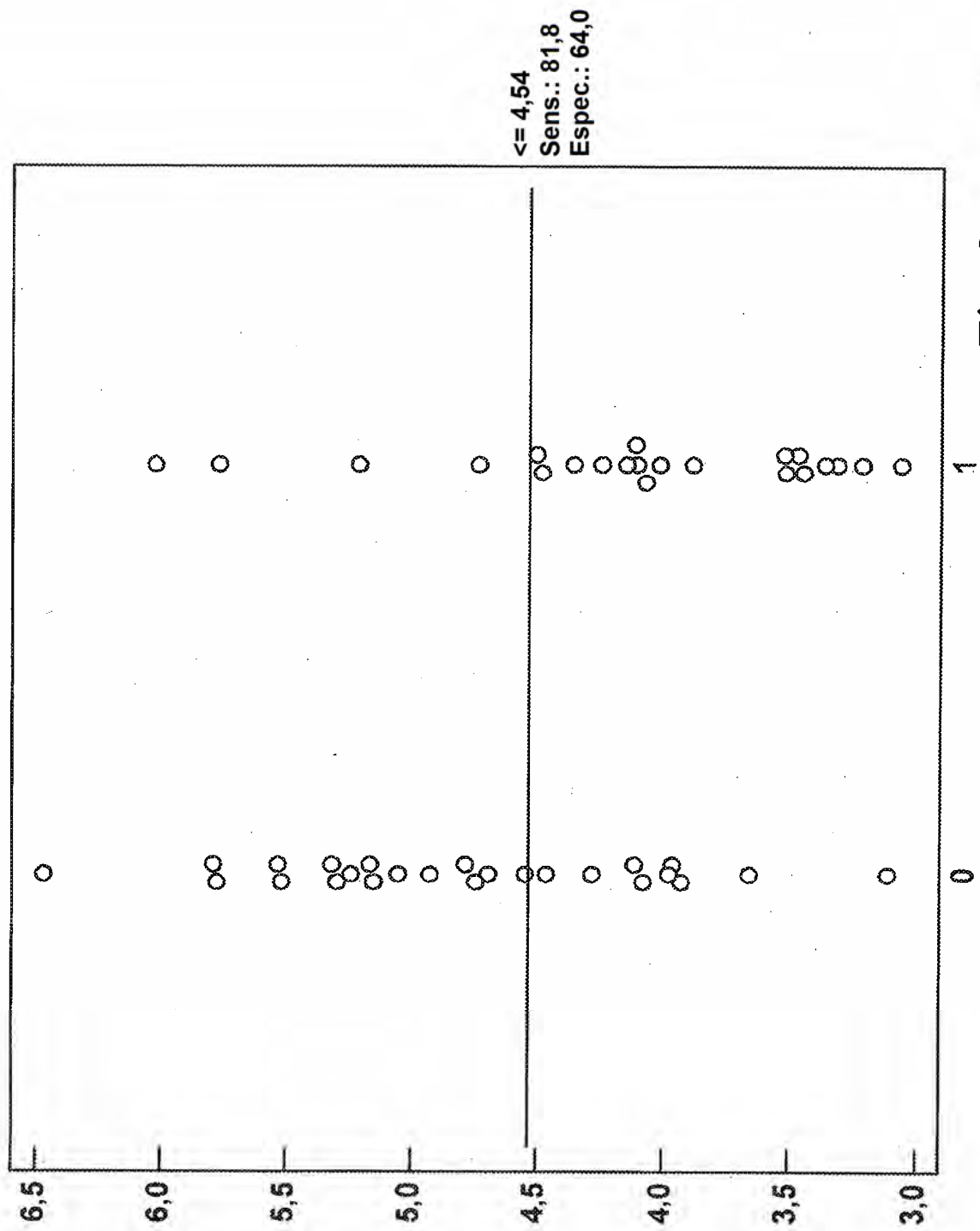


Fig. 3

