

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 918**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 27/62 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2010 PCT/JP2010/003295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO2010134308**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 10777546 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2444814**

54 Título: **Biomarcador para trastornos mentales, incluyendo trastornos cognitivos, y método de utilización de dicho biomarcador para la detección de trastornos mentales, incluyendo los trastornos cognitivos**

30 Prioridad:

19.05.2009 JP 2009121226

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**MCBI INC. (100.0%)
9-29, Matsushiro 4-chome Tsukuba-shi
Ibaraki 305-0035, JP**

72 Inventor/es:

**UCHIDA, KAZUHIKO;
ISHII, TAKASHI;
MENO, KOHJI y
SUZUKI, HIDEAKI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 918 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 para trastornos mentales, incluyendo trastornos cognitivos, y método de utilización de dicho biomarcador para la detección de trastornos mentales, incluyendo los trastornos cognitivos

La presente invención se refiere a nuevos biomarcadores de deterioro cognitivo, incluyendo el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer y a métodos de detección de deterioro cognitivo utilizando dichos biomarcadores. Asimismo, la presente invención se refiere a nuevos biomarcadores para enfermedades neurológicas no demencias tales como la depresión, la esquizofrenia, etc., y a métodos para la detección de enfermedades neurológicas no demencias utilizando dichos biomarcadores.

Antecedentes de la técnica

Los medios utilizados comúnmente para diferenciar entre los estados normales y no normales de un sujeto humano utilizando sus materiales biológicos son principalmente los que han sido utilizados en el campo del diagnóstico. Los métodos utilizados más frecuentemente son los que presentan como dianas biomarcadores en sangre. En el presente campo se ha realizado una medición comparativa de la cantidad de una proteína específica o péptido que presenta un peso molecular inferior a 10.000 o, en el caso de una proteína enzimática, las actividades enzimáticas en muestras de sujetos (sanos) normales y las procedentes de individuos enfermos para ayudar al diagnóstico. En la presente memoria, antes de someter a ensayo muestras reales, se realizan mediciones en un número fijo de muestras procedentes de controles sanos y de pacientes con determinadas enfermedades con respecto a la cantidad o cantidades o actividad (actividades) de proteínas o péptidos específicos individuales o múltiples y se determinan los intervalos respectivos de los valores anormales y normales. A continuación, se analiza la muestra que debe evaluarse mediante el mismo método y el valor resultante se evalúa con respecto a si se encuentra en el intervalo normal o en un intervalo anormal.

En las mediciones reales, la cantidad o cantidades de la proteína o proteínas o péptido o péptidos especificados en las muestras de ensayo, sin modificación o después de dilución, se determinan mediante la utilización de un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) que utiliza un anticuerpo primario o secundario marcado con un enzima que reacciona con un sustrato que rinde un color con la reacción, un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA, por sus siglas en inglés), un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), que utiliza un anticuerpo primario o secundario marcado con un isótopo radioactivo y, en el caso de que la proteína sea un enzima, la medición de la actividad del enzima mediante la adición del sustrato del mismo y la determinación de la intensidad del color producido, etc. Estos métodos basados en anticuerpos se denominan métodos de marcaje enzimática, fluorescente o radioisotópico, respectivamente. Además, existe un método en el que un producto de reacción enzimática derivado del sustrato correspondiente se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Adicionalmente, existe un método en el que se combina la HPLC con un espectrómetro de masas, denominado CL-EM/EM, y existe un método denominado seguimiento de la reacción seleccionada (SRM, por sus siglas en inglés)/seguimiento de múltiples reacciones (MRM, por sus siglas en inglés) que utiliza CL-EM/EM. En otro método para determinar la concentración en una muestra, se somete a un pretratamiento apropiado y se lleva a cabo la separación de las proteínas o péptido mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) y se determina la proteína o péptido diana mediante tinción de plata, tinción de azul de Coomassie o tinción inmunológica (transferencia western) que utiliza un anticuerpo con diana en la proteína o péptido. Todavía adicionalmente, existe un método que utiliza la espectrometría de masas para determinar la cantidad de proteína o péptido diana en muestras fraccionadas mediante cromatografía de columna. En lugar de cromatografía de columna también pueden utilizarse chips de proteínas y perlas magnéticas con el fin de realizar el pretratamiento.

Además, dichos inventores han desarrollado un método inmuno-EM en el que una proteína o péptido diana se captura en perlas (incluyendo perlas magnéticas) con anticuerpo unido a la proteína o péptido, se eluye de las perlas y se determina mediante espectrometría de masas. Además, se ha informado del análisis de proteínas intactas mediante espectrometría de masas utilizando los métodos anteriormente indicados tras la digestión con tripsina, etc. (PTL 1). En este método, se seleccionan proteínas diana intactas mediante fraccionamiento o mediante adsorción a un adsorbente específico de las mismas y después se determinan mediante espectrometría de masas.

El número de pacientes que sufren de deterioro cognitivo, tal como la enfermedad de Alzheimer, se está incrementando rápidamente a la vez que el incremento de la población de edad avanzada en Japón. Se estima que el número de pacientes era de 1,3 millones de 1995 y de 1,9 millones en 2005 y que alcanzará aproximadamente 3,0 millones en 2020. Se informa de que el 60% a 90% de los casos de deterioro cognitivo se deben a enfermedad de Alzheimer. Debido a que la manifestación de la enfermedad de Alzheimer es no sólo la pérdida de memoria sino varias alteraciones en el trabajo diario, el incremento de los pacientes de esta enfermedad se está convirtiendo en una cuestión social importante que debe resolverse. En Japón, debido a que el hidrocóloruro de donepezilo, un inhibidor de esterasa anti-acetilcolina, se ha encontrado disponible para el tratamiento médico de la enfermedad de Alzheimer desde 1999, se ha podido 'enlentecer' eficientemente el avance del deterioro cognitivo en estos pacientes en los casos diagnosticados en un estadio temprano. De esta manera, en la medicación de la enfermedad de Alzheimer, la cuestión más importante es el 'diagnóstico precoz' para tratar los pacientes eficazmente con los fármacos actuales y los fármacos futuros.

A continuación se proporcionan los criterios principales de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer descritos en el DSM IV, que ha sido publicado por la American Psychiatric Association (NPL 1).

5 A. El desarrollo de múltiples déficits cognitivos manifestados en tanto:

(1) deterioro de la memoria (deterioro de la capacidad de aprender nueva información o de recordar información previamente aprendida)

(2) una (o más) de las alteraciones cognitivas siguientes:

- 10 a) afasia (alteración del lenguaje)
 b) apraxia (deterioro de la capacidad de realizar actividades motoras a pesar de presentar una función motora intacta)
 c) agnosia (fracaso en el reconocimiento o identificación de los objetos a pesar de presentar una función sensorial intacta)
 15 d) alteraciones del funcionamiento ejecutivo (es decir, planificación, organización, secuenciación y abstracción).

20 B. Los déficits cognitivos en los criterios A1 y A2 provocan un deterioro significativo del funcionamiento social o laboral y representan un declive significativo respecto a un nivel de funcionamiento previo.

Existen varios tipos de trastorno neurológico relacionados con la enfermedad de Alzheimer (EA). Debido a que la disfunción cognitiva aparece gradualmente en la demencia, también en la EA, existe un pre-estadio de demencia similar al estado de enfermedad. Este estadio se denomina deterioro cognitivo leve (DCL). En los Estados Unidos, el 10% del DCL se desarrolla en EA en 1 año y el 50% del DCL se desarrolla en EA en 4 años. El DCL se define como una condición caracterizada por un declive cognitivo recién adquirido que se manifiesta en una medida que excede la esperable por edad o nivel de formación, pero que no provoca un deterioro funcional significativo y que no supone alteraciones de la vida diaria. La demencia frontotemporal (degeneración lobular frontotemporal (DLF)) se manifiesta en pérdida de la conciencia personal, pérdida de la conciencia social, hiperoralidad y comportamiento perseverante estereotipado. Estas características clínicas son diferentes de las de la EA. La DLF incluye la enfermedad de Pick, que se caracteriza microscópicamente por cuerpos de Pick habitualmente presentes en el córtex del lóbulo temporal límbico, paralímbico y ventral. La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) se caracteriza por ser una enfermedad progresiva y entre los síntomas psiquiátricos se incluyen ansiedad, depresión, alucinaciones (habitualmente visuales) y delirios (creencias falsas). Se cree que la DCL es el segundo subtipo más común y que 10% a 30% de las demencias son DCL. Los síntomas de la DCL están causados por la acumulación histológica de cuerpos de Lewy. La DLF y DCL pertenecen a la clase de enfermedades neurológicas demencias ya que también se produce pérdida de memoria, de capacidad de resolución de problemas y de capacidad de mantener el control emocional (NPL 1). En la descripción de la presente patente, el deterioro cognitivo incluye la EA, la DCL y las enfermedades neurológicas demencias.

40 Los ensayos de cribado para la demencia utilizados ampliamente son la escala de demencia de Hasegawa revisada (HDS-R, por sus siglas en inglés) y el minixamen de estado mental (MMSE, por sus siglas en inglés). En estos ensayos de cribado, el evaluador realiza varias preguntas y evalúa el nivel de deterioro cognitivo de cada sujeto mediante puntuaciones. HDS-R es una versión revisada de la HDS publicada en 1991. En la HDS-R, el ensayo consiste de 9 preguntas para analizar la orientación, memoria, cálculo, retentiva y capacidad de recuerdo, y sentido común. La puntuación total es 30 y una persona con una puntuación inferior a 23 se sospecha que presenta demencia. MMSE fue desarrollado en Estados Unidos para cribar y diagnosticar la demencia y para analizar la función cognitiva global, con ítems que evalúan la orientación, el recuerdo de palabras, la atención y el cálculo, las capacidades lingüísticas y la capacidad visuoespacial (capacidad de dibujo). Este ensayo consiste de 11 preguntas y la puntuación máxima es 30 y una persona con una puntuación inferior a 23 se sospecha que presenta demencia. Los resultados de la HDS-R y la MMSE coinciden. Ambos son utilizados para el cribado, no para el diagnóstico y ni para la estadificación del progreso de la enfermedad de la demencia (NPL 1).

55 Las técnicas de imagen neurológica para la demencia son la tomografía computerizada (TC) y las imágenes de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), las cuales evalúan los cambios morfológicos tales como la atrofia cerebral y la dilatación ventricular, y la tomografía computerizada de emisión de fotones únicos (SPECT, por sus siglas en inglés), que analiza el flujo sanguíneo en regiones del cerebro y la PET (por sus siglas en inglés), que muestra el metabolismo cerebral a partir de la medición del consumo de oxígeno y azúcar. Las técnicas de imagen nuclear SPECT y PET pueden identificar la disfunción neuronal al estadio preclínico (NPL 1). Sin embargo, estas técnicas de neuroimagen no pueden ser utilizadas generalizadamente en los hospitales debido a que requieren instalaciones especiales para llevar a cabo las técnicas de imagen nuclear y las neuroimágenes pueden no ser un ensayo objetivo ya que el diagnóstico por imágenes es completamente dependiente de las habilidades del médico que analiza las imágenes.

65 De esta manera, los presentes métodos de cribado y diagnóstico de la demencia, incluyendo la EA, dependen de ensayos que no son objetivos y que dependen de caros instrumentos, por lo que resulta muy difícil utilizar los ensayos actualmente disponibles para el cribado de los estadios tempranos de deterioro cognitivo. En el caso de

que dispusiésemos de biomarcadores sanguíneos (séricos/plasmáticos) de deterioro cognitivo, que permitiesen un ensayo objetivo utilizando especímenes fáciles de obtener, podríamos identificar el deterioro cognitivo en un estadio temprano (preclínico) mediante la utilización de un análisis de sangre con dicho biomarcador. La presente patente proporciona nuevos biomarcadores y un nuevo y potente método diagnóstico para el deterioro cognitivo mediante la utilización de dichos biomarcadores y biomarcadores descritos en la presente memoria. Además, la presente patente proporciona un método diagnóstico y nuevos biomarcadores para enfermedades neurológicas no demencias tales como la depresión, la esquizofrenia, etc.

Lista de referencias

Literatura de patentes

LTP 1, JP-A-2004-333274
LTP 2, JP-A-2006-308533

Literatura no de patentes

LNP 1, "The better understanding of Alzheimer's disease", editado por Imaharu Nakano y Hldehiro Mizusawa, Nagai Shoten Co., Ltd., 2004 (en japonés)
LNP 2, Benkirane N. et al., J. Biol. Chem. Vol. 268, 26279-26285, 1993.

El documento nº WO03087768 (A2) da a conocer la provisión de dianas mitocondriales para ensayos de cribado de fármacos y para la intervención terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas a la función mitocondrial alterada. Se proporcionan secuencias de aminoácidos completas [SEC ID nº 1 a nº 3025] de polipéptidos que comprenden el proteoma mitocondrial del corazón humano utilizando proteínas fraccionadas derivadas de preparaciones mitocondriales altamente purificadas con el fin de identificar componentes moleculares mitocondriales previamente no identificados.

Descripción resumida de la invención

Problema técnico

La presente invención presenta como objetivos la presentación de métodos para la detección del deterioro cognitivo, incluyendo el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer, utilizando una proteína o péptido parcial de la misma que difiere en la presencia o ausencia de la misma, o en la cantidad de la misma en sujetos con deterioro no cognitivo (incluyendo personas sanas; sujetos humanos que pueden encontrarse afectados por cualquier enfermedad y no afectados por deterioro cognitivo) y pacientes de deterioro cognitivo, y presenta como objetivo adicional presentar biomarcadores que comprenden dicha proteína y dicho péptido parcial para la utilización en la detección del deterioro cognitivo, incluyendo el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, la presente invención presenta como objetivo presentar nuevos biomarcadores para enfermedades neurológicas no demencias tales como la depresión, la esquizofrenia, etc., además de métodos para la detección de deterioro cognitivo mediante la utilización de dichos biomarcadores.

Solución al problema

Los presentes inventores han investigado con el fin de encontrar medios para detectar el deterioro cognitivo y han encontrado un péptido capaz de detectar el deterioro cognitivo y enfermedades psiquiátricas, entre ellas el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer, en el suero. Dichos péptidos encontrados en la presente invención resultan significativos como biomarcador para la detección en el caso del suero, no sólo en otros materiales biológicos tales como la sangre, el plasma, el líquido cerebroespinal y la orina. Asimismo, la proteína o el péptido que es el origen de dichos péptidos (en lo sucesivo denominados proteínas o péptidos intactos) también resulta significativo como biomarcador. La presente invención proporciona un péptido o proteína según se define en la reivindicación 1, un método in vitro para la detección de enfermedades psiquiátricas o deterioro cognitivo según se define en la reivindicación 5, y un kit según se define en la reivindicación 7 o 8. Se dan a conocer realizaciones ventajosas en las reivindicaciones dependientes respectivas.

Específicamente, dichos inventores han encontrado un biomarcador que comprende por lo menos una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste de precursor de neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 1, un precursor de protrombina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 3, pendrina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 6, coatómero subunidad zeta-1 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 8, precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 1,0, precursor de gelsolina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 13, un precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 15, subunidad del factor 3 de inicio de traducción eucariótica que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 18, y proteína 27 que

contiene repeticiones ricas en leucinas que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 20, podrían utilizarse como biomarcadores para la detección de enfermedad psiquiátrica o deterioro cognitivo.

Además, dichos inventores han encontrado un biomarcador que comprende por lo menos un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste de péptido NRX2B derivado de precursor de neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2, un péptido derivado de precursor de protrombina, THRB(R-), que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 4, un péptido derivado de precursor de protrombina, THRB(R+), que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 5, el péptido S26A4 derivado de pendrina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 7, péptido COPZ1 derivado del coatómero subunidad zeta-1 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 9, péptido RARR2(S-) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 11, péptido RARR2(S+) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 12, el péptido GELS derivado de precursor de la gelsolina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 14, el péptido CLUS(SDVP N-term.) derivado de precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 16, el péptido CLUS(RFFT N-term.) derivado de precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 17, péptido EIF3J derivado derivado de la subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 19, y el péptido LRC27 derivado de la proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 21, podrían utilizarse como biomarcadores para la detección de enfermedad psiquiátrica o deterioro cognitivo.

Estos inventores han completado la presente invención al conseguir la determinación simultánea de esta multitud de proteínas y péptidos parciales de las mismas mediante la utilización del método de cromatografía líquida de alto rendimiento bidimensional-MALDI TOF-EM y del método de inmuno-EM.

[1] Un biomarcador para la detección de enfermedades psiquiátricas o deterioro cognitivo que comprende un fragmento de proteína o péptido no inferior a 5 residuos aminoácidos que surge de por lo menos una proteína o péptido seleccionado de entre el grupo que consiste de precursor de neurexina-2-beta consistente de la secuencia de aminoácidos expresada en la SEC ID nº 1, un precursor de protrombina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 3, pendrina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 6, coatómero subunidad zeta-1 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 8, precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 10, precursor de gelsolina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 13, un precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 15, subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 18, y proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 20.

[2] Un biomarcador para la detección de enfermedades psiquiátricas que comprende por lo menos un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste del péptido NRX2B derivado de precursor de neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2, un péptido derivado de precursor de protrombina, THRB(R-), que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 4, un péptido derivado de precursor de protrombina, THRB(R+), que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 5, el péptido S26A4 derivado de pendrina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 7, péptido COPZ1 derivado del coatómero subunidad zeta-1 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 9, péptido RARR2(S-) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 11, péptido RARR2(S+) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 12, el péptido GELS derivado de precursor de la gelsolina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 14, clusterina.

[3] Un biomarcador para la detección de deterioro cognitivo que comprende por lo menos un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste del péptido NRX2B derivado de precursor de neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2, un péptido derivado de precursor de protrombina, THRB(R-), que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 4, un péptido derivado de precursor de protrombina, THRB(R+), que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 5, el péptido S26A4 derivado de pendrina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 7, péptido COPZ1 derivado del coatómero subunidad zeta-1 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 9, péptido RARR2(S-) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 11, péptido RARR2(S+) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada

- 5 mediante la SEC ID nº 12, el péptido GELS derivado de precursor de la gelsolina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 14, el péptido CLUS(SDVP N-term.) derivado de precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 16, el péptido CLUS(RFFT N-term.) derivado de precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 17, péptido EIF3J derivado derivado de la subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 19, y el péptido LRC27 derivado de la proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 21.
- 10 [4] Un biomarcador de deterioro cognitivo que comprende los péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2, 5, 7, 9, 11, 12, 14 y 16 que se encuentra presente o incrementada en el material biológico procedente de pacientes de deterioro cognitivo en comparación con el material biológico procedente de sujetos que no sufren de una enfermedad psiquiátrica.
- 15 [5] Un biomarcador de deterioro cognitivo que comprende los péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 4, 17, 19 y 21, que no se encuentra presente o se encuentra reducida en el material biológico procedente de pacientes de deterioro cognitivo en comparación con el material biológico procedente de sujetos que no sufren de una enfermedad psiquiátrica.
- 20 [6] Un biomarcador de enfermedad de Alzheimer que comprende los péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2 que se encuentra presente o incrementada en material biológico procedente de pacientes de enfermedad de Alzheimer en comparación con material biológico de sujetos que no sufren de una enfermedad neurológica no demencia.
- 25 [7] Un biomarcador de enfermedad de Alzheimer que comprende los péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 4 que no se encuentra presente o se encuentra reducido en material biológico procedente de pacientes de enfermedad de Alzheimer en comparación con material biológico de sujetos que no sufren de una enfermedad neurológica no demencia.
- 30 [8] Método para la detección de enfermedad psiquiátrica que implica la determinación en material biológico de por lo menos un biomarcador de enfermedad psiquiátrica tal como se ha indicado en [1] o [2].
- [9] Método para la detección de deterioro cognitivo que implica la determinación en material biológico de por lo menos un biomarcador de deterioro cognitivo tal como se ha indicado en [1] o [3].
- 35 [10] Método para la detección de deterioro cognitivo en el que se evalúa si el paciente sufre de deterioro cognitivo en el caso de que, tras la determinación en material biológico de por lo menos un biomarcador de deterioro cognitivo tal como se indica en [4], se detecta la presencia de dicho biomarcador en cantidad más elevada que en sujetos que no sufren de una enfermedad psiquiátrica.
- 40 [11] Método para la detección de deterioro cognitivo en el que se evalúa que el paciente sufre de deterioro cognitivo en el caso de que, tras la determinación en material biológico de por lo menos un biomarcador de deterioro cognitivo tal como se ha indicado en [5], se detecta la presencia de dicho biomarcador en cantidad inferior que en sujetos que no sufren de una enfermedad psiquiátrica.
- 45 [12] Método para la detección de una enfermedad psiquiátrica tal como se indica en [8], en el que la detección se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunotransferencia, transferencia western, un método de anticuerpos marcados enzimática, fluorescente o radioisotópicamente, espectrometría de masas, un método de inmuno-EM o un método de resonancia del plasmón superficial.
- 50 [13] Método para la detección de deterioro cognitivo tal como se indica en [9] a [11], en el que la detección se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunotransferencia, transferencia western, un método de anticuerpos marcados enzimática, fluorescente o radioisotópicamente, espectrometría de masas, un método de inmuno-EM o un método de resonancia del plasmón superficial.
- 55 [14] Un kit para la detección de una enfermedad psiquiátrica para determinar por lo menos un biomarcador tal como se indica en [1] o [2].
- 60 [15] Un kit para la detección de deterioro cognitivo para determinar por lo menos un biomarcador tal como se indica en [1], [3] a [5].
- [16] Un kit para la detección de una enfermedad psiquiátrica que contiene un anticuerpo o aptámero contra por lo menos un biomarcador tal como se indica en [1] o [2].
- 65 [17] Un kit para la detección de una enfermedad psiquiátrica que contiene un anticuerpo o aptámero contra por lo menos un biomarcador tal como se indica en las reivindicaciones [1], [3] a [5].