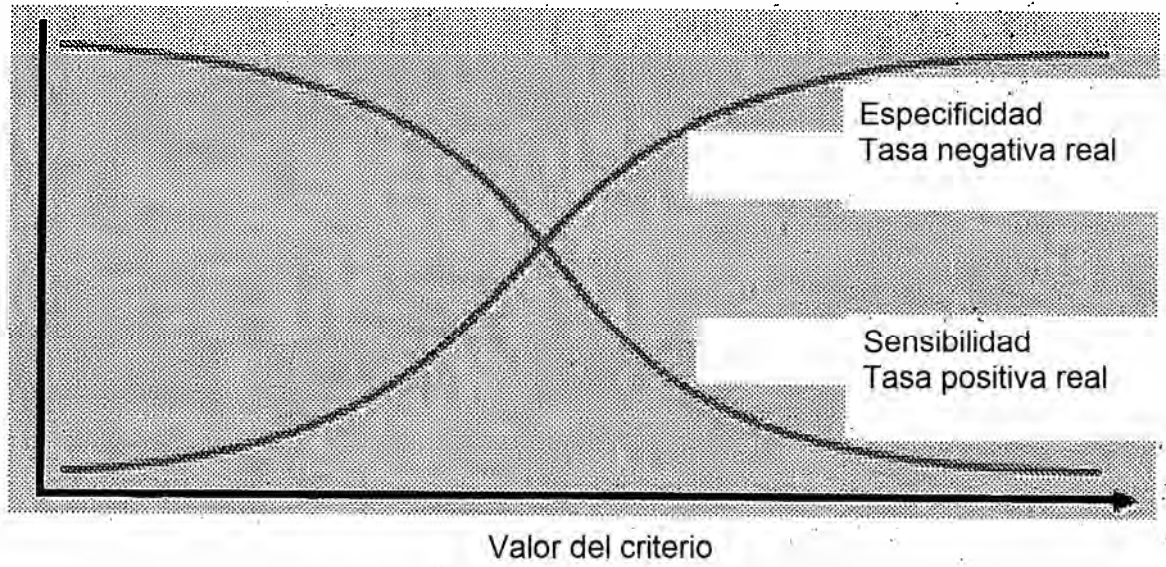


Fig. 4