[18] Un kit para la detección tal como se indica en [16] o [17], en el que el anticuerpo o aptámero se solidifica sobre una placa o placas.

5 Efectos beneficiosos de la invención

Según la presente invención, resulta posible diagnosticar un sujeto respecto a si sufre una enfermedad psiquiátrica o deterioro cognitivo mediante la determinación en material biológico obtenido de dicho sujeto del tipo y cantidad de por lo menos un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste del péptido NRX2B derivado de precursor de la neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada en la SEC ID n° 2 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 14, el péptido CLUS(SDVP N-term.) derivado de precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 16, el péptido CLUS(RFFT N-term.) derivado de precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 17, péptido EIF3J derivado de la subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 19, y el péptido LRC27 derivado de la proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 21. Además, resulta posible diagnosticar un sujeto respecto a si sufre de enfermedad de Alzheimer mediante la comparación con el incremento en el material biológico de pacientes de enfermedad neurológica no demencia mediante la determinación de la cantidad de péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 2 y resulta posible diagnosticar un sujeto respecto a si sufre de enfermedad de Alzheimer mediante la comparación con la reducción en el material biológico de pacientes de enfermedad neurológica no demencia mediante la determinación de la cantidad de péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID n° 4.

La presente invención presenta un sistema diagnóstico que presenta una elevada precisión y especificidad. La presente invención permite obtener un diagnóstico altamente preciso del deterioro cognitivo en el que no se disponen de métodos de ensayo específico para materiales biológicos tales como la sangre. Además, los biomarcadores dados a conocer en la presente invención resultan altamente útiles para evaluar la eficacia de los fármacos.

30 Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La figura 1 ilustra el aislamiento de suero de enfermedad de Alzheimer mediante el método de CL-MALDI TOF 2D-EM (Ejemplo 1).

[Fig. 2] La figura 2 ilustra el caso del Marcador A, que es un ejemplo del resultado del análisis diferencial. Tal como se muestra en la figura 3, el Marcador A es el péptido NRX2B derivado precursor de neurexina-2-beta. La figura 2A ilustra una comparación entre ADN, DCL y EA, y la figura 2B ilustra una comparación entre ADN, EA, ENTodas, ENdem y ENnon. Para cada muestra el valor promedio (dividido por 1,000) y la (SD) (dividida por 1,000) son los siguientes: A) ADN 0,1 (0,1); DCL 45,8 (42,2); EA 41,7 (22,2). B) ADN 0,1 (0,2); EA 34,0 (27,8); NDtodos 19,2 (15,8); NDdem 24,3 (20,8); NDnon 14,0 (6,1). C), D) y E) ilustran, respectivamente, la curva COR de las comparaciones DCL vs. ADN, EA vs. ADN y EA vs. ENnon (Ejemplo 1).

[Fig. 3] La figura 3 ilustra el espectro de EM/EM del Marcador A (SEC ID n° 2, NRX2B) obtenido mediante la utilización del espectrómetro de masas TOF/TOF (Ejemplo 1).

[Fig. 4] La figura 4 ilustra la comparación entre los sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y los pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo la demencia, para THRB(R-) (A) y (B) de la figura 4) y THRB(R+) (C) y (D) de la figura 4) en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 5] La figura 5A ilustra la comparación de cada individuo entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de deterioro cognitivo (DCL, EA) para THRB(R-) y THRB(R+) en suero. La figura 5B ilustra la curva COR de la comparación de EA vs. ENnon para THRB(R-) en suero. (Ejemplo 1).

[Fig. 6] La figura 6 ilustra la comparación (A) y (B) de la figura 6 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y los pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para S264A en suero, y la comparación de (C) y (D) de la figura 6 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para COPZ1 en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 7] La figura 7 ilustra la comparación de cada individuo entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de deterioro cognitivo (DCL, EA) para THRB(R-) y THRB(R+) en suero. La figura 5B ilustra la curva COR de la comparación de EA vs. ENnon para THRB(R-) en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 6] La figura 6 ilustra la comparación (A) y (B) de la figura 6 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y los pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para S264A en suero, y la comparación de (C) y (D) de la figura 6 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de enfermedad

psiquiátrica, incluyendo demencia, para COPZ1 en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 7] La figura 7 ilustra la comparación de cada individuo entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de deterioro cognitivo (DCL, EA) para PARR2(S-) (A) de la figura 7 y PARR2(S+) (B) de la figura 7 en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 8] La figura 8 ilustra la comparación (A) y (B) de la figura 8 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para GELS en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 9] La figura 9 ilustra la comparación (A) y (B) de la figura 9 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y los pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para CLUS(SDVP N-term.) en suero, y la comparación de (C) y (D) de la figura 9 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para CLUS(RFFT N-term.) en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 10] La figura 10 ilustra la comparación (A) y (B) de la figura 10 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y los pacientes de enfermedad psiquiátrica, incluyendo demencia, para EIF3J en suero, y la comparación de (C) y (D) de la figura 10 entre sujetos de enfermedad no psiquiátrica (ADN) y pacientes de deterioro cognitivo (DCL, EA) para LRC27 en suero (Ejemplo 1).

[Fig. 11] La figura 11 ilustra el espectro de masas del péptido NRX2B captura y detectado mediante el método de inmuno-EM utilizando un anticuerpo específico de NRX2B de suero de pacientes de EA y de DCL. La figura a la derecha es una vista ampliada de las partes señaladas con flechas en la figura de la izquierda. En la figura de la derecha se muestra para cada pico el péptido NRX2B endógeno (flechas continuas) y el péptido sintético NRX2B marcado isotópicamente (flechas discontinuas) (Ejemplo 4).

Descripción de realizaciones

La presente invención es un método para determinar el tipo y cantidad de proteína intacta y/o péptido parcial de la misma para el caso de que el sujeto de ensayo sufra de deterioro cognitivo así como para el diagnóstico de si el sujeto de ensayo sufre de deterioro cognitivo y para el caso de que al sujeto de ensayo se le haya diagnosticado una enfermedad psiquiátrica. Se dice generalmente de un péptido que es una entidad química constituida mediante polimerización de aminoácidos, de menos de 10.000 de peso molecular, o mediante polimerización de varios y hasta menos de aproximadamente 50 residuos aminoácidos. Aunque en la presente invención puede utilizarse un péptido parcial de una proteína intacta como biomarcador para la detección del deterioro cognitivo, se define dicho péptido parcial como un péptido de menos de 10.000 de peso molecular que consiste de una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína intacta. Dicho péptido puede aparecer como péptido parcial durante la expresión mediante transcripción seguido de la síntesis mediante traducción antes de la maduración en una proteína intacta o como péptido producido mediante digestión enzimática en el cuerpo tras la síntesis de la proteína intacta. Resulta posible que, en el caso de que el cuerpo se encuentre en un estado anormal en el que sufre de una enfermedad tal como el deterioro cognitivo, el mecanismo para la síntesis y regulación de las proteínas se encuentre desregulado. En otras palabras, la presente invención además es un método para determinar si el sujeto de ensayo se encuentra en un estado normal o si sufre de deterioro cognitivo, mediante la utilización del grado de síntesis de proteínas y/o la digestión de proteínas a modo de indicador. La detección del deterioro cognitivo en la presente invención se refiere a la evaluación y diferenciación, es decir, el diagnóstico de si el sujeto de ensayo sufre de deterioro cognitivo. La presente invención puede incluir además la evaluación del riesgo del paciente de sufrir de un deterioro cognitivo más grave.

Específicamente, en un método, entre los ejemplos de proteína intacta que pueden utilizarse para el deterioro cognitivo se incluyen el precursor de la neurexina-2-beta, que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada en la SEC ID nº 1, un precursor de protrombina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 3, pendrina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 6, coatómero subunidad zeta-1 que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 8, precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 10, precursor de gelsolina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 13, un precursor de clusterina que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 15, subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 18, y proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 20, y además pueden utilizarse con el mismo propósito los fragmentos peptídicos que comprenden péptidos parciales de no menos de 5 residuos aminoácidos de dichas proteínas intactas.

Todavía adicionalmente, un ejemplo de biomarcadores para el deterioro cognitivo incluye los péptidos parciales que consisten de la secuencia de aminoácidos expresada en la SEC ID nº 2 del péptido NRX2B derivado del precursor de la neurexina-2-beta, SEC ID nº 4 del péptido THRB(R-) derivado del precursor de protrombina, SEC ID nº 5 del péptido THRB(R+) derivado del precursor de protrombina, SEC ID nº 7 del péptido S26A4 derivado de pendrina, SEC ID nº 9 del péptido COPZ 1 derivado de la subunidad zeta-1 del coatómero, SEC ID nº 11 del péptido

RARR2(S-) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico, SEC ID n° 12 del péptido RARR2(S+) derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico, SEC ID n° 14 del péptido GELS derivado de gelsolina, SEC ID n° 16 del péptido CLUS(SDVP N-term.) derivado del precursor de clusterina, SEC ID n° 17 del péptido CLUS(RFFT N-term.) derivado del precursor de clusterina, SEC ID n° 19 del péptido EIF3J derivado de la subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica, SEC ID n° 21 del péptido LRC27 derivado de la proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas. En la presente invención, las proteínas y péptidos que consisten de las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la SEC ID n° 1 o 2 mediante delección, intercambio y/o adición de uno o unos cuantos aminoácidos pueden utilizarse como biomarcadores y se encuentran comprendidos dentro de la presente invención. La expresión "uno o unos cuantos" en la presente memoria se refiere a "uno o tres", preferentemente "uno o dos", o "uno". Además, entre los péptidos parciales que pueden utilizarse como biomarcadores se incluyen aquellos fragmentos peptídicos que consisten de no menos de 5 residuos aminoácidos que aparecen respectivamente a partir de la SEC ID n° 1 a n° 21. La base de la limitación de los fragmentos peptídicos que consisten de no menos de 5 residuos aminoácidos se proporciona en la descripción, posteriormente, en el documento no de patente n° 2. El documento informa de que un anticuerpo obtenido mediante la utilización del péptido IRGERA como inmunógeno, que era el extremo C-terminal (130-135) de la histona H3, reconoce el péptido IKGGERA derivado mediante el intercambio de K por R y el péptido CGGGERA que se derivó mediante la delección de IR seguido de la adición de CGG. Lo anterior demuestra que la inmunogenicidad (antigenicidad) es reconocida por un péptido de no menos de 4 residuos aminoácidos. Con el fin de expandir dicho resultado a otros péptidos aparte del extremo C-terminal de la histona H3, el número de residuos aminoácidos se define como no inferior a 5 en lugar de 4. Para construir dicho péptido de bajo peso molecular resulta importante para el método de detección y también resulta posible la cuantificación con el método SRM/MRM en la tecnología de CL-EM/EM. Además, el método de inmuno-EM que han desarrollado dichos inventores, en el que la proteína o péptido diana es capturado en perlas (incluyendo perlas magnéticas) con anticuerpo unido a la proteína o péptido, eluido de las perlas y determinado mediante espectrometría de masas, permite la cómoda determinación de la presencia o ausencia o de la cantidad de la proteína diana, fragmento de proteína o péptido sin utilizar 2-DE o cromatografía.

Resulta posible utilizar el método dado a conocer en la presente invención para la evaluación en el estadio de disfunción cognitiva leve del sujeto de ensayo y por lo tanto podría resultar útil en medicina profiláctica. Además, la administración de psicoterapia y/o terapia farmacológica a pacientes con deterioro cognitivo se refleja en la cantidad de proteínas y péptidos parciales en materiales biológicos tales como el suero en el caso de que se haya inhibido la progresión del trastorno. Por lo tanto, mediante la medición de dichas proteínas y péptidos parciales resulta posible evaluar y determinar el efecto terapéutico.

El tipo y cantidad de una proteína en los materiales biológicos puede determinarse mediante diversos métodos. En el caso de que se haya caracterizado la proteína diana (incluyendo un fragmento de proteína y un péptido parcial) y en el caso de que ya se haya obtenido un anticuerpo (anticuerpo primario) del mismo, pueden utilizarse los métodos siguientes:

40 1. Inmunotransferencia

Éste es uno de los métodos más simples. El suero de ensayo en una cantidad fija (aproximadamente 1 microlitro) tras la dilución escalonada se aplica sobre una membrana apropiada, tal como una de nitrocelulosa, y se seca al aire. La membrana se trata con una solución de bloqueo que contiene una proteína, tal como BSA, se lava, se hace reaccionar con anticuerpo primario y se lava. A continuación, la membrana se hace reaccionar con anticuerpo secundario marcado para detectar el anticuerpo primario. Se lava la membrana y el marcaje se visualiza para medir su densidad.

50 2. Transferencia western

Tras la separación mediante electroforesis unidimensional o bidimensional que implica el enfoque isoeléctrico o SDS-PAGE, se transfieren las proteínas sobre una membrana apropiada, tal como de nitrocelulosa, y se determinan las cantidades de las mismas, tal como en la inmunotransferencia anteriormente indicada, utilizando anticuerpo primario y anticuerpo secundario marcado.

55 3. ELISA

El anticuerpo contra la proteína o péptido parcial de la misma se fija en dicha placa en forma de una placa de microtitulación modificada químicamente. Se aplican en la placa cantidades apropiadas de las muestras tras la dilución escalonada y se incuban. Las proteínas y péptidos no capturados se eliminan mediante lavado. A continuación, se incuban la placa con anticuerpo secundario marcado con una sustancia fluorescente o quimioluminiscente o enzima. Tras la adición del sustrato respectivo, se mide la fluorescencia, quimioluminiscencia o luz visible debida a la reacción enzimática, para la evaluación y decisión.

65 A continuación se ilustran ejemplos adicionales de métodos (ver LTP 2), aunque la invención no se encuentra limitada a dichos ejemplos.

4. Métodos que utilizan micromatrices (microchips)

Una micromatriz es un término general para dispositivos en los que se aplican ordenadamente materiales solidificados con afinidad para sustancias diana sobre un soporte sólido (placa). En la presente invención se aplican ordenadamente anticuerpos o aptámeros de proteínas y péptidos parciales. Se aplica una muestra de material biológico sobre la micromatriz para la fijación de proteínas o péptidos parciales diana y a continuación se incubaba la micromatriz con anticuerpo secundario marcado con sustancia fluorescente o quimioluminiscente o enzima. Tras la adición del sustrato respectivo, se mide la fluorescencia, quimioluminiscencia o luz visible debida a la reacción enzimática.

5. Espectrometría de masas

En la espectrometría de masas, por ejemplo, el anticuerpo de una proteína o péptido parcial especificado se une a microperlas químicamente modificadas o placa (chip de proteínas). Las microperlas pueden ser perlas magnéticas. No existen requisitos para el material de la placa. El anticuerpo que debe utilizarse podría ser: (1) un anticuerpo que reconoce la forma de longitud completa de la proteína especificada únicamente, (2) un anticuerpo que reconoce únicamente un péptido parcial, (3) todos los anticuerpos que reconocen tanto la proteína especificada como su péptido parcial, o una combinación de (1) y (2), (1) y (3) o (2) y (3). Las muestras tras la dilución escalonada con solvente original o tampón se añaden a las microperlas o placa portadora del anticuerpo o anticuerpos y se incuban. Las proteínas y péptidos parciales no capturados se eliminan mediante lavado. La proteína o péptido parcial capturado con microperlas o placa se eluye y se analiza mediante espectrometría de masas con MALDI-TOF-EM, SELDI-TOF-EM, etc. Las mediciones se realizan con respecto a la masa e intensidad del pico debido a la proteína, fragmento de proteína o péptido parcial. Antes de las mediciones, se añade una cantidad fija de una sustancia que sirve de estándar interno al material biológico original y también se mide la intensidad del pico de la misma. La concentración de la diana en el material biológico original puede calcularse a partir de la proporción de intensidades del pico de la diana y del pico del estándar interno. Lo anterior se denomina método de inmuno-EM. Además, resulta posible la cuantificación, tras diluir la muestra con el solvente original o tampón, o tras la eliminación de parte de las proteínas, mediante separación por HPLC seguida de espectrometría de masas utilizando el método de ionización por electropulverización (IEP). De esta manera puede utilizarse el método de SRM/MRM para la cuantificación absoluta utilizando un péptido de estándar interno marcado isotópicamente.

Además, además de los métodos anteriormente indicados, resulta posible analizar proteínas y péptidos parciales mediante la utilización de 2-DE, resonancia del plasmón superficial, etc.

La presente invención incluye el método de detección del deterioro cognitivo a partir de la presencia o ausencia o cantidad del biomarcador anteriormente indicado tras aplicar el material biológico obtenido del sujeto de ensayo a 2-DE o resonancia del plasmón superficial.

40 Ejemplo 1

Descubrimiento de un péptido marcador para la detección del deterioro cognitivo utilizando la cromatografía líquida bidimensional (2D-CL)-MALDI TOF-EM.

45 (1) Muestras de suero

A continuación, los caracteres entre paréntesis son una abreviatura.

Los sueros obtenidos de 20 pacientes de EA (enfermedad de Alzheimer), 20 pacientes ADN (sujetos que no sufren de enfermedad psiquiátrica y pacientes de edad y sexo correspondientes con EA, "N" significa normal) y 20 pacientes de ENtodas (enfermedad neurológica). ENtodas consiste de 10 pacientes ENdem (enfermedad neurológica demencia) y 10 ENnon (enfermedad neurológica no demencia). Además, ENdem consiste de demencia con cuerpos de Lewy y demencia frontotemporal, consistiendo cada uno de 5 casos y EDnon consiste de esquizofrenia y depresión, consistente cada uno de 5 casos.

55 (2) Métodos

Tras la adición de 475 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% a cada uno de los 25 µl de suero, se sometieron a ebullición las muestras durante 15 min. a 100 grados. A continuación, con el fin de recuperar péptidos de un peso molecular de 10.000 o inferior, se llevó a cabo la ultrafiltración mediante la utilización de una unidad de filtración YM-10 (Millipore Corp.). A continuación, el análisis utilizando 2D-CL-MALDI TOF-EM se llevó a cabo de la manera siguiente. En otras palabras, se fraccionaron las muestras recuperadas en 1.146 fracciones por muestra mediante la utilización de HPLC bidimensional (columna de intercambio catiónico SCX y columna de fase inversa C18). Todas las muestras fraccionadas se aplicaron por puntos en una placa diana de MALDI para espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF (ultraflex TOF/TOF, Bruker Daltonics) y solución de matriz (ácido alfa-ciano-hidroxycinámico, CHCA) y se mezclaron y se cristalizaron, y la masa y el área de pico de la masa se midieron automáticamente en modo reflectrón mediante irradiación de la muestra cristalizada mediante láser. Se normalizó el área de pico con 250

fmoles por cada pocillo de fragmento de bradiquinina 1-7 que se añadió a la solución de matriz previamente. En otras palabras, se calculó el valor del área como 10.000 veces el valor mediante la división del área de pico en términos de masa específica de muestra por el área de pico obtenida de 250 fmoles de fragmento de bradiquinina 1-7. Dicho valor de área corresponde a 25 µl de suero de muestra. La detección de la diferencia de abundancia de los péptidos en suero entre grupos (denominado análisis diferencial) se llevó a cabo utilizando el software de análisis estadístico multigrupo DeView desarrollado por los presentes inventores. Se determinó directamente la secuencia de aminoácidos de los péptidos en los que se observaron diferencias de abundancia mediante análisis de EM/EM mediante TOF/TOF ultraflex y se identificaron las proteínas o péptidos de origen intactos.

(3) Resultados

La figura 1 muestra el resultado que se obtuvo del suero de un caso de paciente de EA que se aplicó al 2D-CL-MALDI TOF-EM. Las muestras se fraccionaron en 6 fracciones mediante columna de intercambio catiónico SCX en la primera dimensión, y después cada una de las fracciones se fraccionaron en 191 fracciones mediante columna de fase inversa C18. Los espectros de masas de 191 fracciones se obtuvieron mediante mediciones de MALDI TOF-EM. Debido a que el eje horizontal es m/z y el eje vertical son las fracciones de cromatografía de columna de fase inversa; la figura 1 se visualizó mediante DeView. SCX 1 muestra las fracciones eluidas; SCX 2 muestra las fracciones eluidas con una concentración salina de 10%; SCX 3 muestra las fracciones eluidas con una concentración salina de 20%; SCX 4 muestra las fracciones eluidas con una concentración salina de 30%; SCX 5 muestra las fracciones eluidas con una concentración salina de 50%; SCX 6 muestra las fracciones eluidas con una concentración salina de 100%. Tal como se observa en la figura 1, se encuentran presentes muchos péptidos en muchos sueros de SCX 1, SCX 3, SCX 4 y SCX 5. El número total de péptidos fraccionados mediante 2D-CL y detectados mediante MALDI TOF-EM fue de aproximadamente 4.000.

A modo de ejemplo de los resultados del análisis diferencial, la figura 2 muestra el caso del marcador A. El marcador A, tal como se muestra posteriormente, en la figura 3, era el péptido NRX2B derivado de precursor de neurexina-2-beta. A) de la figura 2 muestra una comparación entre ADN, DCL y EA. A) y B) muestran el resultado de experimentos llevados a cabo separadamente; se utilizó ADN y EA en las mismas muestras en ambos experimentos (es decir, para ADN y EA, los resultados de medición indicarían reproducibilidad). En A) de la figura 2 se encontró que el marcador A se encontraba incrementado en los pacientes de DCL y de EA en comparación con los pacientes ADN. En B) de la figura 2 se encontró que el marcador A se encontraba incrementado en los pacientes de EA, ENtodas, ENdem y ENnon en comparación con los pacientes ADN. En particular, en la comparación entre EA y ENnon, en EA era significativamente más alto que en ENnon (prueba t, $p=0,035$). A partir de dichos resultados se encontró que el marcador A resultaba útil para distinguir entre pacientes con deterioro cognitivo (DCL, EA, ENdem) y pacientes con enfermedad neurológica no demencia (ENnon).

A partir de los resultados de A) y B) en la figura 2, con el fin de evaluar el grado en el que el marcador A resulta útil como biomarcador, se llevó a cabo el análisis mediante la curva de característica operativa del receptor (COR). C), D) y E) en la figura 2 muestran, respectivamente, la curva COR de las comparaciones DCL vs. ADN, EA vs. ADN y EA vs. ENnon. En el caso de que el valor del área (en lo sucesivo denominado valor de COR) bajo la curva COR sea próximo a 1, la utilidad como biomarcador del marcador A será más elevada. En C), D) y E) de la figura 2, los valores típicos de sensibilidad y especificidad son los valores del punto (cuadrados blancos en la figura) de la coordenada en la curva COR en los que se minimiza la distancia al dibujar una línea recta hasta la curva COR desde el punto de 100% en el eje y. El valor de corte que proporciona dicho punto se convierte en un umbral útil para distinguir entre los diferentes grupos, y los valores de sensibilidad y especificidad en dicho tiempo (es decir, superior a los valores típicos) se convierte en un indicador de la utilidad de los biomarcadores conjuntamente con los valores de COR. En C) de la figura 2, como valores típicos en DCL vs. ADN, la sensibilidad era de 90%, la especificidad era de 100% y el valor de COR era de 0,99. En D) de la figura 2, como valores típicos en EA vs. ADN, la sensibilidad era de 100%, la especificidad era de 100% y el valor de COR era 1. En E) de la figura 2, con la comparación EA vs. CCC, la sensibilidad era de 100%, la especificidad era de 50% y el valor de COR era de 0,710. De esta manera, se reveló que el marcador A (NRX2B) resultaba útil para distinguir DCL y EA respecto a ADN. Y además, se reveló que el marcador A resultaba útil para distinguir la EA de enfermedad neurológica no demencia (ENnon). En particular, debido a que DCL es el estado del estadio previo de la EA, se considera que el marcador A (NRX2B) resulta un marcador extremadamente útil para detectar DCL para el diagnóstico precoz de los sujetos que potencialmente migrarán a EA.

La figura 3, para el marcador A, ilustra los resultados del espectro de EM/EM utilizando TOF/TOF ultraflex. Las señales que muestran los iones y los iones b aparecieron en grado suficiente y la secuencia de aminoácido pudo identificarse fácilmente. Se llevó a cabo una búsqueda en Mascot con dicho resultado y la proteína de origen o el péptido (en lo sucesivo denominado proteínas o péptidos intactos) era el precursor de neurexina-2-beta y se encontró que el péptido detectado presentaba la secuencia RSGGNATLQVDSWP (SEC ID nº 2). NRX2B es el nombre de la entrada en Swiss-Prot del precursor de neurexina-2-beta como abreviatura del nombre del péptido. Además, para los otros péptidos que se detectaron, los nombres de entrada de Swiss-Prot utilizados como abreviaturas de los nombres de péptido en la descripción a continuación.

Incluyendo el marcador A, los péptidos que presentaban diferencias de abundancia entre grupos en el suero se

midieron en los espectros de EM/EM utilizando TOF/TOF ultraflex y además de determinar la secuencia de aminoácidos, los resultados identificaron proteínas o péptidos intactos mostrados posteriormente. Para péptidos diferentes del marcador A, las señales que mostraban iones y e iones b aparecieron en grado suficiente y la secuencia de aminoácido pudo identificarse fácilmente. La secuencia de aminoácidos siguiente que muestra un grupo de dos secuencias, la secuencia entera de la primera secuencia muestra la secuencia de aminoácidos de proteínas o péptidos intactos. El péptido que comprende la parte subrayada de la primera secuencia y de la segunda secuencia es el péptido detectado mediante la 2D-CL-MALDI TOF- EM. 001 representa el extremo N-terminal. Respecto al péptido que se secuenció con el estado de oxidación de la metionina en los péptidos que consistían de la segunda secuencia se indicó como (oxidación + (M)) al final de la secuencia de aminoácidos. Para la proteína con mutación de aminoácidos mediante mutación génica, se señala el residuo aminoácido aplicable como (X).

(1) Péptido NRX2B derivado del precursor de la neurexina-2-beta

NRX2B mostrado como SEC ID nº 2 no se detectó en el paciente ADN y sí se detectó en los pacientes de DCL, EA, ENtodas, ENdem y ENnon. Además, en la comparación entre EA y ENnon, la EA mostraba un valor más alto que ENnon, y se demostró que NRX2B mostraba capacidad de distinción (previamente descrita en la figura 2).

Proteína / péptido intacto

001 MPPGGSGPĠĠ CRRPPALAG PLPPPPPPPP PPLLPLLPLL LLLLLGAAEG
 051 ARVSSSLSTT HHVHHFHSKH GTVPIAINRM PFLTRGGHAG TTYIFGKGGGA
 101 LITYTWPND RPSTRMDRLA VGFSTHQRSA VLVRVDSASG LGDYLQLHID
 151 QGTGVVIFNV GTDDITIDEP NAIVSDGKYH VVRFRSSGN ATLQVDSWPV
 201 NERYPAGNFD NERLAIARQR IPYRLGRVVD EWLLDKGRQL TIFNSQAAIK
 251 IGGRDQGRPF QGQVSGLYYN GLKVLALAAE SDPNVRTEGH LRLVGEGPSV
 301 LVASAECPSD DEDLEECEPS TGGEILPII TEDSLDPPPV ATRSPFVPPP
 351 PTFYPFLTG V GATQDTLPPP AARRPPSGGP CQAERDDSDC EEPIEASGFA
 401 SGEVFDSSLP PTDDDFYTT FPLVTDRTTL LSPRKPAPRP NLRTDGATGA
 451 PGLVLFAPSAP APNLPAGKMN HRDPLQPLLE NPPLGPGAPT SFEPRRPPPL
 501 RPGVTSAPGF PHLPTANPTG PGERGPPGAV EVIRESSSTT GMVVGIVAAA
 551 ALCILILLYA MYKYRNRDEG SYQVDQSRNY ISNSAQSNGA VVKEKAPAAP
 601 KTPSKAKKNK DKEYYV (SEC ID nº 1)

Péptido NRX2B derivado del precursor de la neurexina-2-beta

RSNGNATLQVDSWP (SEC ID nº 2)

(2) Péptido THRB(R-) derivado del precursor de protrombina

Los péptidos derivados de precursor de protrombina son de dos tipos y (R-) se refiere al péptido que no presenta R (residuo de arginina) en el extremo C-terminal. Se detectó THRB(R-), mostrado como SEC ID nº 4, específicamente en el paciente ADN y sí se detectó un valor extremadamente bajo en los pacientes de DCL, EA, ENtodas, ENdem y ENnon. Los diagramas de THRB(R-) y THRB(R+) se muestran lado a lado en las figuras 4 y 5. La figura 4 muestra un gráfico de dispersión. La figura 5A muestra que la aparición de THRB(R-) y THRB(R+) es diferente en cada individuo de ADN, DCL y EA. En el mismo individuo, THRB(R-) apareció en grado muy elevado en ADN; THRB(R+) apareció en grado muy elevado en DCL y EA. Puede afirmarse que ambos péptidos son marcadores extremadamente útiles para determinar DCL y ADN. La figura 5B muestra la curva COR que compara la EA y las ENnon con THRB(R-). El valor de COR indicaba un valor elevado, de 0,815. El valor en la EA era más bajo que en las ENnon. En otras palabras, se encontró que THRB(R-), así como NRX2B, como marcador útil para distinguir entre pacientes con deterioro cognitivo (DCL, EA y ENdem) y pacientes con enfermedad neurológica no demencia (ENnon).

Proteína / péptido intacto

001 MAHVRGLQLP GCLALAALCS LVHSQHVFLA PQQARSLQR VRRANTFLEE
 051 VRKGNLEREC VEETCSYEEA FEALSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL
 101 AACLEGNAE GLGTNYRGHV NITRSGIECQ LWRSRYPHKP EINSTTHPGA
 151 DLQENFCRNP DSSTTGPWCY TTDPTVRRQE CSIPVCGQDQ VTVAMTPRSE
 201 GSSVNLSPPL EQCVPDRGQQ YQGLAVTTH GLPCLAWASA QAKALSKHQD
 251 FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GVWCYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEETG
 301 DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKKSLEDK
 351 TERELLESYI DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW
 401 VLTAACHCLLY PPWDKNFTEN DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH
 451 PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSYIHP VCLPDRETAA SLLQAGYKGR
 501 VTGWGNLKET WTANVGKGP SVLQVVNLPI VERPVCKDST RIRITDNMFC
 551 AGYKPDEGKR GDACEGDSGG PFVMKSPFNN RWYQMGIVSW GEGCDRDGKY
 601 GFYTHVFRLLK KWIQKVIDQF GE (SEC ID nº 3)

Péptido THRB(R-) derivado del precursor de protrombina

5 GLDESDRAIEG (SEC ID nº 4)

(3) Péptido derivado de precursor de protrombina (THRB(R+))

10 THRB(R-), mostrado como SEC ID nº 5, no se detectó en el paciente ADN y sí se detectó en los pacientes de DCL, EA, ENTodas, ENdem y ENnon (figura 4). (R+) se refiere a que el péptido presenta R (residuo de arginina) en el extremo C-terminal. Para una explicación, ver (2) péptido derivado del precursor de protrombina (THRB(R-)).

Proteína / péptido intacto

001 MAHVRGLQLP GCLALAALCS LVHSQHVFLA PQQARSLQR VRRANTFLEE
 051 VRKGNLEREC VEETCSYEEA FEALSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL
 101 AACLEGNAE GLGTNYRGHV NITRSGIECQ LWRSRYPHKP EINSTTHPGA
 151 DLQENFCRNP DSSTTGPWCY TTDPTVRRQE CSIPVCGQDQ VTVAMTPRSE
 201 GSSVNLSPPL EQCVPDRGQQ YQGLAVTTH GLPCLAWASA QAKALSKHQD
 251 FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GVWCYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEETG
 301 DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKKSLEDK
 351 TERELLESYI DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW
 401 VLTAACHCLLY PPWDKNFTEN DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH
 451 PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSYIHP VCLPDRETAA SLLQAGYKGR
 501 VTGWGNLKET WTANVGKGP SVLQVVNLPI VERPVCKDST RIRITDNMFC
 551 AGYKPDEGKR GDACEGDSGG PFVMKSPFNN RWYQMGIVSW GEGCDRDGKY
 15 601 GFYTHVFRLLK KWIQKVIDQF GE (SEC ID nº 3)

Péptido THRB(R+) derivado del precursor de protrombina

20 GLDESDRAIEGR (SEC ID nº 5)

(4) Péptido derivado de pendrina (S26A4)

25 S26A4, mostrado como SEC ID nº 7, no se detectó en el paciente ADN y sí se detectó en los pacientes de DCL, EA, ENTodas, ENdem y ENnon (figura 6).

Proteína / péptido intacto

001 MAAPGGRSEP PQLPEYSCSY MVS RPVYSEL AFQQQHERRL QERKTLRES
 051 AKCCSCSRKR AFGVLKTLVP ILEWLPKYRV KEWLLSDVIS GVSTGLVATL
 101 QGMAYALLAA VPVGYGLYSA FFPILTYFIF GTSRHISVGP FVVVSLMVG
 151 VVLSMAPDEH FLVSSSNGTV LNTTMIDTAA RDTARVLAS ALTLLVGIIQ
 201 LIFGGLQIGF IRYLADPLV GGFTTAAAFQ VLVSQKIVL NVSTKNYNGV
 251 LSIYTLVEI FQNIQDTNLA DFTAGLLTIV VCMVAVKELND RFRHKIPVPI
 301 PIEVIVTIIA TAISYGANLE KNYNAGIVKS IPRGFLPPEL PPVSLFSEML
 351 AASFSIAVVA YAIASVGVK VYATKYDYTID GNQEFIAFGI SNIFSGFFSC
 401 FVATTALSRT AVQESTGGKT QVAGHISAAI VMIALALGK LLEPLQKSVL
 451 AAVVIANLKG MFMQLCDIPR LWRQNKIDAV IWWFTCIVSI ILGLDLGLLA
 501 GLIFGLLTVV LRVQFPSWNG LGSIPSTDIY KSTKNYKNIE EPQGVKILR
 551 SSPIFYGNVD GFKKCIKSTV GFAIRVYK RKLALRKIQK LIKSGQLRAT
 601 KNGHSDAVS TNNAFEPDED IEDLEELDIP TKEIEIQVDW NSELVVKVNV
 651 PKVPIHSLVL DCGAISFLDV VGVRSRIV KEFQRIDVNV YFASLQDYV
 701 EKLEQCGFFD DNIRKDTFFL TVHDAILYLQ NQVKSQEGQG SILETTLIQ
 751 DCKDTLELIE TELTEEELDV QDEAMRTLAS (SEC ID nº 6)

Péptido S26A4 derivado de pendrina

5 LAGLIFGLLTVVLR (SEC ID nº 7)

(5) Péptido derivado de subunidad zeta-1 de coatómero (COPZ1)

10 COPZ1, mostrado como SEC ID nº 9, mostró un valor bajo en el paciente ADN y un valor elevado en los pacientes de DCL, EA y ENdem (figura 6).

Proteína / péptido intacto

001 MEALILEPSL YTVKAILLD NDGDRLFAKY YDDTYPSVKE QKAFKKNIFN
 051 KTHRTDSEIA LLEGLTVVYK SSIDLYFYVI GSSYENELML MAVLNCLFDS
 101 LSQMLRKNVE KRALLENMEG LFLAVDEIVD GGVILESDPQ QVVHRVALRG
 151 EDVPLTEQTV SQVLQSAKEQ IKWLLR (SEC ID nº 8)

15

Péptido derivado de subunidad zeta-1 de coatómero (COPZ1)

AILILDNDGDRLFAKYDD (SEC ID nº 9)

20 (6) Péptido derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico (RARR2(S-))

RARR2(S-), mostrado como SEC ID nº 11, no se detectó en el paciente ADN y sí se detectó en los pacientes de EA y DCL (figura 7). Los péptidos derivados de precursor de proteína respondedora 2 de receptor del ácido retinoico y (S-) se refiere al péptido que no presenta S (residuo de serina) en el extremo C-terminal.

25

Proteína / péptido intacto

001 MRRLLIPLAL WLGA VGVGVA ELTEAQRRLGL QVALEEFHKH PPVQWAFQET
 051 SVESAVDTPF PAGIFVRLEF KLQQTSCRKR DWKKPECKVR PNGRKRKCLA
 101 CIKLGSEDKV LGRVHCPIE TQVLREAEEH QETQCLRVQR AGEDPHSFYF
 151 PGQFAFSKAL PRS (SEC ID nº 10)

30 Péptido derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico (RARR2(S-))

PHSFYFPGQFAFSKALPR (SEC ID nº 11)

35 (7) Péptido derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico (RARR2(S+))

RARR2(S+), mostrado como SEC ID nº 12, no se detectó en el paciente ADN así como tampoco RARR2(S-), y sí se detectó en los pacientes de EA y DCL (figura 7). (S+) se refiere a que el péptido presenta S (residuo de serina) en el extremo C-terminal.

40 Proteína / péptido intacto

Péptido derivado del precursor de proteína respondedora 2 del receptor del ácido retinoico (RARR2(S+))
PHSFYFPGQFAFSKALPRS (SEC ID nº 12)

5

(8) Péptido derivado de precursor de gelsolina (GELS)

GELS, mostrado como SEC ID nº 14, mostró un valor bajo en el paciente ADN y un valor relativamente elevado en los pacientes de DCL y EA (figura 8).

10

Proteína / péptido intacto

001 MAPHRPAPAL LCALSLALCA LSLPVRAATA SRGASQAGAP QGRVPEARPN
051 SMVVEHPEFL KAGKEPGLQI WRVEKFDLVP VPTNLYGDFD TGDAYVILKT
101 VQLRNGNLQY DLHYWLGNEC SQDESGAAAI FTVQLDDYLN GRAVQHREVO
151 GFESATFLGY FKSGLYKKG GVASGFKHVV PNEVVVQRLF QVKGRRVRA
201 TEVPVSWESF NNGDCFILDL GNNIHQWCGS NSNRYERLKA TQVSKGIRDN
251 ERSGRARVHV SEEGTEPEAM LQVLGPKPAL PAGTEDTAKE DAANRKLAKL
301 YKVSNGAGTM SVSLVADENP FAQGALKSED CFILDHGKDG KIFVWKGKQA
351 NTEERKAALK TASDFITKMD YPKQTQVSVL PEGGETPLFK QFFKNWRDPD
401 QTDGLGLSYL SSHIANVERV PFDAATLHTS TAMAAQHGMDD DGDTGQKQIW
451 RIEGSNKVPV DPATYGQFYG GDSYIILYNY RHGGRQGQII YNWQGAQSTQ
501 DEVAASAILT AQLDEELGGT PVQSRVVQK EPAHLMSLFG GKPMIYKGG
551 TSREGGQTAP ASTRLFQVRA NSAGATRAVE VLPKAGALNS NDAFVLKTPS
601 AAYLWVGTGA SEAECTGAQE LLRVLRAQPV QVAEGSEPDG FWEALGGKAA
651 YRTSPRLKDK KMDAHPPLRF ACSNKIGRFV IEEVPGELMQ EDLATDDVML
701 LDTWDQVFWV VGKDSQEEEEK TEALTSKRY IETDPANRDR RTPITVVKQG
751 FEPPSFVGF LGWDDDDYWSV DPLDRAMAEL AA (SEC ID nº 13)

15 Péptido derivado de precursor de gelsolina (GELS)

PVRAATASRGAS (SEC ID nº 14)

20

(9) Péptido derivado del precursor de clusterina (CLUS(SDVP N-term.))

CLUS(SDVP N-term.), mostrado como SEC ID nº 16, mostró un valor bajo en el paciente ADN y un valor relativamente elevado en los pacientes de DCL y EA (figura 9). Los péptidos derivados de precursor de clusterina son de dos tipos y (N-termSDVP) se refiere a que la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del péptido es SDVP.

25

Proteína / péptido intacto

001 MMKTLLLFVG LLLTWESGQV LGDQTVSDNE LQEMSNQGS YVNKEIQNAV
051 NGVKQIKTLI EKTNEERKTL LSNLEEAKKK KEDALNETRE SETKCLKELPG
101 VCNETMMALW EECKPCLKQT CMKFYARVCR SGSGLVGRQL EEFLNQSSPF
151 YFWMNGDRID SLENDRQQT HMLDVMQDHF SRASSIDEL FQDRFFFTREP
201 QDTYHYLPFS LPHRRPHFFF PKSRIVRSLM PFSPYEPLNF HAMFQPFLEM
251 IHEAQQAMDI HFHSPAFQHP PTEFIREGDD DRTVCREIRH NSTGCLRMKD
301 QCDKCREILS VDCSTNPSQ AKLRRELDL LQVAERLTRK YNELLSYQW
351 KMLNTSSLE QLNEQFNWVS RLANLTQGED QYLRVTTVA SHTSDSDVPS
401 GVTEVVVKLF DSDPITVTV VEVSRKNPKF METVAEKALQ EYRKKHREE (SEC ID nº 15)

30 Péptido derivado del precursor de clusterina CLUS(SDVP N-term.)

SDVPSGVTEVVVKLFDS (SEC ID nº 16)

35

(10) Péptido derivado del precursor de clusterina (CLUS(RFFT N-term.))

CLUS(RFFT N-term.), mostrado como SEC ID nº 17, no se detectó en el paciente ADN y no se detectó completamente en los pacientes de EA (figura 9). (RFFT N-term.) se refiere a que la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del péptido es RFFT.