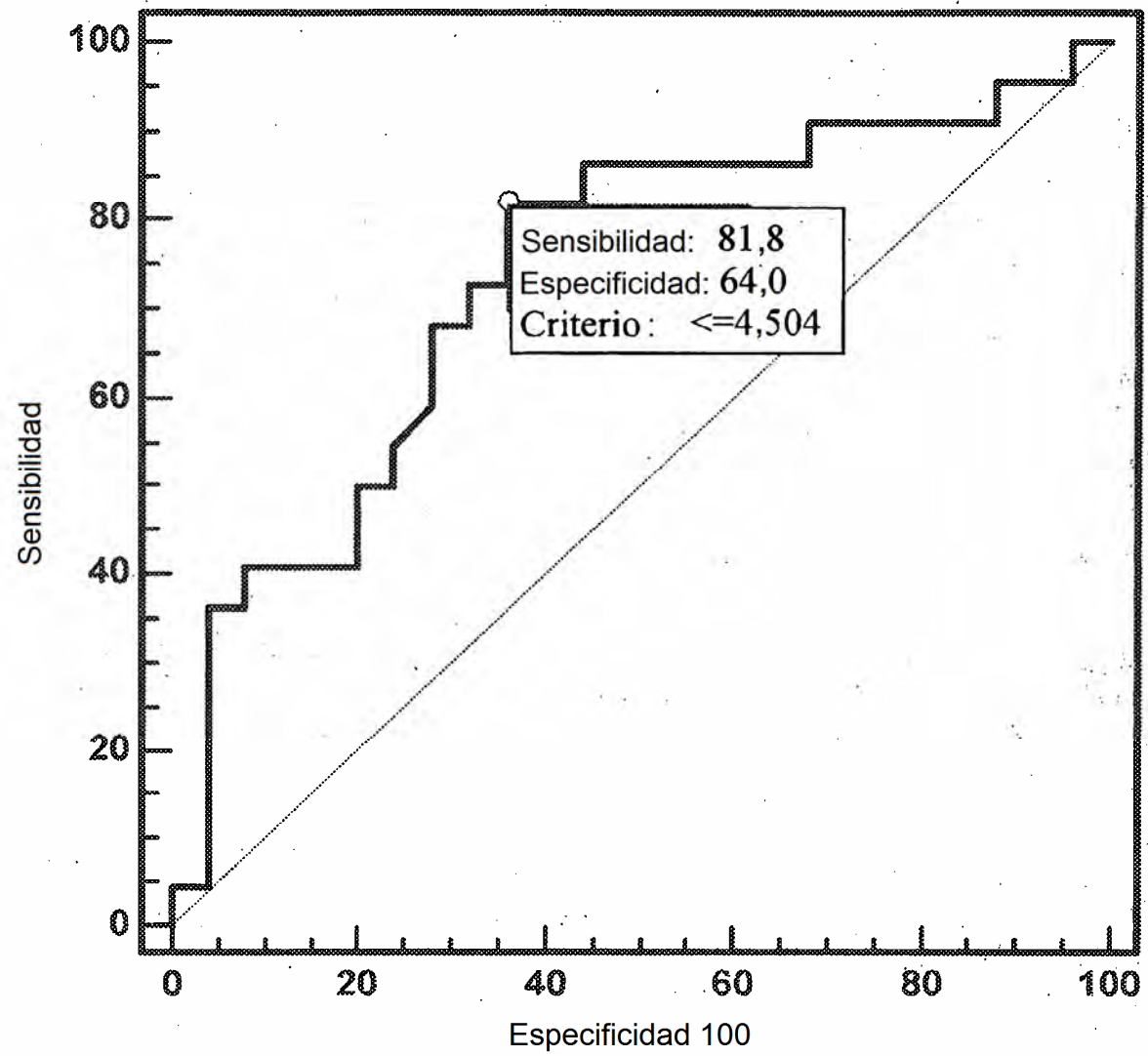


Fig. 5