Proteína / péptido intacto

001 MMKTLLLFVG LLTWESGQV LGDQTVSDNE LQEMSNQGSK YVNKEIQNAV
 051 NGVKQIKTLI EKTNEERKTL LSNLEEAKKK KEDALNETRE SETKLKELPG
 101 VCNETMMALW EECKPCLKQT CMKFYARVCR SGSGLVGRQL EEFLNQSSPF
 151 YFWMNGDRID SLEENDRQQT HMLDVMQDHF SRASSIDEL FQDRFFFTREP
 201 QDTYHYLPFS LPHRRPHFFF PKSRIVRSLM PFSPYEPLNF HAMFQPFLEM
 251 IHEAQQAMDI HFHSPAFAQHP PTEFIREGDD DRTVCREIRH NSTGCCLRMKD
 301 QCDKCREILS VDCSTNNPSQ AKLRRELDLQVAERLTRK YNELLKSYQW
 351 KMLNTSSLLE QLNEQFNWVS RLANLTQGED QYYLRVTTVA SHTSDSDVPS
 401 GVTEVVVKLF DSDPITVTVP VEVSRKNPKF METVAEKALQ EYRKKHREE (SEC ID
 nº 15)

5 Péptido derivado del precursor de clusterina CLUS(RFFT N-term.)

RFFTREPQDTYHYLPFSLPH (SEC ID nº 17)

(11) Péptido derivado de la subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica (EIF3J)

10 EIF3J, mostrado como SEC ID nº 19, no se detectó en el paciente ADN y no se detectó en absoluto o prácticamente no se detectó en los pacientes de DCL, EA, ENtodas, ENdem y ENnon (figura 10).

Proteína / péptido intacto

15 001 MĀAAAAAAGD̄ SDSWDADAFS VEDPVRKVG GGTAGGDRWE GEDEDEDVKD
 051 NWDDDDDEKK EEAEVKPEVK ISEKKKIAEK IKEKERQKK RQEIKKRLE
 101 EPEEPKVLTP EEQLADKLRL KKLQESDLE LAKETFGVNN AVYGIDAMNP
 151 SSRDDFTEFG KLLKDKITQY EKSLYYASFL EVLVRDVCIS LEIDDLKKIT
 201 NSLTVLCSEK QKQEKQSKAK KKKKGVVPPG GLKATMKDDL ADYGGYDGGY
 251 VQDYEDFM (SEC ID nº 18)

Péptido derivado de la subunidad J del factor 3 de inicio de traducción eucariótica (EIF3J)

20 GWPGGGLKATMKDDLADYGGYDGG + oxidación (M) (SEC ID nº 19)

(12) Péptido derivado de la proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas (LRC27)

25 LRC27, mostrado como SEC ID nº 21, no se detectó en el paciente ADN y no se detectó completamente en los pacientes de EA (figura 10).

Proteína / péptido intacto

001 MEGSSSYEVP SVAAADLEEG AGQTRSLPAT PSKDVHKGVG GIIFSSSPIL
 051 DLSEGLCRL EEVFRIPSLQ QLHLQRNALC VIPQDFFQL PNLTWLRLY
 101 NRIKALPSGI GAHQHLKTL LERNPIKMLP VELGSVTTLK ALNLRHCPLE
 151 FPPQLVVQKG LVAIQRFLRM WAVEHSLPRN PTSQEAPPVR EMTLRDLPS
 201 GLELSGDHAS NQGAVNAQDP EGAVMKEKAS FLPPVEKPD SELRKSADSS
 251 ENWPSEEEIR RFWKLRQEIV EHVKADVLGD QLLTRELPPN LKAALNIEKE
 301 LPKPRHVFR KTASSRSILP DLLSPYQMAI RAKRLEESRA AALRELQEKQ
 351 ALMEQQRREK RALQEWREERA QRMKRKEEL SKLLPPRRSM VASKIPSATD
 401 LIDNRKVPLN PPGKMKPSKE KSPQASKEMS ALQERNLEEK IKQHVLMQRE
 451 QRRFHGQAPL EEMRKAEDL EIATELQDEV LKLKLGTLN KDRRRAALTG
 501 NLSLGLPAAQ PQNTFFNTKY GESGNVRRYQ (SEC ID nº 20)

Péptido derivado de la proteína 27 que contiene repeticiones ricas en leucinas (LRC27)

35 SSPILDSEGLCRLEEVFRIPS (SEC ID nº 21)

Aunque ya se han citado, para los péptidos de SEC ID nº 2 (NRX2B) a SEC ID nº 21 (LRC27), los gráficos de dispersión de las comparaciones entre los pacientes de ADN, DCL y EA, y el gráfico de dispersión de la comparación entre los pacientes de ADN, EA, ENtodas, ENdem y ENnon, y el valor de p de la prueba t de cada comparación se muestran en las figuras 2, 4 y 6 a 10.

La Tabla 1 muestra la lista de valores de COR de las comparaciones DCL vs. ADN y EA vs. ADN respecto a los 12 péptidos marcadores mostrados anteriormente.

5

[Tabla 1]

Péptidos marcadores		DCL vs. ADN		EA vs. ADN	
Entrada de Swiss-Prot	Secuencia nº	Valor de COR	DCL era	Valor de COR	En la EA:
NRX2B	2	0,99	incremento	1	incremento
THRB (R-)	4	0,854	reducción	0,841	reducción
THRB (R+)	5	0,94	incremento	0,985	incremento
S26A4	7	0,925	incremento	0,95	incremento
COPZ1	9	0,786	incremento	0,767	incremento
RARR2 (S-)	11	0,885	incremento	0,914	incremento
RARR2 (S+)	12	0,95	incremento	0,919	incremento
GELS	14	0,716	incremento	0,762	incremento
CLUS (SDVP N-term.)	16	0,739	incremento	0,717	incremento
CLUS (RFFT N-term.)	17	0,675	reducción	0,75	reducción
EIF3J	19	0,748	reducción	0,775	reducción
LRC27	21	0,699	reducción	0,755	reducción

La Tabla 1 muestra la utilidad de cada péptido marcador en la detección del deterioro cognitivo (DCL y EA). Mediante la utilización de dichos péptidos marcados, individualmente o en combinación, utilizando o no cromatografía líquida y/o cualesquiera otros métodos de separación adecuados, midiendo directamente la abundancia en suero utilizando otros métodos, tales como la espectrometría de masas o métodos inmunológicos o métodos enzimáticos, resulta posible distinguir entre tipos de no demencia y demencia del deterioro cognitivo y enfermedades neurológicas tales como la EA y la DCL respecto al diagnóstico. El péptido marcador que no se detecta en el paciente de ADN y que se detecta en los pacientes de DCL, EA, ENtodas, ENdem y ENnon, o viceversa, el péptido marcador que se detecta en el paciente de ADN y que no se detecta en los pacientes de DCL, EA, ENtodas, ENdem y ENnon, también resulta útil para la detección de enfermedades psiquiátricas.

Ejemplo 2

Ejemplo 2. Síntesis de un péptido marcador y preparación de un anticuerpo policlonal específico de péptido marcador

Se sintetizó el péptido antigénico con el fin de preparar el anticuerpo específico que reconoce el péptido NRX2B derivado del precursor de la neurexina-2-beta de SEC ID nº 2. Al péptido sintético para el acoplamiento a una proteína portadora se añadió el residuo de cisteína (denominado C o Cys) en el extremo C-terminal. El péptido que se combinó con la proteína portadora (RSGGNATC-KLH, ver posteriormente) se mezcló con un adyuvante y la mezcla se utilizó para inmunizar conejos. Se llevó a cabo un total de ocho inmunizaciones cada 1-2 semanas y se realizó la extracción de sangre de ensayo dos veces cada 4 semanas y se midieron los títulos de anticuerpo mediante inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés). Tras tres meses desde el inicio de la inmunización, se recolectó la sangre completa de los conejos y se obtuvo el antisuero; además, se llevó a cabo la purificación del anticuerpo específico utilizando la columna peptídica en la que se encontraba unido el péptido antigénico a modo de ligando.

La secuencia del péptido antigénico sintético para la preparación del anticuerpo específico de péptido se muestra a continuación.

RSGGNAT+Cys (SEC ID nº 22)

Ejemplo 3

Ejemplo 3. Preparación de perlas de anticuerpo

(1) Método

(1-1) Preparación de anticuerpo y unión a perlas magnéticas

La solución de anticuerpo: se disolvió 1 mg del anticuerpo (anticuerpo anti-NRX2B, IgG de conejo) que reconocía específicamente el péptido de secuencia de aminoácidos expresado por SEC ID nº 22 con 3 ml de MES 0,1 M. Tras el lavado de 1 ml (10 mg de perlas) de las perlas magnéticas (Magnosphere MS300/carboxilo, JSR Corporation) mediante la utilización de MES 0,1 M, se mezclaron las perlas magnéticas con la solución de anticuerpo y se

50

agitaron suavemente durante 30 min. a temperatura ambiente.

(1-2) Entrecruzamiento de anticuerpo y perlas magnéticas

5 Se añadieron 400 µl de solución de EDC (10 mg/ml de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida en MES 0,1 M) a solución de anticuerpo-perlas y se suspendieron suavemente durante 3 horas para la unión del anticuerpo a las perlas mediante enlace covalente.

10 (1-3) Bloqueo

Se añadió 1 ml de etanolamina 200 mM (pH 8,0) para lavar las perlas y se añadió 1 ml adicional de etanolamina 200 mM (pH 8,0) y se agitó suavemente durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear los grupos amina.

15 (1-4) Lavado

Tras la eliminación de etanolamina 200 mM (pH 8,0) se lavaron las perlas tres veces con 1 ml de solución TBST (Tris-HCl 25 mM (pH 7,2) que contenía NaCl 0,15 M y Tween-20 al 0,05%).

20 (1-5) Almacenamiento

Tras suspender las perlas mediante la adición de 1 ml de solución de TBST, se almacenaron a 4°C.

Ejemplo 4

25 Ejemplo 4. Prueba mediante el método de inmuno-EM de que el pico de m/z 1,488 en suero de paciente detectado mediante 2D-CL-MALDI-TOF-EM es NRX2B.

(1) Métodos

30 A título de control para la comparación, se utilizó el péptido sintético NRX2B marcado con isótopo estable (se sustituyó 12C y 13C de V por 15N y 14N) de masa superior a NRX2B. La diferencia de masa entre NRX2B y el péptido con isótopo estable era de 6 u. Tanto el péptido endógeno como el péptido marcado con isótopo estable se capturaron con anticuerpo anti-NRX2B. Se añadió 1 µl de 200 fmoles/µl de péptido sintético NRX2B marcado con isótopo estable a 25 µl de cada uno de los sueros de paciente de EA y de DCL, y se incubaron durante 10 min. a 4°C. A continuación, se añadieron 475 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y se sometieron a ebullición durante 35 5 min. a 100°C. Tras la centrifugación durante 15 min. a 14.000xg, se añadieron 500 µl de tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 0,3 M y n-octil-glucósido al 0,2% al sobrenadante. Se añadieron 20 µl de perlas-anticuerpo anti-NRX2B en el Ejemplo 3 a soluciones de péptido y se agitaban suavemente durante 2 horas. A continuación, tras dejar en reposo durante 1 min. sobre el soporte magnético, se eliminó el sobrenadante. Se añadió 40 1 ml de tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) (TBS) que contenía NaCl 0,15 M y n-octil-glucósido al 0,1% y se agitó suavemente durante 10 min. Tras dejar en reposo durante 1 min. sobre el soporte magnético, se eliminó el sobrenadante. Además, tras añadir 500 µl de TBS y dejar en reposo durante 1 min. sobre el soporte magnético, se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces. Además, tras añadir 500 µl de carbonato amónico 45 50 mM y dejar en reposo durante 1 min. sobre el soporte magnético, se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces. Se añadieron 50 µl de 2-propanol: H₂O: ácido fórmico (4:4:1) y se dejó en reposo durante 10 min. y seguidamente, tras dejar en reposo durante 1 min. sobre el soporte magnético, se recuperó el filtrado. Se repitió este procedimiento dos veces. Los filtrados se secaron completamente utilizando una centrifuga de vacío. A continuación, se añadieron 20 µl de TFA al 0,095% que contenía acetonitrilo al 5% y se redisolviaron mediante sonicación. Se concentraron los péptidos utilizando una punta de pipeta de C18 (punta PerfectPure C-18, Eppendorf) y se aplicaron en puntos sobre la placa diana MALDI (placa MTP AnchorChip™ 600/384, Bruker Daltonics) mediante elución a partir de la punta de pipeta C18 y después se analizaron los péptidos utilizando un espectrómetro de masas MALDI TOF (AXIMA CFRplus, Shimadzu).

55 (2) Resultados

La figura 11 muestra el resultado de la espectrometría de masas del péptido NRX2B detectado en el suero de pacientes de EA y de DCL utilizando el método anteriormente indicado. La figura 11A muestra el espectro de masas global y la figura 11B muestra una vista ampliada de las partes con flechas en la figura 11A. La señal indicada por las flechas discontinuas en la figura 11B es el péptido sintético NRX2B marcado con isótopo estable añadido y la 60 señal indicada por las flechas continuas era péptido NRX2B endógeno. El valor de masa observado se encontraba dentro del error de medición del valor esperado. Y además la diferencia de masas entre el péptido NRX2B endógeno y el péptido marcado con isótopo estable era de 6 u. Por lo tanto, se pudo demostrar que el péptido atrapado era NRX2B.

65 En el presente experimento, NRX2B, que era el marcador peptídico detectado en el suero mediante la utilización del método de inmuno-EM desarrollado originalmente por los presentes inventores, se pudo demostrar que resulta

5 posible distinguir entre pacientes de EA y de DCL respecto de los de ADN. Además, en el presente experimento, también se ha demostrado que el anticuerpo específico contra NRX2B resulta útil en la detección de su marcador peptídico. Adicionalmente, también demuestra que el método de detección inmunológico podría resultar eficaz contra el péptido o proteína comprendido en la secuencia de aminoácidos de NRX2B utilizando el anticuerpo específico contra NRX2B. Además, en el presente experimento se realizó la determinación mediante la utilización de anticuerpos específicos que reconocían un marcador peptídico, pero la combinación de anticuerpos específicos de biomarcador que reconocen otros péptidos que se encontraron en el Ejemplo 1, se espera que incremente adicionalmente la precisión del diagnóstico de las patologías.

10 Aplicabilidad industrial

El deterioro cognitivo, incluyendo el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo y las enfermedades no psiquiátricas, pueden detectarse mediante la utilización de los biomarcadores dados a conocer en la presente invención. La invención es aplicable a la utilización en el campo del diagnóstico médico, incluyendo el de los agentes diagnósticos.

15 Listado de secuencias

09P01007_Sequence.txt

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MCBI Inc.

25 <120> Nuevos biomarcadores para la detección de la enfermedad de Alzheimer

<130> 09P01007

30 <160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

35 <211> 616

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

40

ES 2 617 918 T3

Met Pro Pro Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Cys Pro Arg Arg Pro Pro
1 5 10 15

Ala Leu Ala Gly Pro Leu Pro
20 25 30

Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ala
35 40 45

Glu Gly Ala Arg Val Ser Ser Ser Leu Ser Thr Thr His His Val His
50 55 60

His Phe His Ser Lys His Gly Thr Val Pro Ile Ala Ile Asn Arg Met
65 70 75 80

Pro Phe Leu Thr Arg Gly Gly His Ala Gly Thr Thr Tyr Ile Phe Gly
85 90 95

Lys Gly Gly Ala Leu Ile Thr Tyr Thr Trp Pro Pro Asn Asp Arg Pro
100 105 110

Ser Thr Arg Met Asp Arg Leu Ala Val Gly Phe Ser Thr His Gln Arg
115 120 125

Ser Ala Val Leu Val Arg Val Asp Ser Ala Ser Gly Leu Gly Asp Tyr
130 135 140

Leu Gln Leu His Ile Asp Gln Gly Thr Val Gly Val Ile Phe Asn Val
145 150 155 160

Gly Thr Asp Asp Ile Thr Ile Asp Glu Pro Asn Ala Ile Val Ser Asp
165 170 175

Gly Lys Tyr His Val Val Arg Phe Thr Arg Ser Gly Gly Asn Ala Thr
180 185 190

ES 2 617 918 T3

Leu Gln Val Asp Ser Trp Pro Val Asn Glu Arg Tyr Pro Ala Gly Asn
 195 200 205

Phe Asp Asn Glu Arg Leu Ala Ile Ala Arg Gln Arg Ile Pro Tyr Arg
 210 215 220

Leu Gly Arg Val Val Asp Glu Trp Leu Leu Asp Lys Gly Arg Gln Leu
 225 230 235 240

Thr Ile Phe Asn Ser Gln Ala Ala Ile Lys Ile Gly Gly Arg Asp Gln
 245 250 255

Gly Arg Pro Phe Gln Gly Gln Val Ser Gly Leu Tyr Tyr Asn Gly Leu
 260 265 270

Lys Val Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Asp Pro Asn Val Arg Thr Glu
 275 280 285

Gly His Leu Arg Leu Val Gly Glu Gly Pro Ser Val Leu Val Ala Ser
 290 295 300

Ala Glu Cys Pro Ser Asp Asp Glu Asp Leu Glu Glu Cys Glu Pro Ser
 305 310 315 320

Thr Gly Gly Glu Leu Ile Leu Pro Ile Ile Thr Glu Asp Ser Leu Asp
 325 330 335

Pro Pro Pro Val Ala Thr Arg Ser Pro Phe Val Pro Pro Pro Pro Thr
 340 345 350

Phe Tyr Pro Phe Leu Thr Gly Val Gly Ala Thr Gln Asp Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Pro Ala Ala Arg Arg Pro Pro Ser Gly Gly Pro Cys Gln Ala Glu
 370 375 380

Arg Asp Asp Ser Asp Cys Glu Glu Pro Ile Glu Ala Ser Gly Phe Ala
 385 390 395 400

Ser Gly Glu Val Phe Asp Ser Ser Leu Pro Pro Thr Asp Asp Glu Asp
 405 410 415

Phe Tyr Thr Thr Phe Pro Leu Val Thr Asp Arg Thr Thr Leu Leu Ser
 420 425 430

Pro Arg Lys Pro Ala Pro Arg Pro Asn Leu Arg Thr Asp Gly Ala Thr
 435 440 445

ES 2 617 918 T3

Gly Ala Pro Gly Val Leu Phe Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Asn Leu
 450 455 460

Pro Ala Gly Lys Met Asn His Arg Asp Pro Leu Gln Pro Leu Leu Glu
 465 470 475 480

Asn Pro Pro Leu Gly Pro Gly Ala Pro Thr Ser Phe Glu Pro Arg Arg
 485 490 495

Pro Pro Pro Leu Arg Pro Gly Val Thr Ser Ala Pro Gly Phe Pro His
 500 505 510

Leu Pro Thr Ala Asn Pro Thr Gly Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly
 515 520 525

Ala Val Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly Met Val Val
 530 535 540

Gly Ile Val Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu Leu Tyr Ala
 545 550 555 560

Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr Gln Val Asp Gln
 565 570 575

Ser Arg Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser Asn Gly Ala Val Val
 580 585 590

Lys Glu Lys Ala Pro Ala Ala Pro Lys Thr Pro Ser Lys Ala Lys Lys
 595 600 605

Asn Lys Asp Lys Glu Tyr Tyr Val
 610 615

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

5

Arg Ser Gly Gly Asn Ala Thr Leu Gln Val Asp Ser Trp Pro
 1 5 10

10

<210> 3
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

15

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

ES 2 617 918 T3

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu
 35 40 45

Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr
 50 55 60

Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu Ser Ser Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr Pro
 85 90 95

Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gly Leu
 100 105 110

Gly Thr Asn Tyr Arg Gly His Val Asn Ile Thr Arg Ser Gly Ile Glu
 115 120 125

Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys Pro Glu Ile Asn Ser
 130 135 140

Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Thr Val
 165 170 175

Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly Gln Asp Gln Val Thr
 180 185 190

Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro
 195 200 205

Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg
 210 215 220

Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala
 225 230 235 240

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln
 245 250 255

Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val
 260 265 270

ES 2 617 918 T3

Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu
 275 280 285

Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp
 290 295 300

Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr
 305 310 315 320

Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys
 325 330 335

Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu
 340 345 350

Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser
 355 360 365

Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys
 370 375 380

Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp
 385 390 395 400

Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn
 405 410 415

Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr
 420 425 430

Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr
 435 440 445

Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala
 450 455 460

Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro
 465 470 475 480

Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly
 485 490 495

Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr
 500 505 510

Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu
 515 520 525

ES 2 617 918 T3

Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile
530 535 540

Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg
545 550 555 560

Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser
565 570 575

Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu
580 585 590

Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg
595 600 605

Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
610 615 620

5 <210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

10 Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly
1 5 10

15 <210> 5
<211> 622
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu
35 40 45

Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr
50 55 60

Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu Ser Ser Thr Ala Thr
65 70 75 80

Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr Pro
85 90 95

ES 2 617 918 T3

Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gly Leu
100 105 110

Gly Thr Asn Tyr Arg Gly His Val Asn Ile Thr Arg Ser Gly Ile Glu
115 120 125

Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys Pro Glu Ile Asn Ser
130 135 140

Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro
145 150 155 160

Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Thr Val
165 170 175

Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly Gln Asp Gln Val Thr
180 185 190

Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro
195 200 205

Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg
210 215 220

Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala
225 230 235 240

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln
245 250 255

Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val
260 265 270

Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu
275 280 285

Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp
290 295 300

Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr
305 310 315 320

Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys
325 330 335

Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu
340 345 350

ES 2 617 918 T3

Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser
355 360 365

Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys
370 375 380

Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp
385 390 395 400

Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn
405 410 415

Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr
420 425 430

Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr
435 440 445

Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala
450 455 460

Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro
465 470 475 480

Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly
485 490 495

Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr
500 505 510

Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu
515 520 525

Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile
530 535 540

Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg
545 550 555 560

Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser
565 570 575

Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu
580 585 590

Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg
595 600 605

Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu

ES 2 617 918 T3

	610		615		620											
5	<210> 6 <211> 13 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 6															
10		Gly	Leu	Asp	Glu	Asp	Ser	Asp	Arg	Ala	Ile	Glu	Gly	Arg		
		1				5						10				
15	<210> 7 <211> 780 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 7															
	Met	Ala	Ala	Pro	Gly	Gly	Arg	Ser	Glu	Pro	Pro	Gln	Leu	Pro	Glu	Tyr
	1				5					10					15	
	Ser	Cys	Ser	Tyr	Met	Val	Ser	Arg	Pro	Val	Tyr	Ser	Glu	Leu	Ala	Phe
				20					25					30		
	Gln	Gln	Gln	His	Glu	Arg	Arg	Leu	Gln	Glu	Arg	Lys	Thr	Leu	Arg	Glu
			35					40					45			
	Ser	Leu	Ala	Lys	Cys	Cys	Ser	Cys	Ser	Arg	Lys	Arg	Ala	Phe	Gly	Val
	50						55					60				
	Leu	Lys	Thr	Leu	Val	Pro	Ile	Leu	Glu	Trp	Leu	Pro	Lys	Tyr	Arg	Val
	65					70					75					80
	Lys	Glu	Trp	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	Ile	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Gly	Leu
				85						90					95	
	Val	Ala	Thr	Leu	Gln	Gly	Met	Ala	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Val	Pro
				100					105					110		
	Val	Gly	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ala	Phe	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Tyr	Phe
			115					120					125			
	Ile	Phe	Gly	Thr	Ser	Arg	His	Ile	Ser	Val	Gly	Pro	Phe	Pro	Val	Val
	130						135					140				
	Ser	Leu	Met	Val	Gly	Ser	Val	Val	Leu	Ser	Met	Ala	Pro	Asp	Glu	His
	145					150					155					160
	Phe	Leu	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Gly	Thr	Val	Leu	Asn	Thr	Thr	Met	Ile
					165					170					175	

ES 2 617 918 T3

Asp Thr Ala Ala Arg Asp Thr Ala Arg Val Leu Ile Ala Ser Ala Leu
 180 185 190

Thr Leu Leu Val Gly Ile Ile Gln Leu Ile Phe Gly Gly Leu Gln Ile
 195 200 205

Gly Phe Ile Val Arg Tyr Leu Ala Asp Pro Leu Val Gly Gly Phe Thr
 210 215 220

Thr Ala Ala Ala Phe Gln Val Leu Val Ser Gln Leu Lys Ile Val Leu
 225 230 235 240

Asn Val Ser Thr Lys Asn Tyr Asn Gly Val Leu Ser Ile Ile Tyr Thr
 245 250 255

Leu Val Glu Ile Phe Gln Asn Ile Gly Asp Thr Asn Leu Ala Asp Phe
 260 265 270

Thr Ala Gly Leu Leu Thr Ile Val Val Cys Met Ala Val Lys Glu Leu
 275 280 285

Asn Asp Arg Phe Arg His Lys Ile Pro Val Pro Ile Pro Ile Glu Val
 290 295 300

Ile Val Thr Ile Ile Ala Thr Ala Ile Ser Tyr Gly Ala Asn Leu Glu
 305 310 315 320

Lys Asn Tyr Asn Ala Gly Ile Val Lys Ser Ile Pro Arg Gly Phe Leu
 325 330 335

Pro Pro Glu Leu Pro Pro Val Ser Leu Phe Ser Glu Met Leu Ala Ala
 340 345 350

Ser Phe Ser Ile Ala Val Val Ala Tyr Ala Ile Ala Val Ser Val Gly
 355 360 365

Lys Val Tyr Ala Thr Lys Tyr Asp Tyr Thr Ile Asp Gly Asn Gln Glu
 370 375 380

Phe Ile Ala Phe Gly Ile Ser Asn Ile Phe Ser Gly Phe Phe Ser Cys
 385 390 395 400

Phe Val Ala Thr Thr Ala Leu Ser Arg Thr Ala Val Gln Glu Ser Thr
 405 410 415

Gly Gly Lys Thr Gln Val Ala Gly Ile Ile Ser Ala Ala Ile Val Met
 420 425 430

Ile Ala Ile Leu Ala Leu Gly Lys Leu Leu Glu Pro Leu Gln Lys Ser

ES 2 617 918 T3

	435				440				445						
Val	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Asn	Leu	Lys	Gly	Met	Phe	Met	Gln
	450					455					460				
Leu	Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Leu	Trp	Arg	Gln	Asn	Lys	Ile	Asp	Ala	Val
465					470					475					480
Ile	Trp	Val	Phe	Thr	Cys	Ile	Val	Ser	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Asp	Leu
				485					490					495	
Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Phe	Gly	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Leu	Arg
			500					505					510		
Val	Gln	Phe	Pro	Ser	Trp	Asn	Gly	Leu	Gly	Ser	Ile	Pro	Ser	Thr	Asp
		515					520					525			
Ile	Tyr	Lys	Ser	Thr	Lys	Asn	Tyr	Lys	Asn	Ile	Glu	Glu	Pro	Gln	Gly
	530					535					540				
Val	Lys	Ile	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Pro	Ile	Phe	Tyr	Gly	Asn	Val	Asp
545					550					555					560
Gly	Phe	Lys	Lys	Cys	Ile	Lys	Ser	Thr	Val	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Arg
				565					570					575	
Val	Tyr	Asn	Lys	Arg	Leu	Lys	Ala	Leu	Arg	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu	Ile
			580					585					590		
Lys	Ser	Gly	Gln	Leu	Arg	Ala	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser	Asp	Ala
		595					600					605			
Val	Ser	Thr	Asn	Asn	Ala	Phe	Glu	Pro	Asp	Glu	Asp	Ile	Glu	Asp	Leu
	610					615					620				
Glu	Glu	Leu	Asp	Ile	Pro	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Ile	Gln	Val	Asp	Trp
625					630					635					640
Asn	Ser	Glu	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Asn	Val	Pro	Lys	Val	Pro	Ile	His
				645					650					655	
Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Phe	Leu	Asp	Val	Val	Gly
			660					665					670		
Val	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	Ile	Val	Lys	Glu	Phe	Gln	Arg	Ile	Asp	Val
		675					680					685			
Asn	Val	Tyr	Phe	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Val	Ile	Glu	Lys	Leu	Glu
	690					695					700				

ES 2 617 918 T3

Gln Cys Gly Phe Phe Asp Asp Asn Ile Arg Lys Asp Thr Phe Phe Leu
705 710 715 720

Thr Val His Asp Ala Ile Leu Tyr Leu Gln Asn Gln Val Lys Ser Gln
725 730 735

Glu Gly Gln Gly Ser Ile Leu Glu Thr Ile Thr Leu Ile Gln Asp Cys
740 745 750

Lys Asp Thr Leu Glu Leu Ile Glu Thr Glu Leu Thr Glu Glu Glu Leu
755 760 765

Asp Val Gln Asp Glu Ala Met Arg Thr Leu Ala Ser
770 775 780

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 8

Leu Ala Gly Leu Ile Phe Gly Leu Leu Thr Val Val Leu Arg
1 5 10

10

<210> 9
<211> 177
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 9

Met Glu Ala Leu Ile Leu Glu Pro Ser Leu Tyr Thr Val Lys Ala Ile
1 5 10 15

Leu Ile Leu Asp Asn Asp Gly Asp Arg Leu Phe Ala Lys Tyr Tyr Asp
20 25 30

Asp Thr Tyr Pro Ser Val Lys Glu Gln Lys Ala Phe Glu Lys Asn Ile
35 40 45

Phe Asn Lys Thr His Arg Thr Asp Ser Glu Ile Ala Leu Leu Glu Gly
50 55 60

Leu Thr Val Val Tyr Lys Ser Ser Ile Asp Leu Tyr Phe Tyr Val Ile
65 70 75 80

Gly Ser Ser Tyr Glu Asn Glu Leu Met Leu Met Ala Val Leu Asn Cys
85 90 95

Leu Phe Asp Ser Leu Ser Gln Met Leu Arg Lys Asn Val Glu Lys Arg

ES 2 617 918 T3

100 105 110

Ala Leu Leu Glu Asn Met Glu Gly Leu Phe Leu Ala Val Asp Glu Ile
115 120 125

Val Asp Gly Gly Val Ile Leu Glu Ser Asp Pro Gln Gln Val Val His
130 135 140

Arg Val Ala Leu Arg Gly Glu Asp Val Pro Leu Thr Glu Gln Thr Val
145 150 155 160

Ser Gln Val Leu Gln Ser Ala Lys Glu Gln Ile Lys Trp Ser Leu Leu
165 170 175

Arg

5 <210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Ile Leu Ile Leu Asp Asn Asp Gly Asp Arg Leu Phe Ala Lys Tyr
1 5 10 15

10 Tyr Asp Asp

15 <210> 11
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Arg Arg Leu Leu Ile Pro Leu Ala Leu Trp Leu Gly Ala Val Gly
1 5 10 15

Val Gly Val Ala Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly Leu Gln Val
20 25 30

Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp Ala Phe Gln
35 40 45

Glu Thr Ser Val Glu Ser Ala Val Asp Thr Pro Phe Pro Ala Gly Ile
50 55 60

Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Ser Cys Arg Lys Arg
65 70 75 80

ES 2 617 918 T3

Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Lys Val Arg Pro Asn Gly Arg Lys Arg
85 90 95

Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Leu Gly Ser Glu Asp Lys Val Leu Gly
100 105 110

Arg Leu Val His Cys Pro Ile Glu Thr Gln Val Leu Arg Glu Ala Glu
115 120 125

Glu His Gln Glu Thr Gln Cys Leu Arg Val Gln Arg Ala Gly Glu Asp
130 135 140

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Lys Ala Leu
145 150 155 160

Pro Arg Ser

5 <210> 12
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Lys Ala Leu
1 5 10 15

10 Pro Arg

15 <210> 13
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Arg Arg Leu Leu Ile Pro Leu Ala Leu Trp Leu Gly Ala Val Gly
1 5 10 15

Val Gly Val Ala Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly Leu Gln Val
20 25 30

Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp Ala Phe Gln
35 40 45

Glu Thr Ser Val Glu Ser Ala Val Asp Thr Pro Phe Pro Ala Gly Ile
50 55 60

Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Ser Cys Arg Lys Arg
65 70 75 80

ES 2 617 918 T3

Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Lys Val Arg Pro Asn Gly Arg Lys Arg
 85 90 95

Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Leu Gly Ser Glu Asp Lys Val Leu Gly
 100 105 110

Arg Leu Val His Cys Pro Ile Glu Thr Gln Val Leu Arg Glu Ala Glu
 115 120 125

Glu His Gln Glu Thr Gln Cys Leu Arg Val Gln Arg Ala Gly Glu Asp
 130 135 140

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Lys Ala Leu
 145 150 155 160

Pro Arg Ser

5 <210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 14

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Lys Ala Leu
 1 5 10 15

Pro Arg Ser

15 <210> 15
 <211> 782
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15

Met Ala Pro His Arg Pro Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ala Leu Ser Leu Pro Val Arg Ala Ala Thr Ala Ser Arg
 20 25 30

Gly Ala Ser Gln Ala Gly Ala Pro Gln Gly Arg Val Pro Glu Ala Arg
 35 40 45

Pro Asn Ser Met Val Val Glu His Pro Glu Phe Leu Lys Ala Gly Lys
 50 55 60

Glu Pro Gly Leu Gln Ile Trp Arg Val Glu Lys Phe Asp Leu Val Pro
 65 70 75 80

ES 2 617 918 T3

Val Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Asp Phe Phe Thr Gly Asp Ala Tyr Val
85 90 95

Ile Leu Lys Thr Val Gln Leu Arg Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Asp Leu
100 105 110

His Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Cys Ser Gln Asp Glu Ser Gly Ala Ala
115 120 125

Ala Ile Phe Thr Val Gln Leu Asp Asp Tyr Leu Asn Gly Arg Ala Val
130 135 140

Gln His Arg Glu Val Gln Gly Phe Glu Ser Ala Thr Phe Leu Gly Tyr
145 150 155 160

Phe Lys Ser Gly Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Val Ala Ser Gly Phe
165 170 175

Lys His Val Val Pro Asn Glu Val Val Val Gln Arg Leu Phe Gln Val
180 185 190

Lys Gly Arg Arg Val Val Arg Ala Thr Glu Val Pro Val Ser Trp Glu
195 200 205

Ser Phe Asn Asn Gly Asp Cys Phe Ile Leu Asp Leu Gly Asn Asn Ile
210 215 220

His Gln Trp Cys Gly Ser Asn Ser Asn Arg Tyr Glu Arg Leu Lys Ala
225 230 235 240

Thr Gln Val Ser Lys Gly Ile Arg Asp Asn Glu Arg Ser Gly Arg Ala
245 250 255

Arg Val His Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Pro Glu Ala Met Leu Gln
260 265 270

Val Leu Gly Pro Lys Pro Ala Leu Pro Ala Gly Thr Glu Asp Thr Ala
275 280 285

Lys Glu Asp Ala Ala Asn Arg Lys Leu Ala Lys Leu Tyr Lys Val Ser
290 295 300

Asn Gly Ala Gly Thr Met Ser Val Ser Leu Val Ala Asp Glu Asn Pro
305 310 315 320

Phe Ala Gln Gly Ala Leu Lys Ser Glu Asp Cys Phe Ile Leu Asp His
325 330 335

ES 2 617 918 T3

Gly Lys Asp Gly Lys Ile Phe Val Trp Lys Gly Lys Gln Ala Asn Thr
 340 345 350

Glu Glu Arg Lys Ala Ala Leu Lys Thr Ala Ser Asp Phe Ile Thr Lys
 355 360 365

Met Asp Tyr Pro Lys Gln Thr Gln Val Ser Val Leu Pro Glu Gly Gly
 370 375 380

Glu Thr Pro Leu Phe Lys Gln Phe Phe Lys Asn Trp Arg Asp Pro Asp
 385 390 395 400

Gln Thr Asp Gly Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Ser Ser His Ile Ala Asn
 405 410 415

Val Glu Arg Val Pro Phe Asp Ala Ala Thr Leu His Thr Ser Thr Ala
 420 425 430

Met Ala Ala Gln His Gly Met Asp Asp Asp Gly Thr Gly Gln Lys Gln
 435 440 445

Ile Trp Arg Ile Glu Gly Ser Asn Lys Val Pro Val Asp Pro Ala Thr
 450 455 460

Tyr Gly Gln Phe Tyr Gly Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Leu Tyr Asn Tyr
 465 470 475 480

Arg His Gly Gly Arg Gln Gly Gln Ile Ile Tyr Asn Trp Gln Gly Ala
 485 490 495

Gln Ser Thr Gln Asp Glu Val Ala Ala Ser Ala Ile Leu Thr Ala Gln
 500 505 510

Leu Asp Glu Glu Leu Gly Gly Thr Pro Val Gln Ser Arg Val Val Gln
 515 520 525

Gly Lys Glu Pro Ala His Leu Met Ser Leu Phe Gly Gly Lys Pro Met
 530 535 540

Ile Ile Tyr Lys Gly Gly Thr Ser Arg Glu Gly Gly Gln Thr Ala Pro
 545 550 555 560

Ala Ser Thr Arg Leu Phe Gln Val Arg Ala Asn Ser Ala Gly Ala Thr
 565 570 575

Arg Ala Val Glu Val Leu Pro Lys Ala Gly Ala Leu Asn Ser Asn Asp
 580 585 590

ES 2 617 918 T3

Ala Phe Val Leu Lys Thr Pro Ser Ala Ala Tyr Leu Trp Val Gly Thr
 595 600 605

Gly Ala Ser Glu Ala Glu Lys Thr Gly Ala Gln Glu Leu Leu Arg Val
 610 615 620

Leu Arg Ala Gln Pro Val Gln Val Ala Glu Gly Ser Glu Pro Asp Gly
 625 630 635 640

Phe Trp Glu Ala Leu Gly Gly Lys Ala Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Arg
 645 650 655

Leu Lys Asp Lys Lys Met Asp Ala His Pro Pro Arg Leu Phe Ala Cys
 660 665 670

Ser Asn Lys Ile Gly Arg Phe Val Ile Glu Glu Val Pro Gly Glu Leu
 675 680 685

Met Gln Glu Asp Leu Ala Thr Asp Asp Val Met Leu Leu Asp Thr Trp
 690 695 700

Asp Gln Val Phe Val Trp Val Gly Lys Asp Ser Gln Glu Glu Glu Lys
 705 710 715 720

Thr Glu Ala Leu Thr Ser Ala Lys Arg Tyr Ile Glu Thr Asp Pro Ala
 725 730 735

Asn Arg Asp Arg Arg Thr Pro Ile Thr Val Val Lys Gln Gly Phe Glu
 740 745 750

Pro Pro Ser Phe Val Gly Trp Phe Leu Gly Trp Asp Asp Asp Tyr Trp
 755 760 765

Ser Val Asp Pro Leu Asp Arg Ala Met Ala Glu Leu Ala Ala
 770 775 780

5 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 16

Pro Val Arg Ala Ala Thr Ala Ser Arg Gly Ala Ser
 1 5 10

15 <210> 17
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 617 918 T3

<400> 17

Met Met Lys Thr Leu Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Leu Thr Trp Glu
1 5 10 15

Ser Gly Gln Val Leu Gly Asp Gln Thr Val Ser Asp Asn Glu Leu Gln
20 25 30

Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys Tyr Val Asn Lys Glu Ile Gln Asn
35 40 45

Ala Val Asn Gly Val Lys Gln Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys Thr Asn
50 55 60

Glu Glu Arg Lys Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys
65 70 75 80

Lys Glu Asp Ala Leu Asn Glu Thr Arg Glu Ser Glu Thr Lys Leu Lys
85 90 95

Glu Leu Pro Gly Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp Glu Glu
100 105 110

Cys Lys Pro Cys Leu Lys Gln Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala Arg Val
115 120 125

Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Arg Gln Leu Glu Glu Phe Leu
130 135 140

Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg Ile Asp
145 150 155 160

Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met Leu Asp Val Met
165 170 175

Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp Glu Leu Phe Gln
180 185 190

Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr His Tyr Leu Pro
195 200 205

Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe Pro Lys Ser Arg
210 215 220

Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu Pro Leu Asn Phe
225 230 235 240

His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His Glu Ala Gln Gln
245 250 255

ES 2 617 918 T3

Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln His Pro Pro Thr
 260 265 270

Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val Cys Arg Glu Ile
 275 280 285

Arg His Asn Ser Thr Gly Cys Leu Arg Met Lys Asp Gln Cys Asp Lys
 290 295 300

Cys Arg Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn Asn Pro Ser Gln
 305 310 315 320

Ala Lys Leu Arg Arg Glu Leu Asp Glu Ser Leu Gln Val Ala Glu Arg
 325 330 335

Leu Thr Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Ser Tyr Gln Trp Lys Met
 340 345 350

Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Glu Gln Phe Asn Trp
 355 360 365

Val Ser Arg Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp Gln Tyr Tyr Leu
 370 375 380

Arg Val Thr Thr Val Ala Ser His Thr Ser Asp Ser Asp Val Pro Ser
 385 390 395 400

Gly Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro Ile Thr
 405 410 415

Val Thr Val Pro Val Glu Val Ser Arg Lys Asn Pro Lys Phe Met Glu
 420 425 430

Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Lys Lys His Arg Glu
 435 440 445

Glu

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18

Ser Asp Val Pro Ser Gly Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp
 1 5 10 15

10

Ser

ES 2 617 918 T3

<210> 19
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 19

```

Met Met Lys Thr Leu Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Leu Thr Trp Glu
 1          5          10          15

Ser Gly Gln Val Leu Gly Asp Gln Thr Val Ser Asp Asn Glu Leu Gln
 20          25          30

Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys Tyr Val Asn Lys Glu Ile Gln Asn
 35          40          45

Ala Val Asn Gly Val Lys Gln Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys Thr Asn
 50          55          60

Glu Glu Arg Lys Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys
 65          70          75          80

Lys Glu Asp Ala Leu Asn Glu Thr Arg Glu Ser Glu Thr Lys Leu Lys
 85          90          95

Glu Leu Pro Gly Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp Glu Glu
 100         105         110

Cys Lys Pro Cys Leu Lys Gln Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala Arg Val
 115         120         125

Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Arg Gln Leu Glu Glu Phe Leu
 130         135         140

Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg Ile Asp
 145         150         155         160

Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met Leu Asp Val Met
 165         170         175

Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp Glu Leu Phe Gln
 180         185         190

Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr His Tyr Leu Pro
 195         200         205

Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe Pro Lys Ser Arg
 210         215         220
    
```

ES 2 617 918 T3

Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu Pro Leu Asn Phe
225 230 235 240

His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His Glu Ala Gln Gln
245 250 255

Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln His Pro Pro Thr
260 265 270

Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val Cys Arg Glu Ile
275 280 285

Arg His Asn Ser Thr Gly Cys Leu Arg Met Lys Asp Gln Cys Asp Lys
290 295 300

Cys Arg Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn Asn Pro Ser Gln
305 310 315 320

Ala Lys Leu Arg Arg Glu Leu Asp Glu Ser Leu Gln Val Ala Glu Arg
325 330 335

Leu Thr Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Ser Tyr Gln Trp Lys Met
340 345 350

Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Glu Gln Phe Asn Trp
355 360 365

Val Ser Arg Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp Gln Tyr Tyr Leu
370 375 380

Arg Val Thr Thr Val Ala Ser His Thr Ser Asp Ser Asp Val Pro Ser
385 390 395 400

Gly Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro Ile Thr
405 410 415

Val Thr Val Pro Val Glu Val Ser Arg Lys Asn Pro Lys Phe Met Glu
420 425 430

Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Lys Lys His Arg Glu
435 440 445

Glu

<210> 20

<211> 20

ES 2 617 918 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

5

Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr His Tyr Leu Pro Phe
1 5 10 15

Ser Leu Pro His
20

<210> 21
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 21

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Asp Ser Asp Ser Trp Asp Ala
1 5 10 15

Asp Ala Phe Ser Val Glu Asp Pro Val Arg Lys Val Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Thr Ala Gly Gly Asp Arg Trp Glu Gly Glu Asp Glu Asp Glu Asp Val
35 40 45

Lys Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Lys Lys Glu Glu Ala Glu
50 55 60

Val Lys Pro Glu Val Lys Ile Ser Glu Lys Lys Lys Ile Ala Glu Lys
65 70 75 80

Ile Lys Glu Lys Glu Arg Gln Gln Lys Lys Arg Gln Glu Glu Ile Lys
85 90 95

Lys Arg Leu Glu Glu Pro Glu Glu Pro Lys Val Leu Thr Pro Glu Glu
100 105 110

Gln Leu Ala Asp Lys Leu Arg Leu Lys Lys Leu Gln Glu Glu Ser Asp
115 120 125

Leu Glu Leu Ala Lys Glu Thr Phe Gly Val Asn Asn Ala Val Tyr Gly
130 135 140

Ile Asp Ala Met Asn Pro Ser Ser Arg Asp Asp Phe Thr Glu Phe Gly
145 150 155 160

Lys Leu Leu Lys Asp Lys Ile Thr Gln Tyr Glu Lys Ser Leu Tyr Tyr
165 170 175

Ala Ser Phe Leu Glu Val Leu Val Arg Asp Val Cys Ile Ser Leu Glu
180 185 190

15

ES 2 617 918 T3

Ile Asp Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Ser Leu Thr Val Leu Cys Ser
 195 200 205

Glu Lys Gln Lys Gln Glu Lys Gln Ser Lys Ala Lys Lys Lys Lys Lys
 210 215 220

Gly Val Val Pro Gly Gly Gly Leu Lys Ala Thr Met Lys Asp Asp Leu
 225 230 235 240

Ala Asp Tyr Gly Gly Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Gln Asp Tyr Glu Asp
 245 250 255

Phe Met

5 <210> 22
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Oxidación de la metionina

<400> 22

Gly Val Val Pro Gly Gly Gly Leu Lys Ala Thr Met Lys Asp Asp Leu
 1 5 10 15

15 Ala Asp Tyr Gly Gly Tyr Asp Gly Gly
 20 25

20 <210> 23
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Gly Ser Ser Ser Tyr Glu Val Pro Ser Val Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Glu Glu Gly Ala Gly Gln Thr Arg Ser Leu Pro Ala Thr Pro Ser
 20 25 30

Lys Asp Val His Lys Gly Val Gly Gly Ile Ile Phe Ser Ser Ser Pro
 35 40 45

Ile Leu Asp Leu Ser Glu Ser Gly Leu Cys Arg Leu Glu Glu Val Phe
 50 55 60

Arg Ile Pro Ser Leu Gln Gln Leu His Leu Gln Arg Asn Ala Leu Cys

ES 2 617 918 T3

Glu Ser Arg Ala Ala Ala Leu Arg Glu Leu Gln Glu Lys Gln Ala Leu
 340 345 350

Met Glu Gln Gln Arg Arg Glu Lys Arg Ala Leu Gln Glu Trp Arg Glu
 355 360 365

Arg Ala Gln Arg Met Arg Lys Arg Lys Glu Glu Leu Ser Lys Leu Leu
 370 375 380

Pro Pro Arg Arg Ser Met Val Ala Ser Lys Ile Pro Ser Ala Thr Asp
 385 390 395 400

Leu Ile Asp Asn Arg Lys Val Pro Leu Asn Pro Pro Gly Lys Met Lys
 405 410 415

Pro Ser Lys Glu Lys Ser Pro Gln Ala Ser Lys Glu Met Ser Ala Leu
 420 425 430

Gln Glu Arg Asn Leu Glu Glu Lys Ile Lys Gln His Val Leu Gln Met
 435 440 445

Arg Glu Gln Arg Arg Phe His Gly Gln Ala Pro Leu Glu Glu Met Arg
 450 455 460

Lys Ala Ala Glu Asp Leu Glu Ile Ala Thr Glu Leu Gln Asp Glu Val
 465 470 475 480

Leu Lys Leu Lys Leu Gly Leu Thr Leu Asn Lys Asp Arg Arg Arg Ala
 485 490 495

Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ser Leu Gly Leu Pro Ala Ala Gln Pro Gln
 500 505 510

Asn Thr Phe Phe Asn Thr Lys Tyr Gly Glu Ser Gly Asn Val Arg Arg
 515 520 525

Tyr Gln
 530

<210> 24
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

5

10

ES 2 617 918 T3

Ser Ser Pro Ile Leu Asp Leu Ser Glu Ser Gly Leu Cys Arg Leu Glu
1 5 10 15

Glu Val Phe Arg Ile Pro Ser
20

5 <210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 25

Arg Ser Gly Gly Asn Ala Thr Cys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Péptido o proteína para la utilización como biomarcador para la detección de enfermedades psiquiátricas o deterioro cognitivo, en el que
5 la proteína es un precursor de la neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 1 o la proteína es una proteína que consiste de las secuencia de aminoácidos obtenida de la SEC ID nº 1 mediante delección, intercambio y/o adición de uno a tres aminoácidos, y
10 el péptido es el péptido NRX2B derivado de un precursor de la neurexina-2-beta que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2 o el péptido es un péptido que consiste de una secuencia de aminoácidos derivada de la SEC ID nº 2 mediante delección, intercambio y/o adición de uno a tres aminoácidos.
2. Péptido o proteína según la reivindicación 1, en el que el péptido o proteína es un péptido para la utilización como biomarcador del deterioro cognitivo que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2 que se encuentra presente o incrementada en material biológico procedente de pacientes de deterioro cognitivo en comparación con material biológico de sujetos que no sufren de una enfermedad psiquiátrica.
3. Péptido o proteína según la reivindicación 1, en el que el péptido o proteína es un péptido para la utilización como biomarcador de la enfermedad de Alzheimer que consiste de la secuencia de aminoácidos expresada mediante la SEC ID nº 2 que se encuentra presente o incrementada en material biológico procedente de pacientes de enfermedad de Alzheimer en comparación con material biológico de sujetos que no sufren de una enfermedad neurológica no demencia.
4. Péptido o proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido presenta un peso molecular inferior a 10.000 o presenta menos de 50 aminoácidos.
5. Método in vitro para la detección de una enfermedad psiquiátrica o deterioro cognitivo que implica la determinación en material biológico de por lo menos un péptido o proteína según la reivindicación 1.
6. Método in vitro según la reivindicación 5 para la detección del deterioro cognitivo en el que se evalúa que el paciente sufre de deterioro cognitivo en el caso de que, tras la determinación en material biológico del péptido como biomarcador de deterioro cognitivo según la reivindicación 2, se observa que dicho péptido se encuentra presente en cantidad más elevada que en un sujeto que no sufre de una enfermedad psiquiátrica.
7. Kit para la detección de una enfermedad psiquiátrica que contiene un anticuerpo o aptámero específico para por lo menos un péptido o proteína según la reivindicación 1, para la determinación de por lo menos un péptido o proteína según la reivindicación 1.
8. Kit para la detección del deterioro cognitivo, que contiene un anticuerpo o aptámero específico para por lo menos un péptido o proteína según la reivindicación 1, para la determinación de por lo menos un péptido o proteína según la reivindicación 1 o 2.

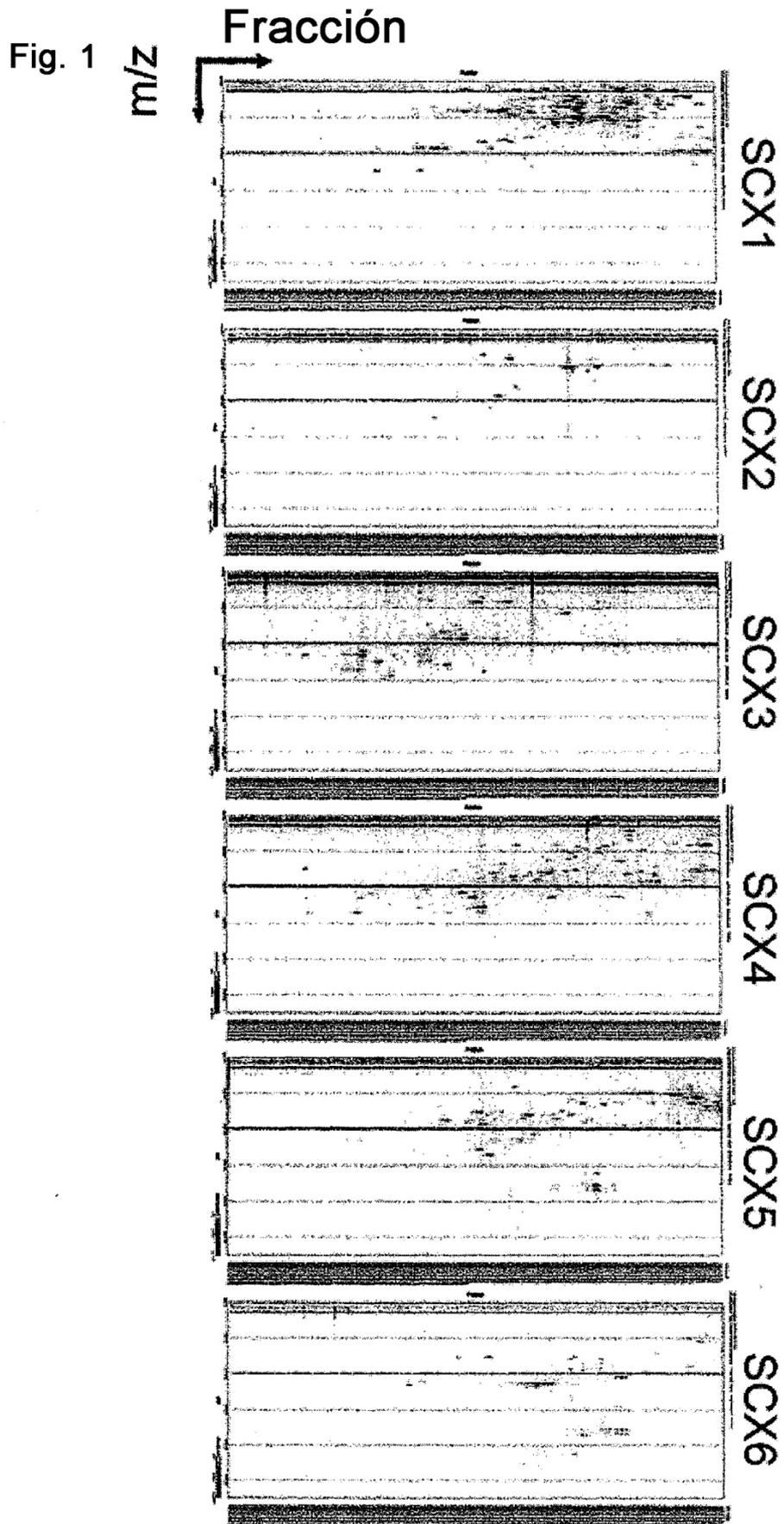
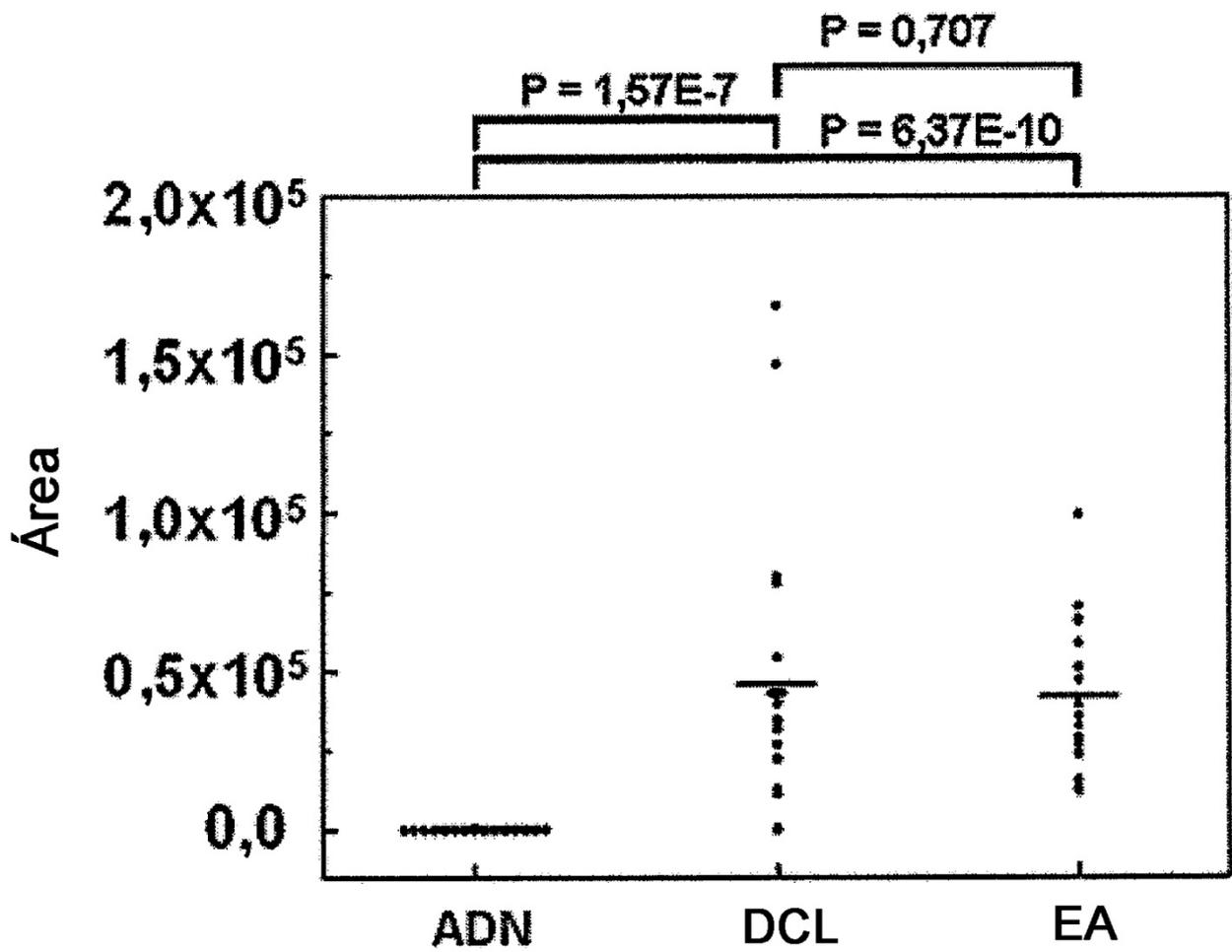
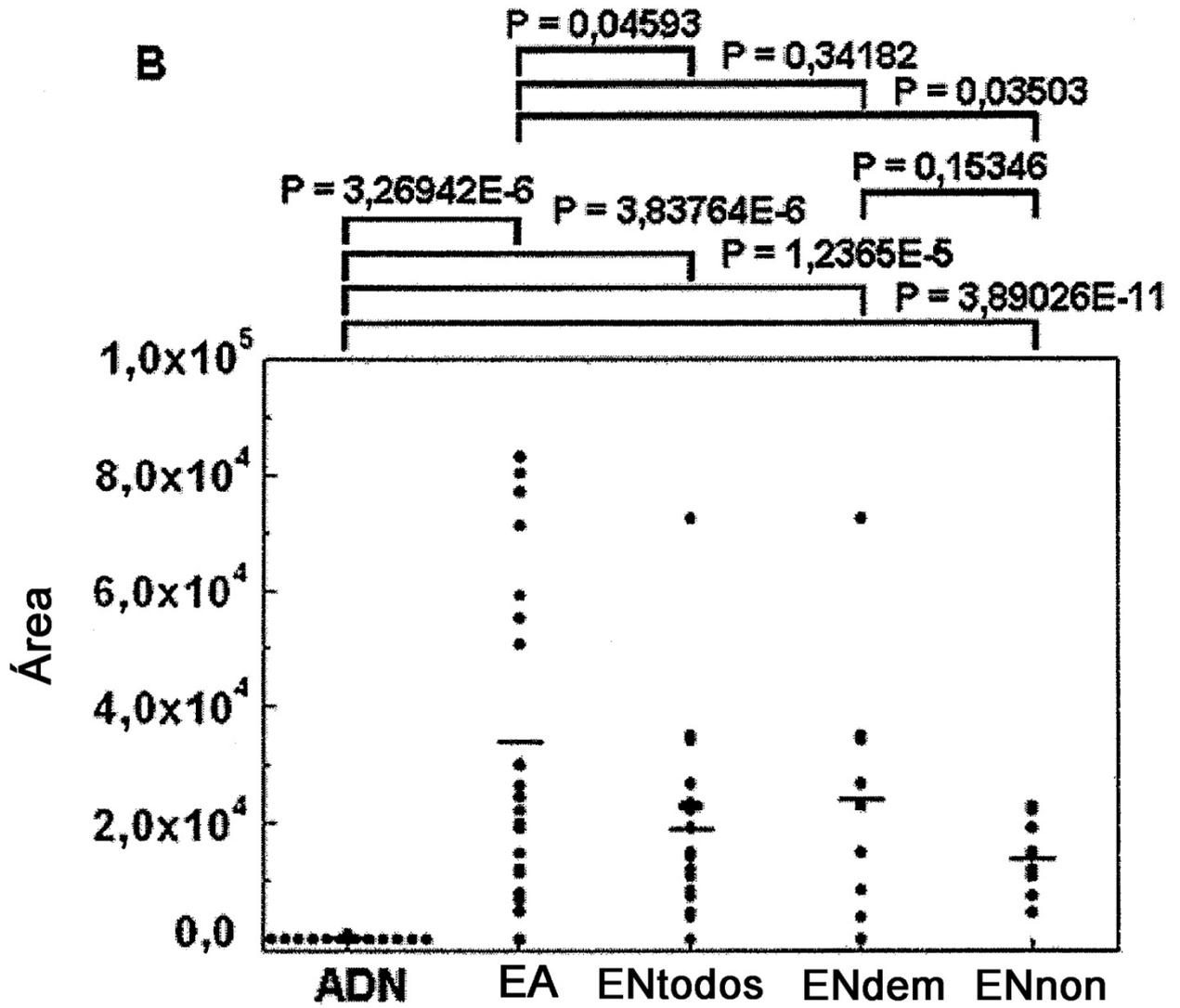