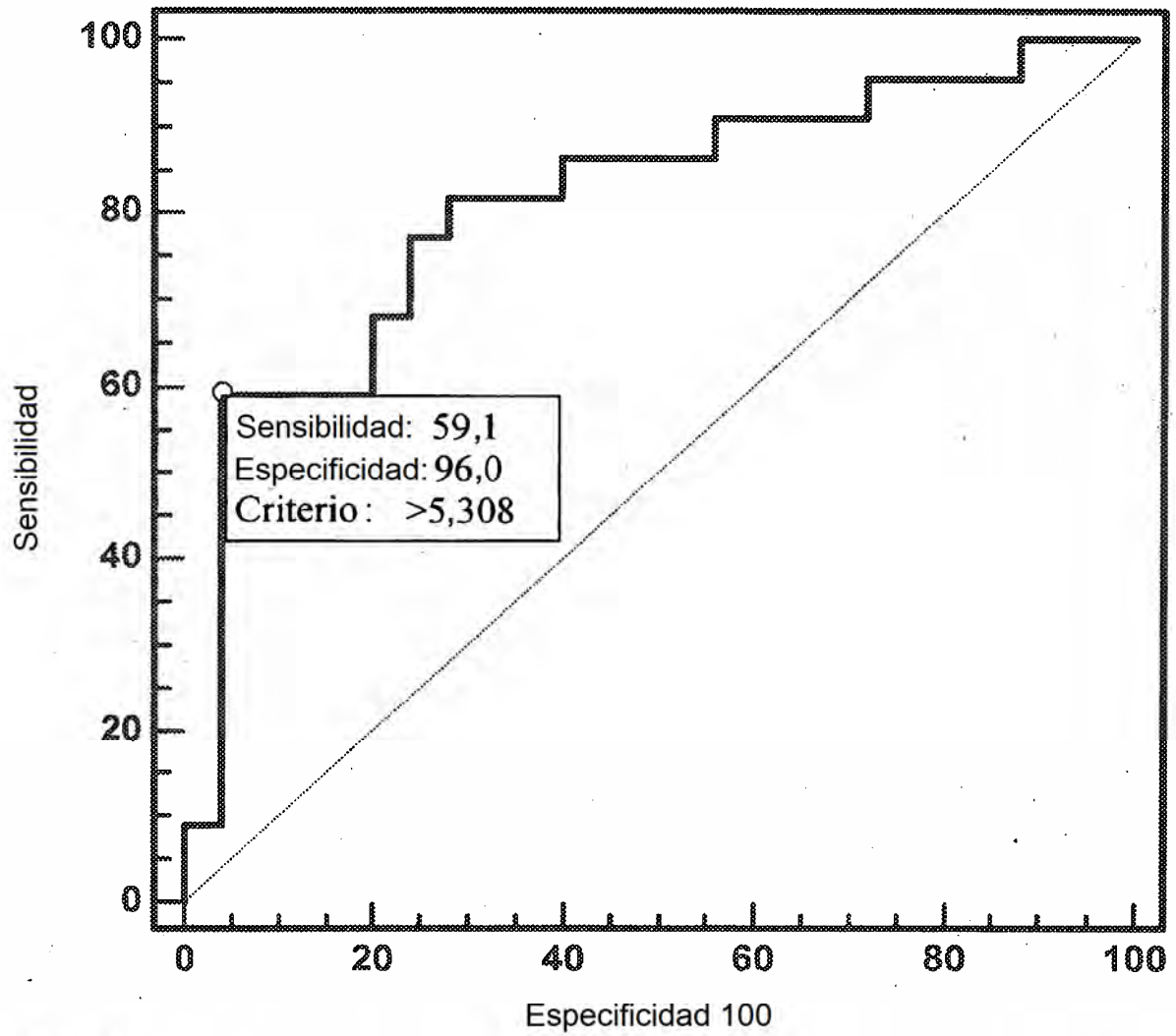


Fig. 6

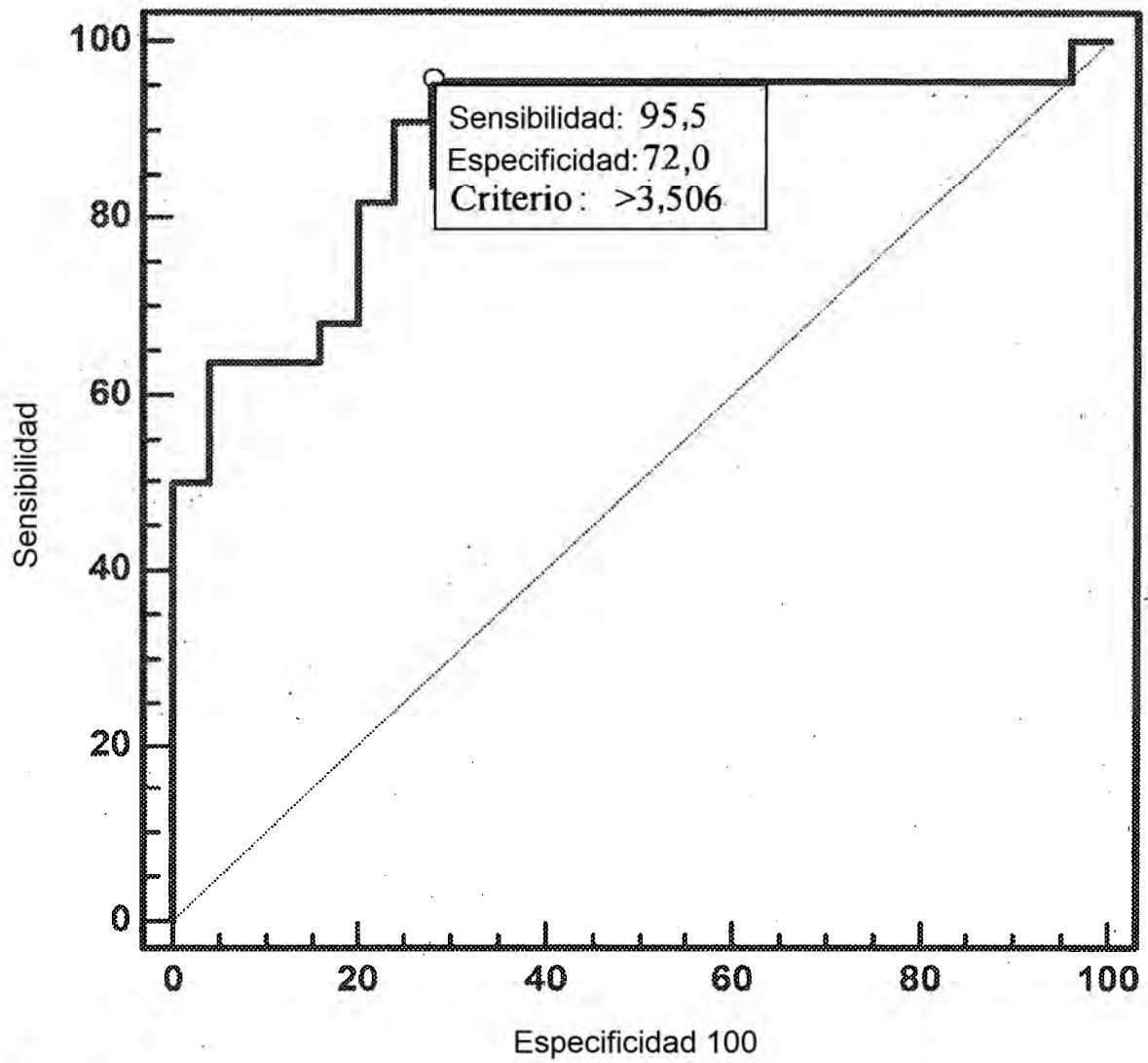