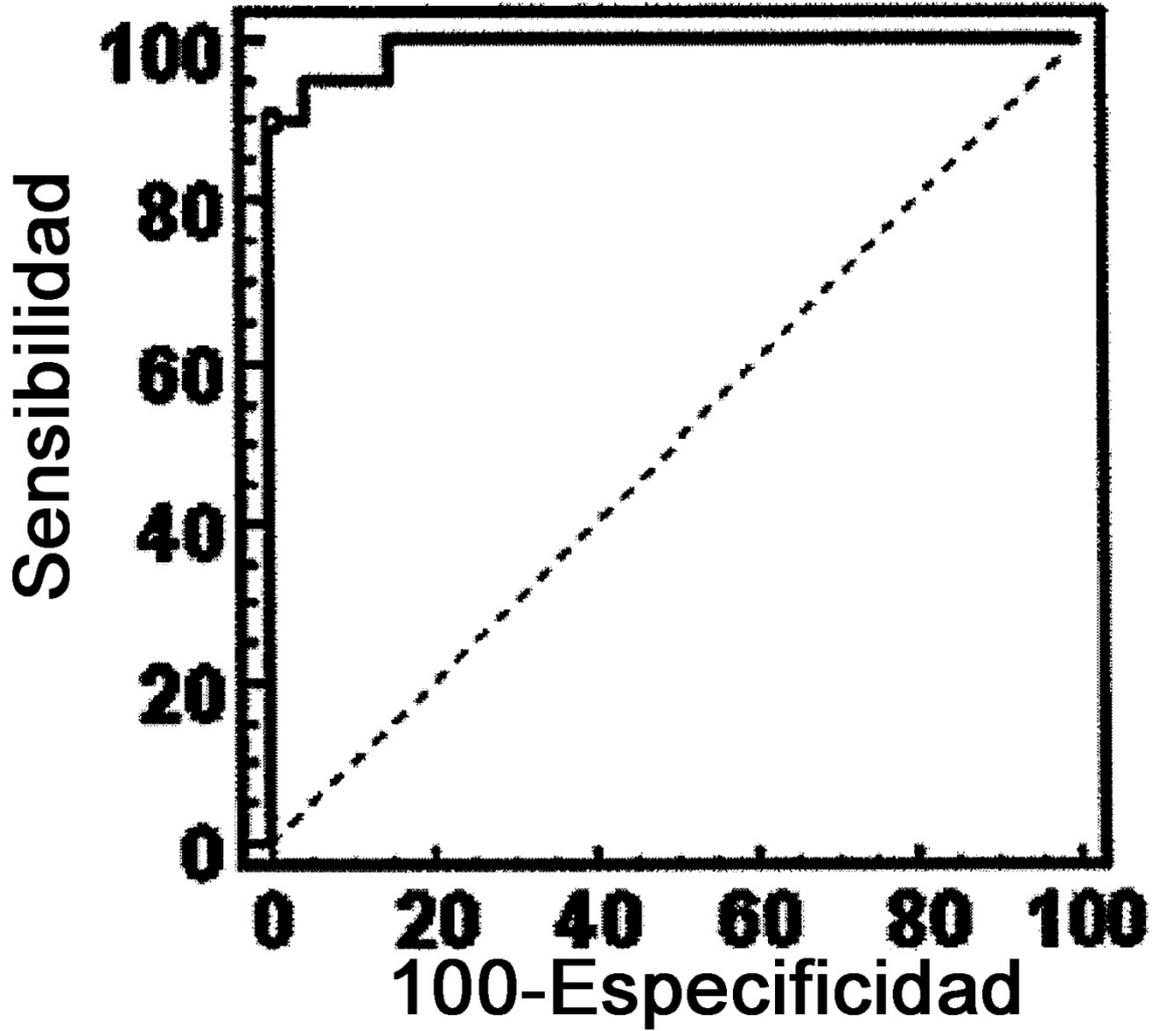
Fig. 2

A Marcador A = NRX2B



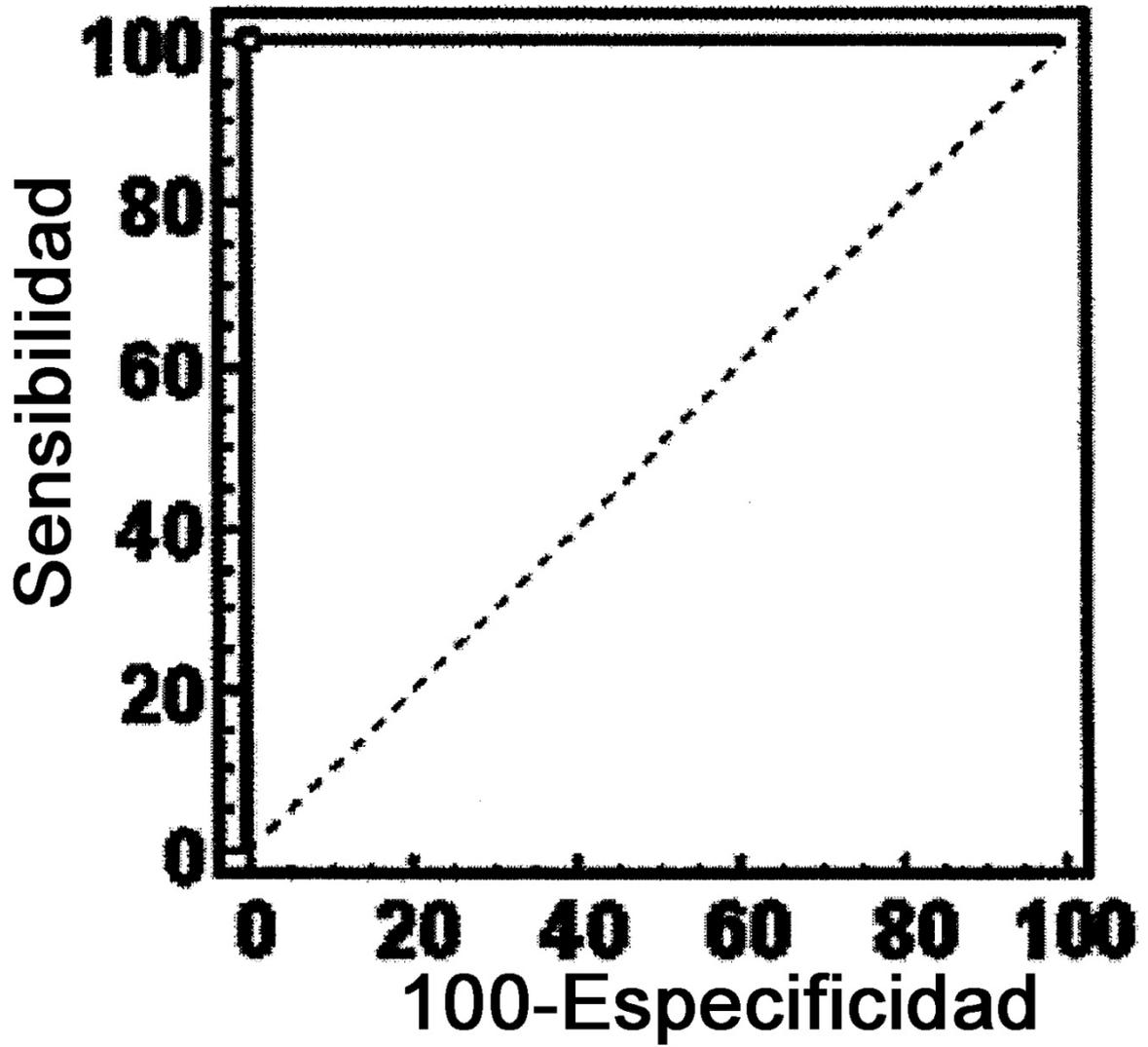


Q



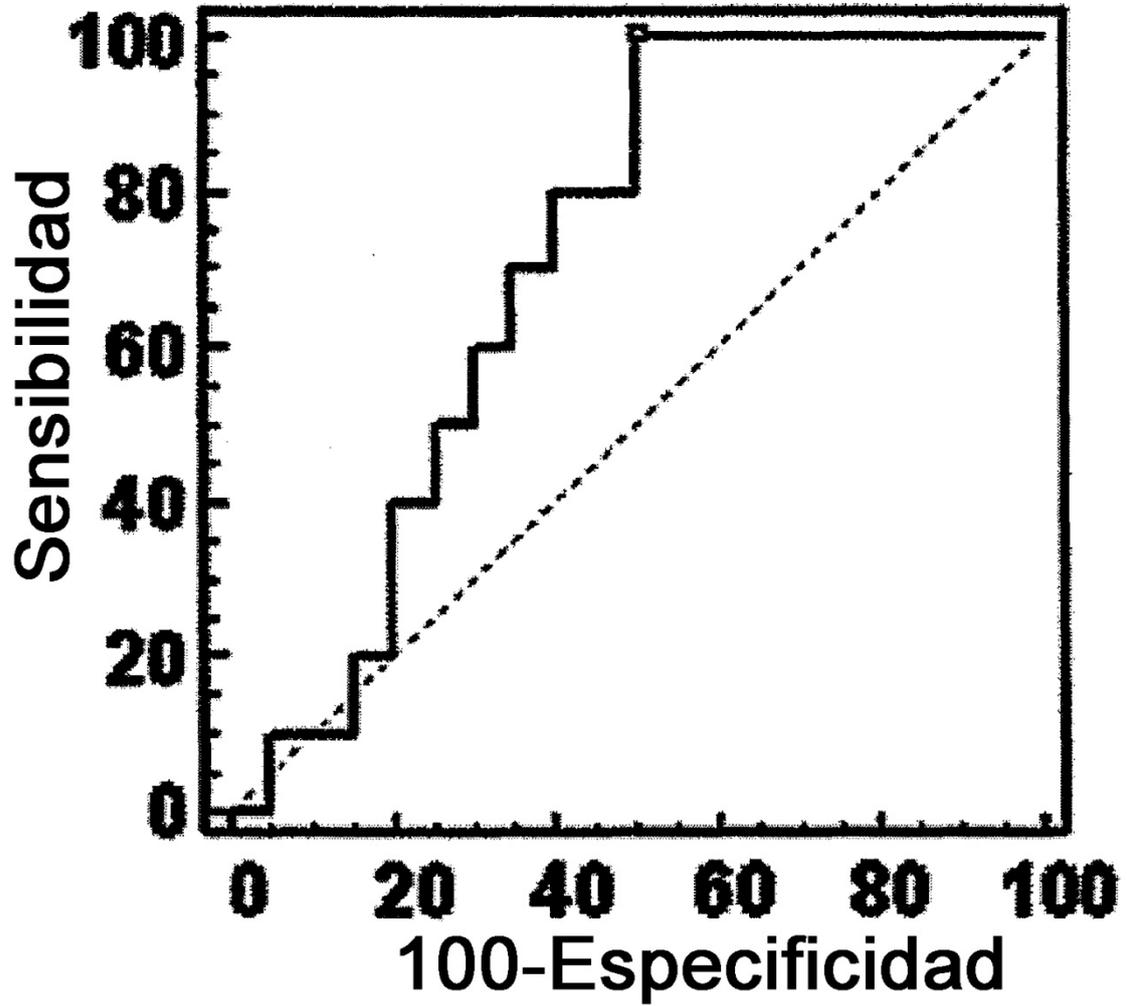
DCL vs. ADN

D



EA vs. ADN

E



EA vs. ENnon

Fig. 3

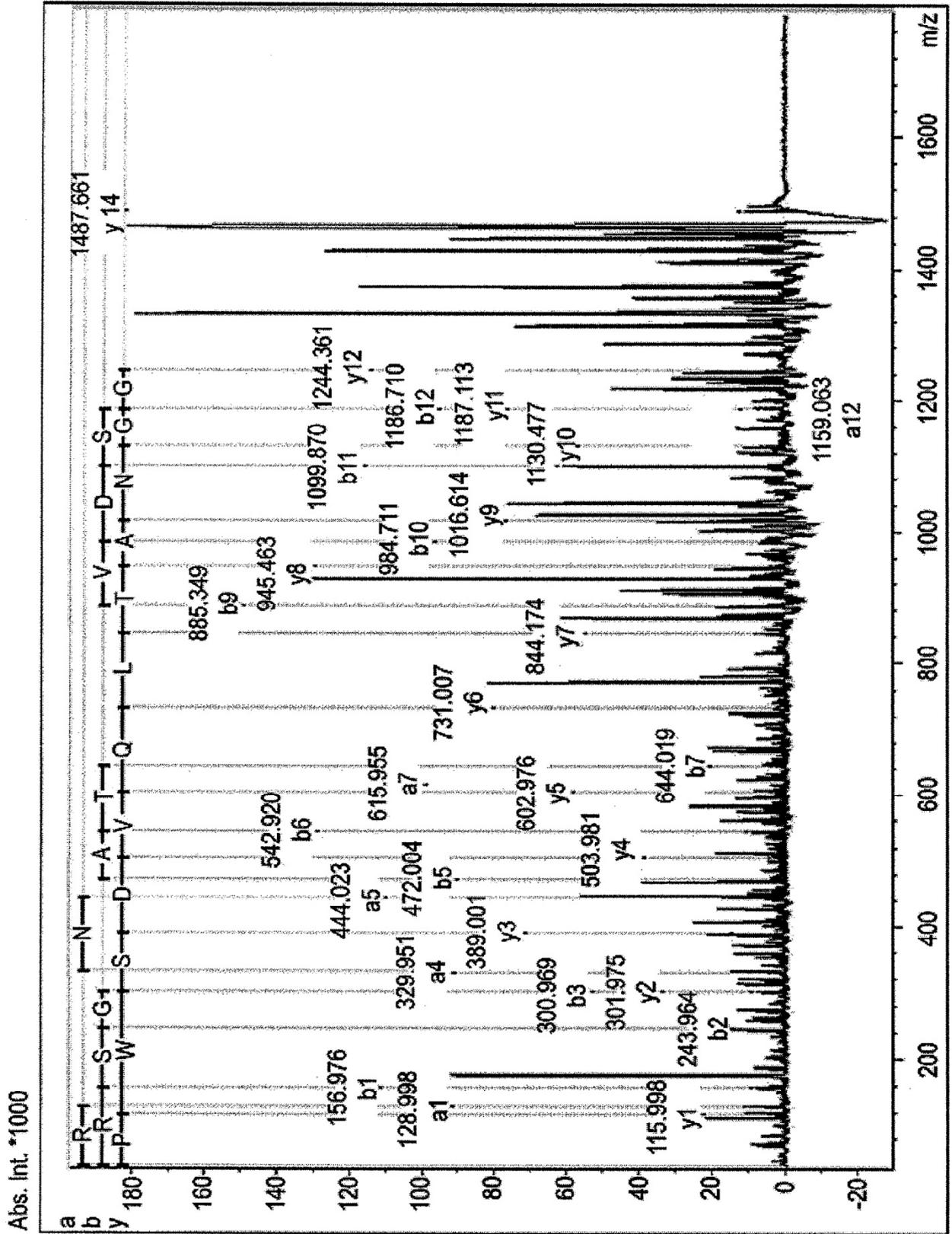
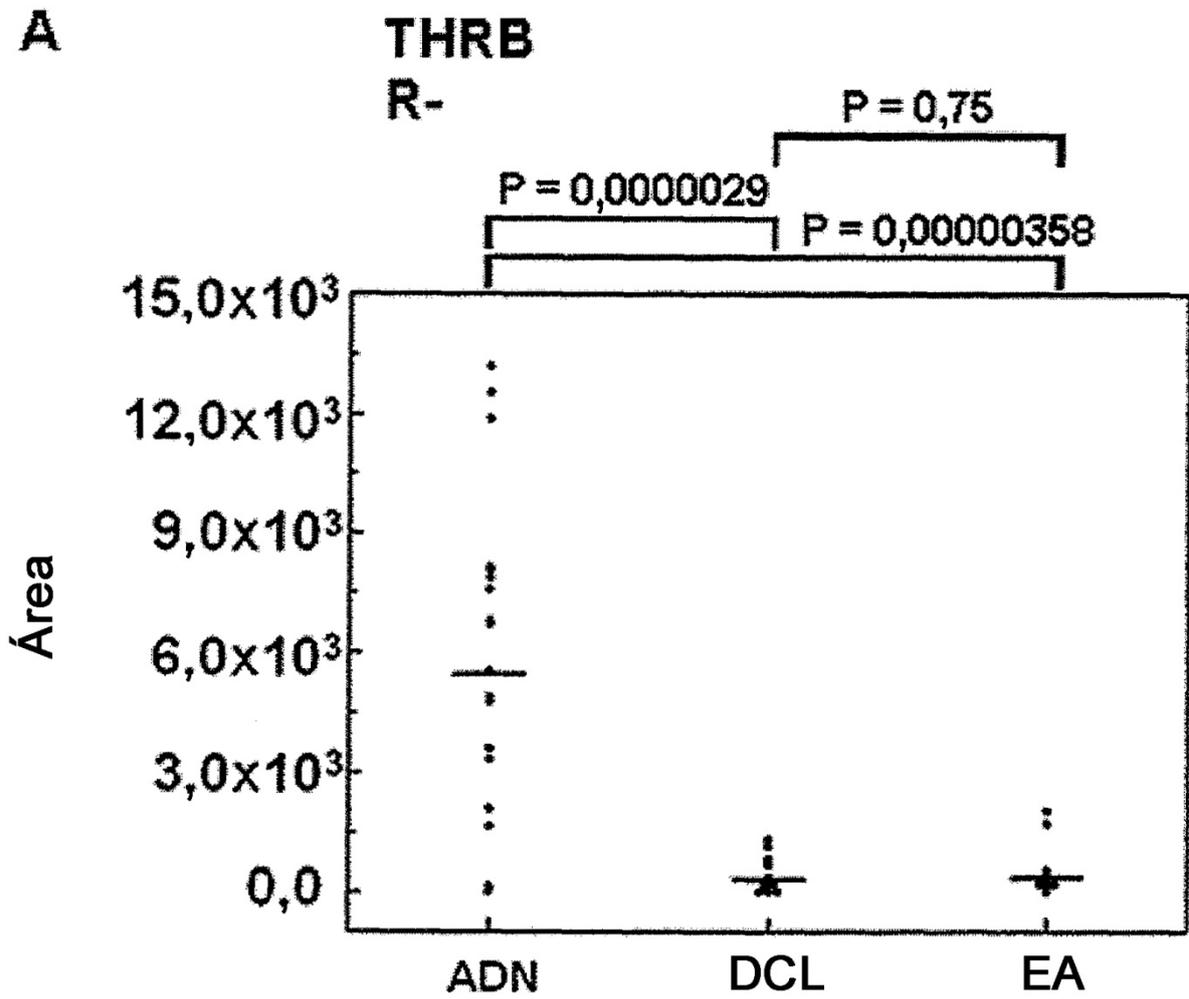


Fig. 4



D

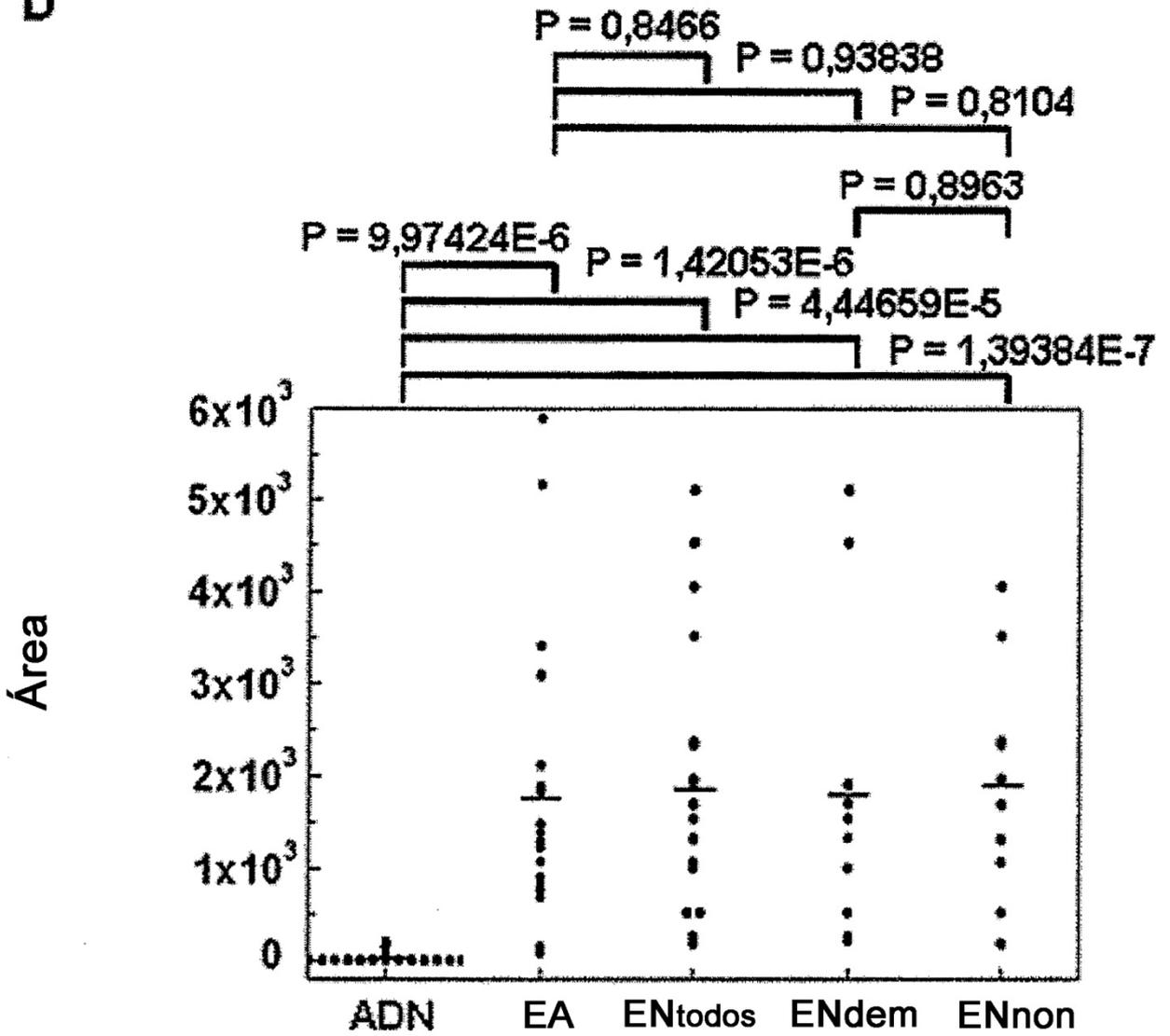
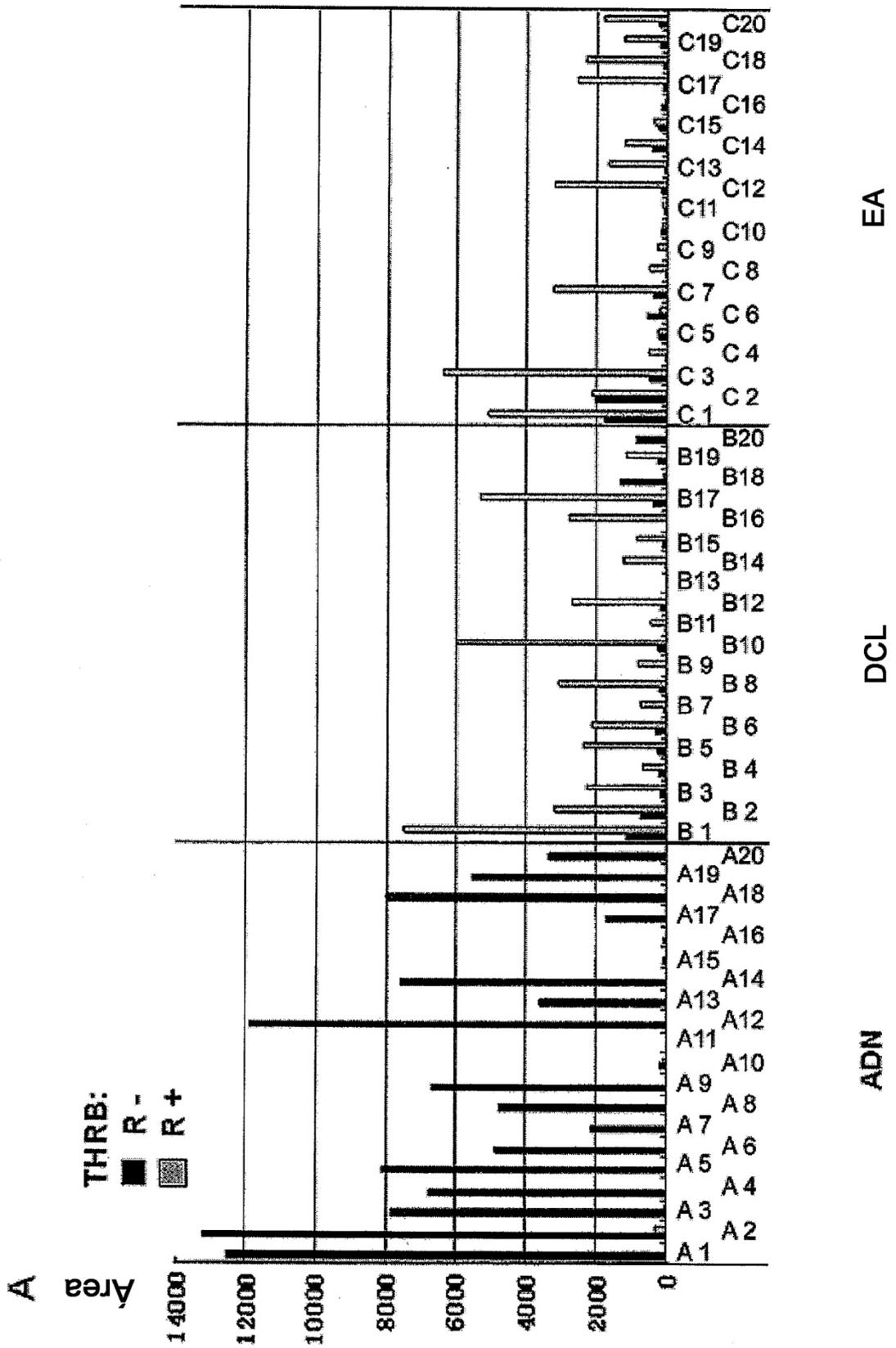