Fig. 7

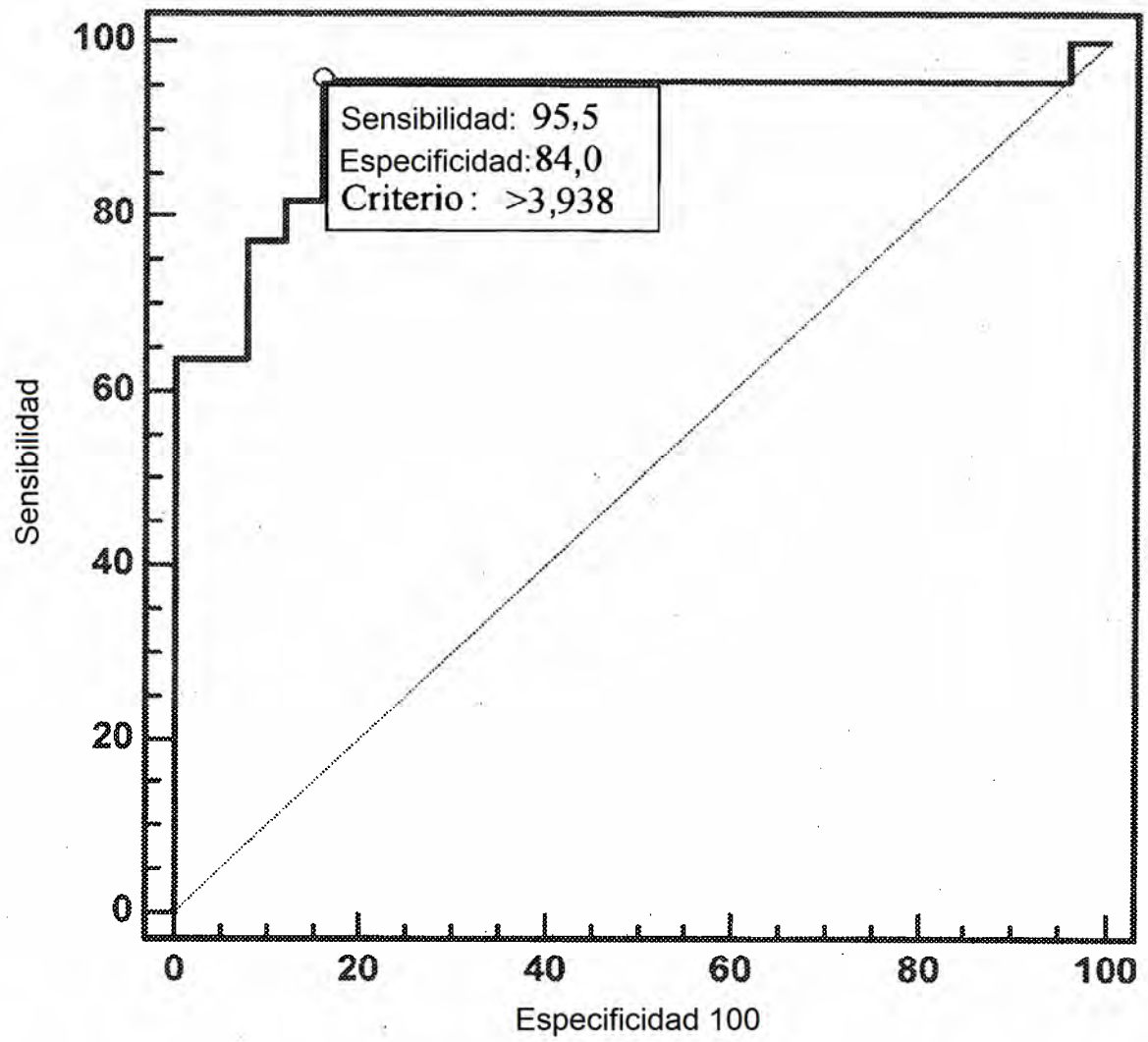


Fig. 8

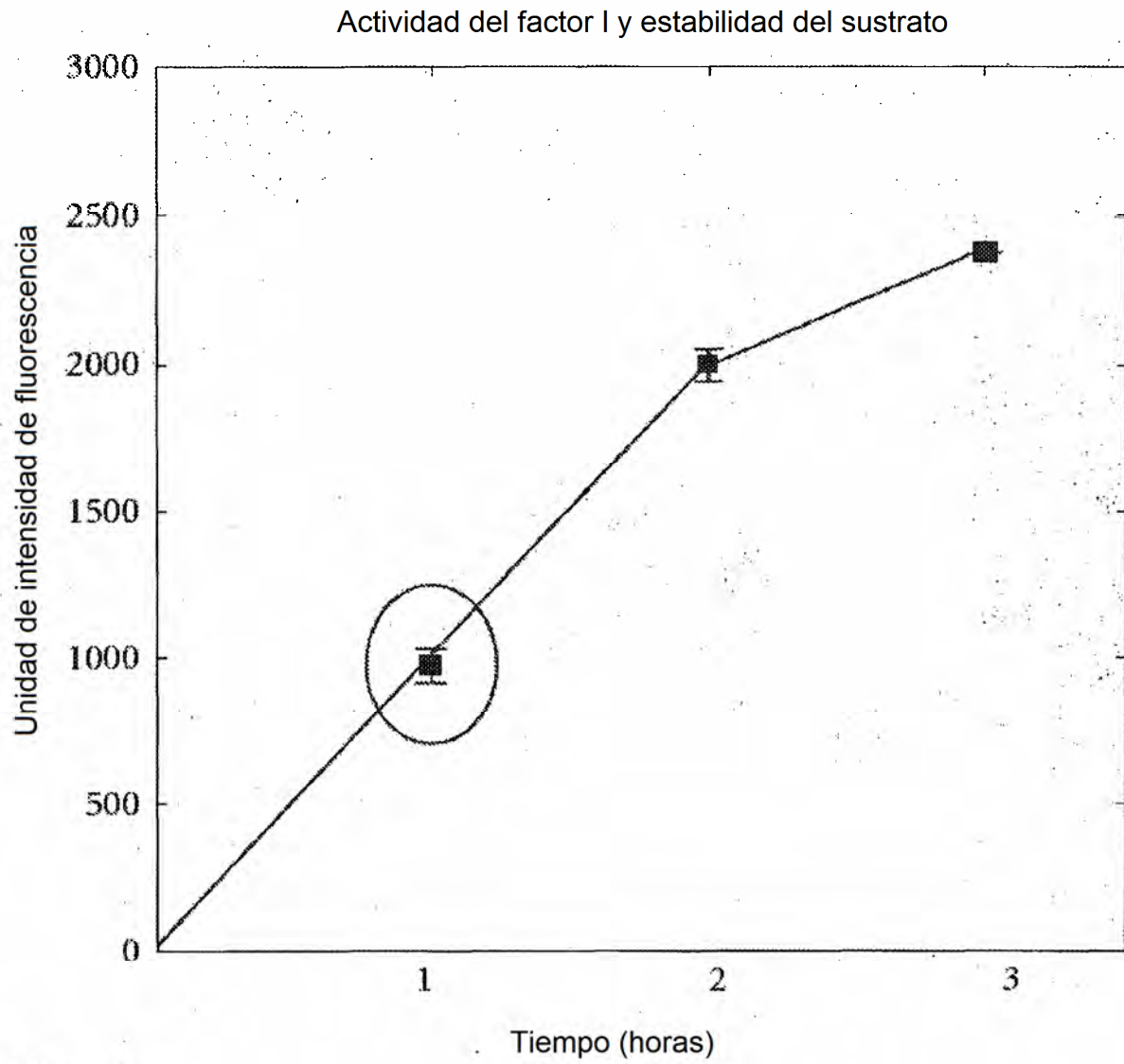


Fig. 9

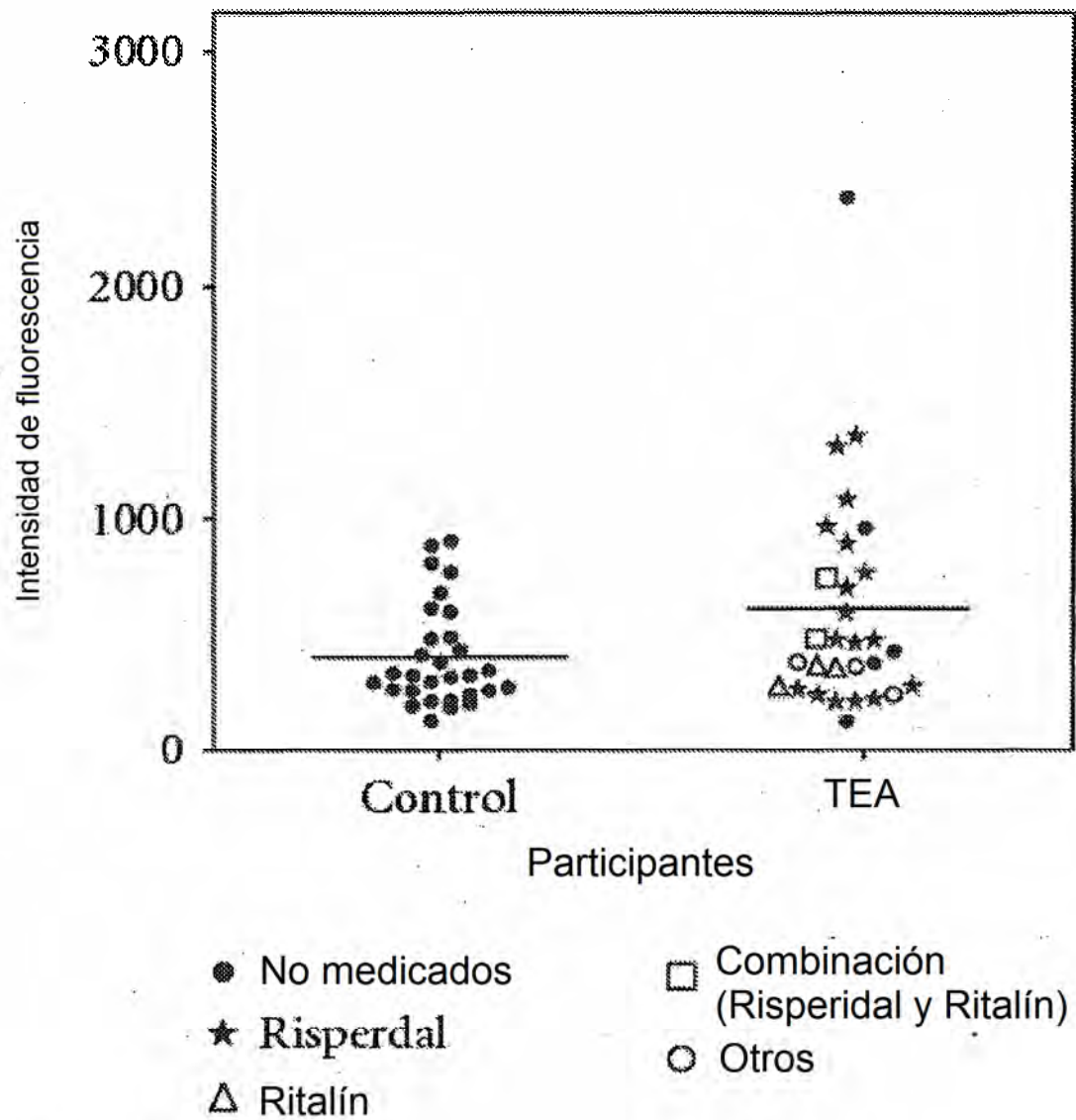


Fig. 10a

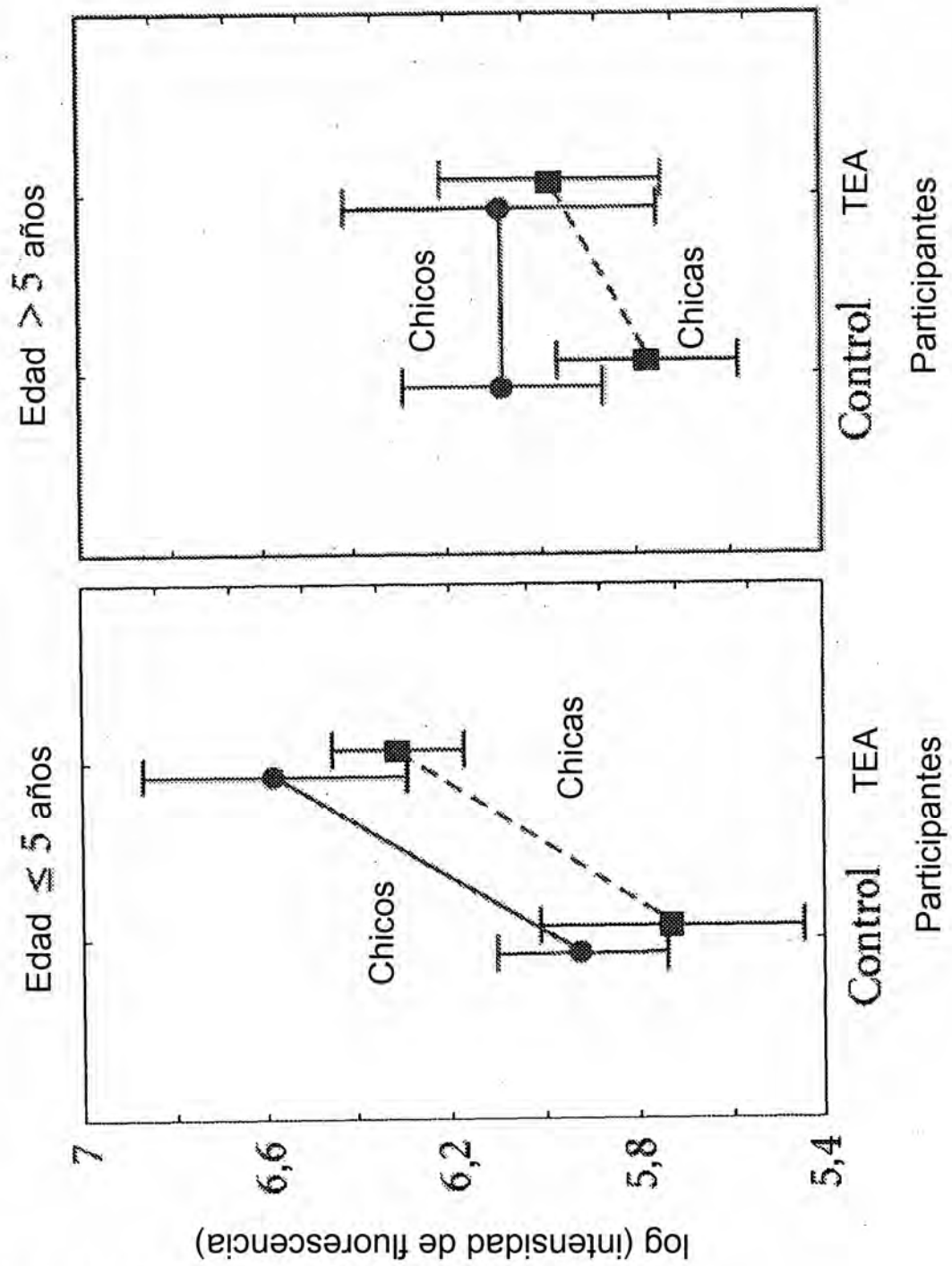


Fig. 10b