Fig. 5



B

THRB

R-

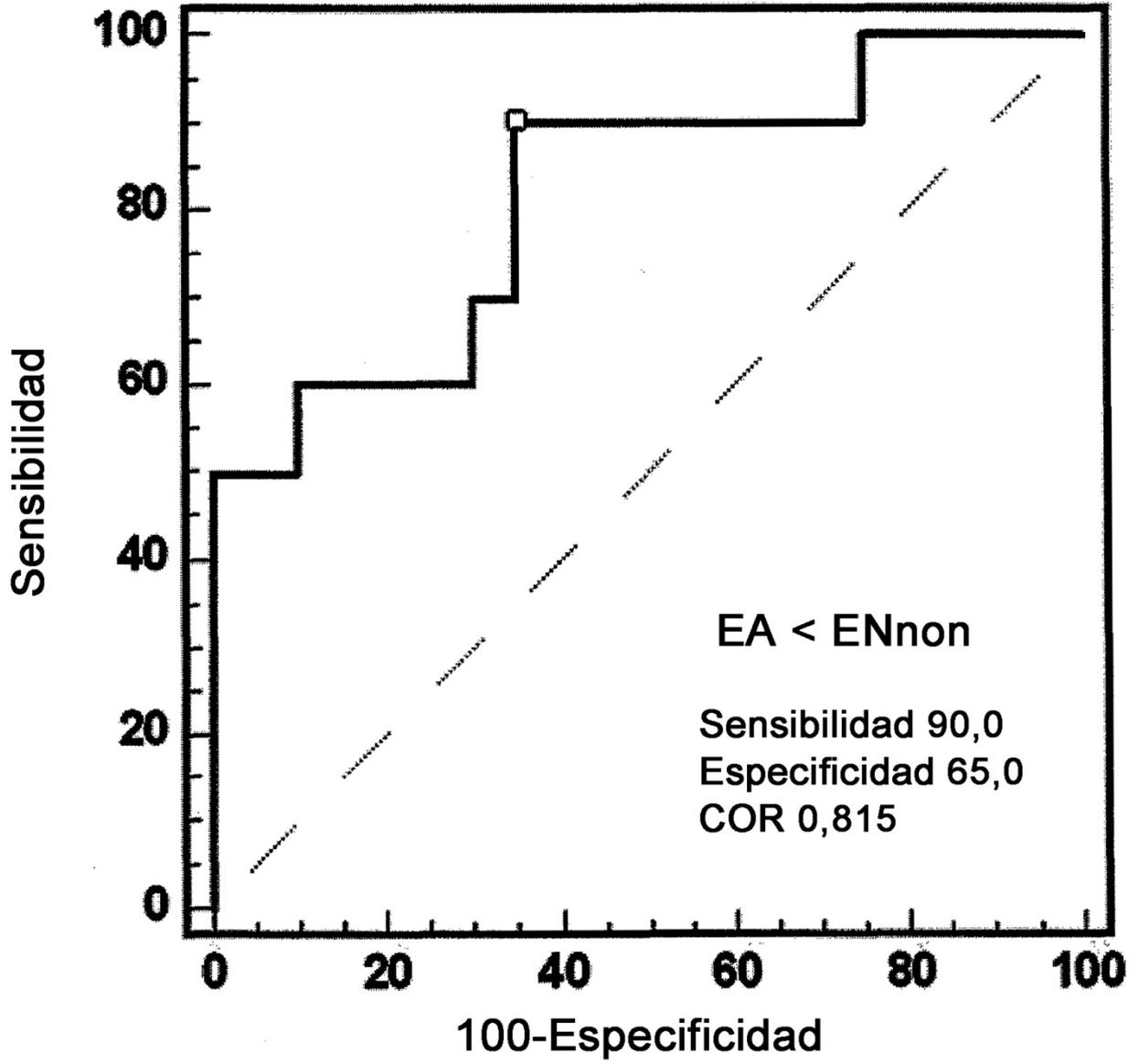
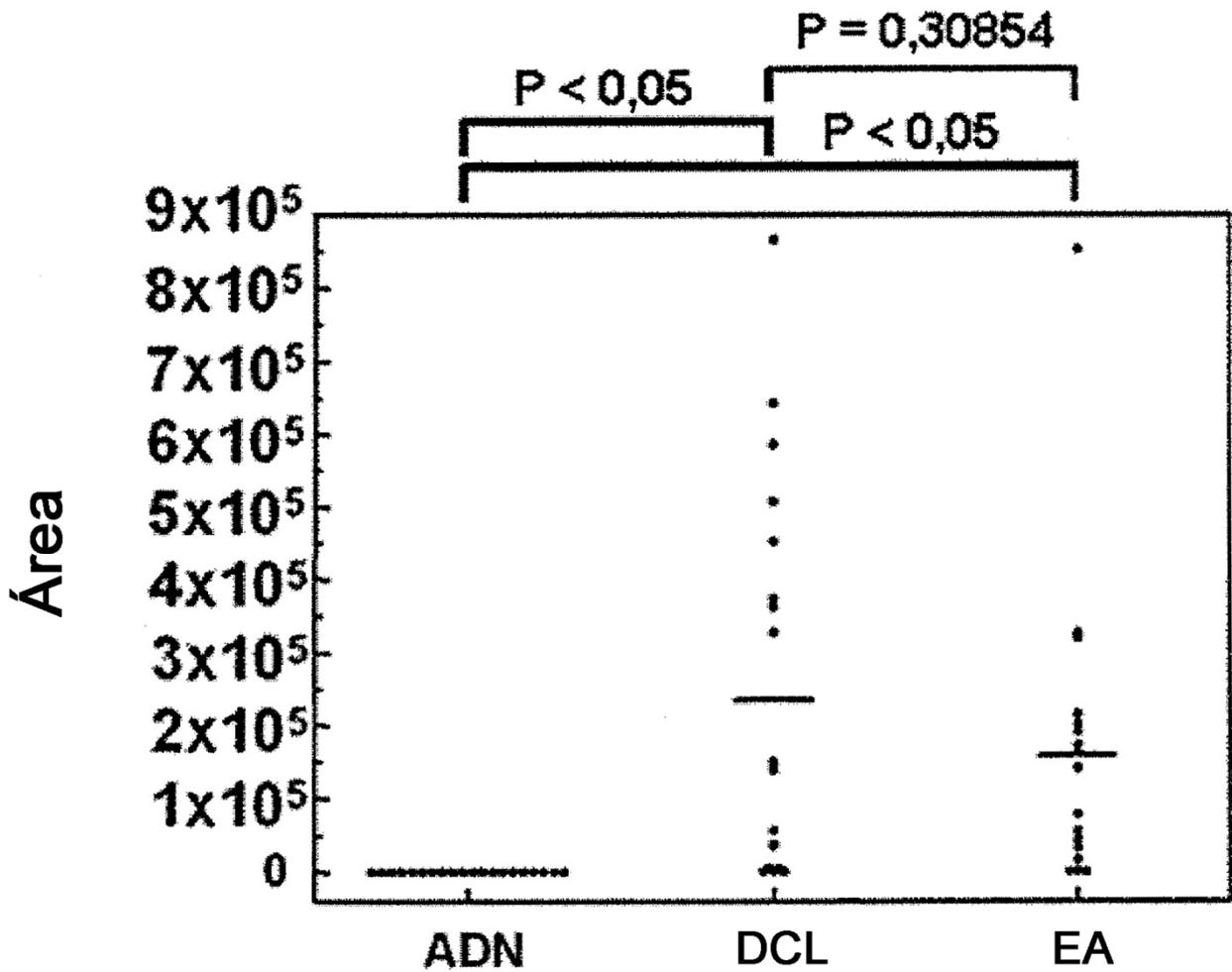


Fig. 6

A

S26A4



B

S26A4

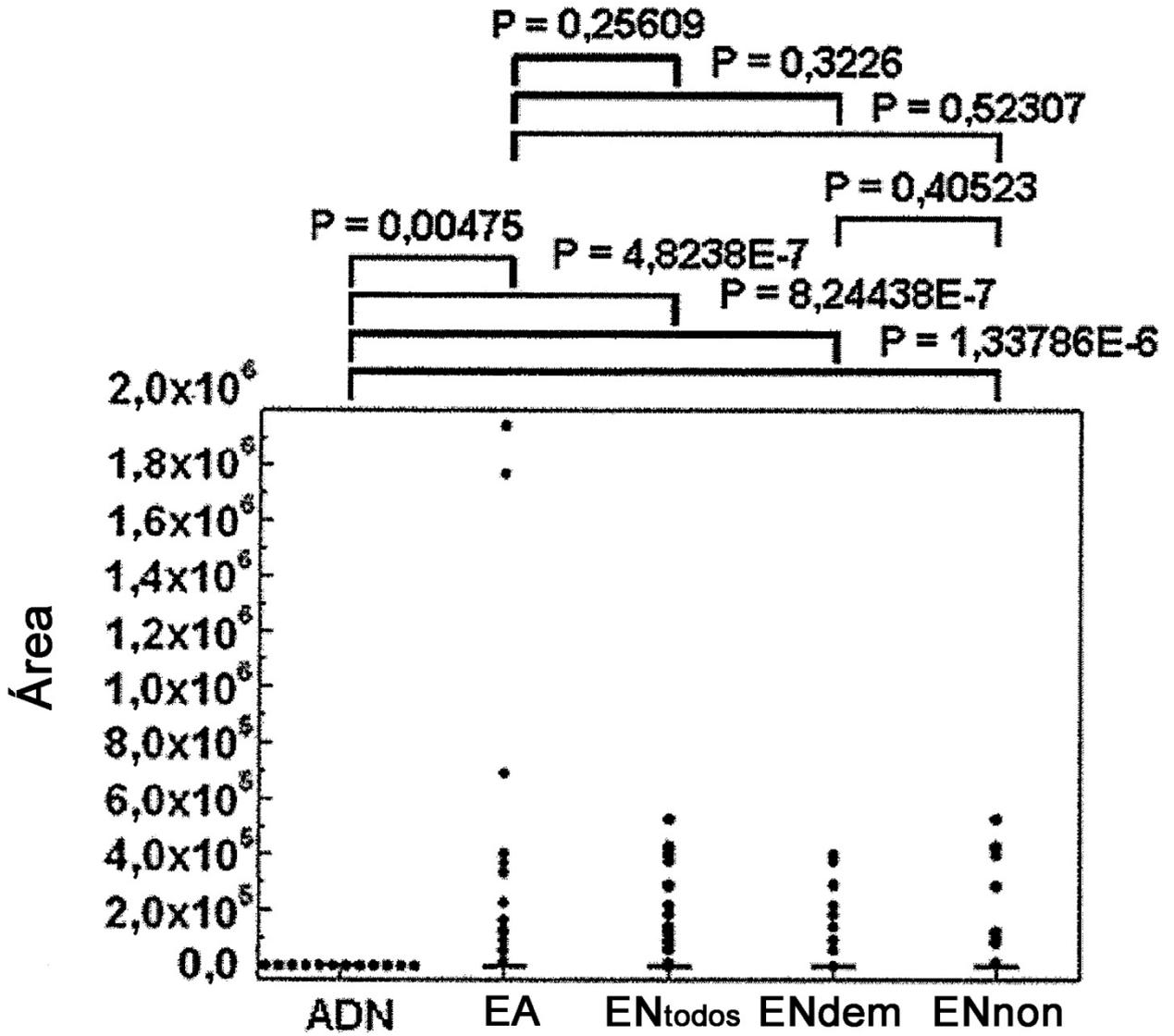
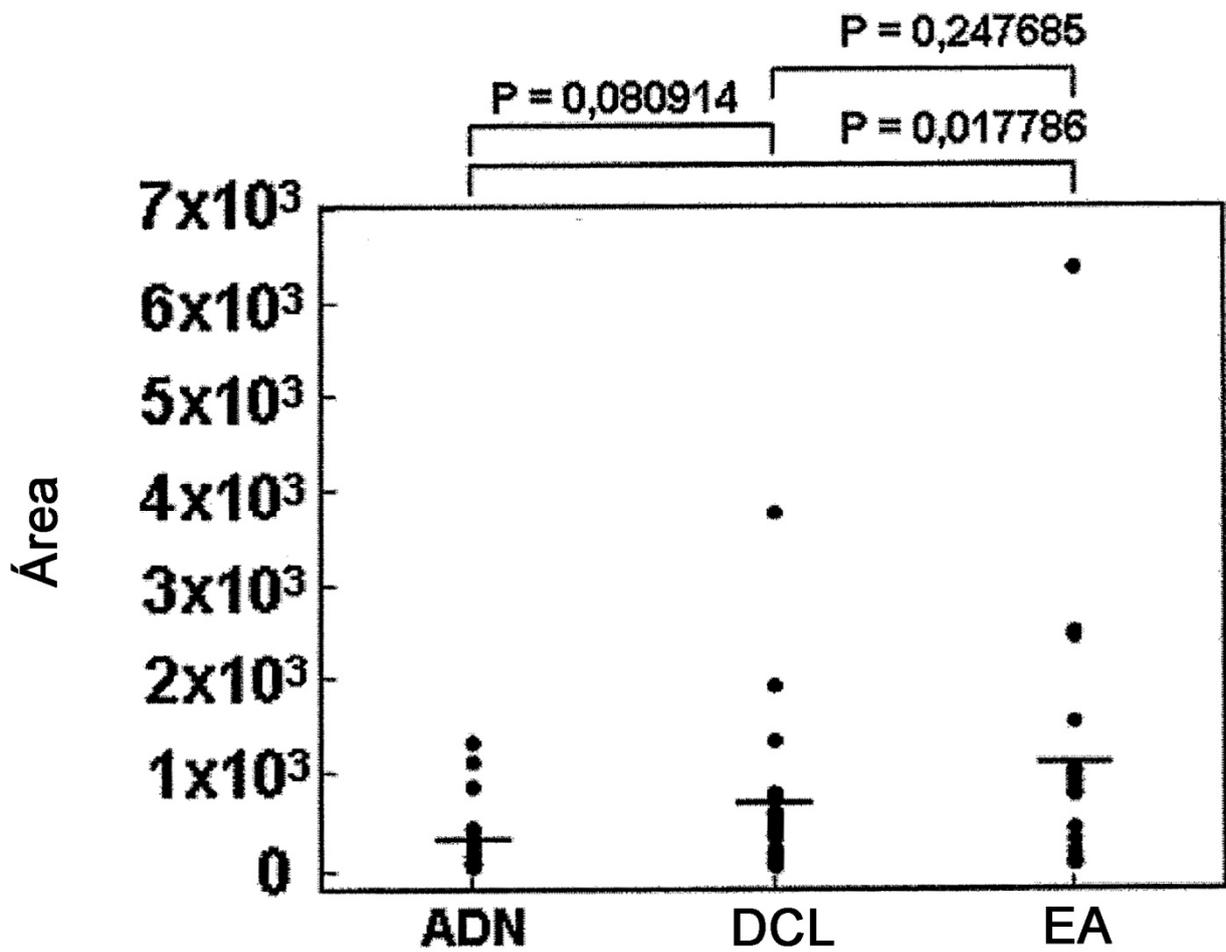


Fig. 8

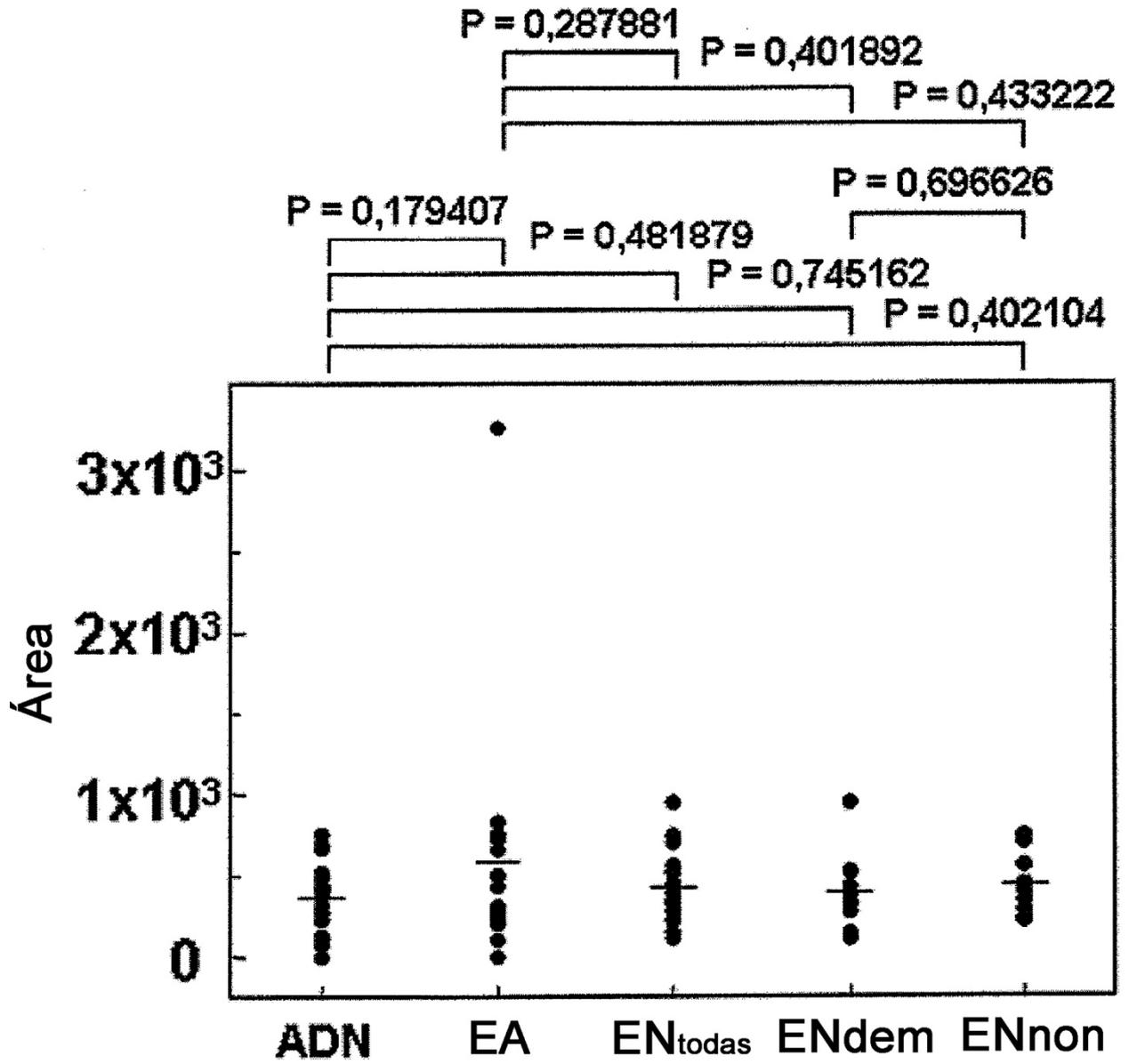
A

GELES



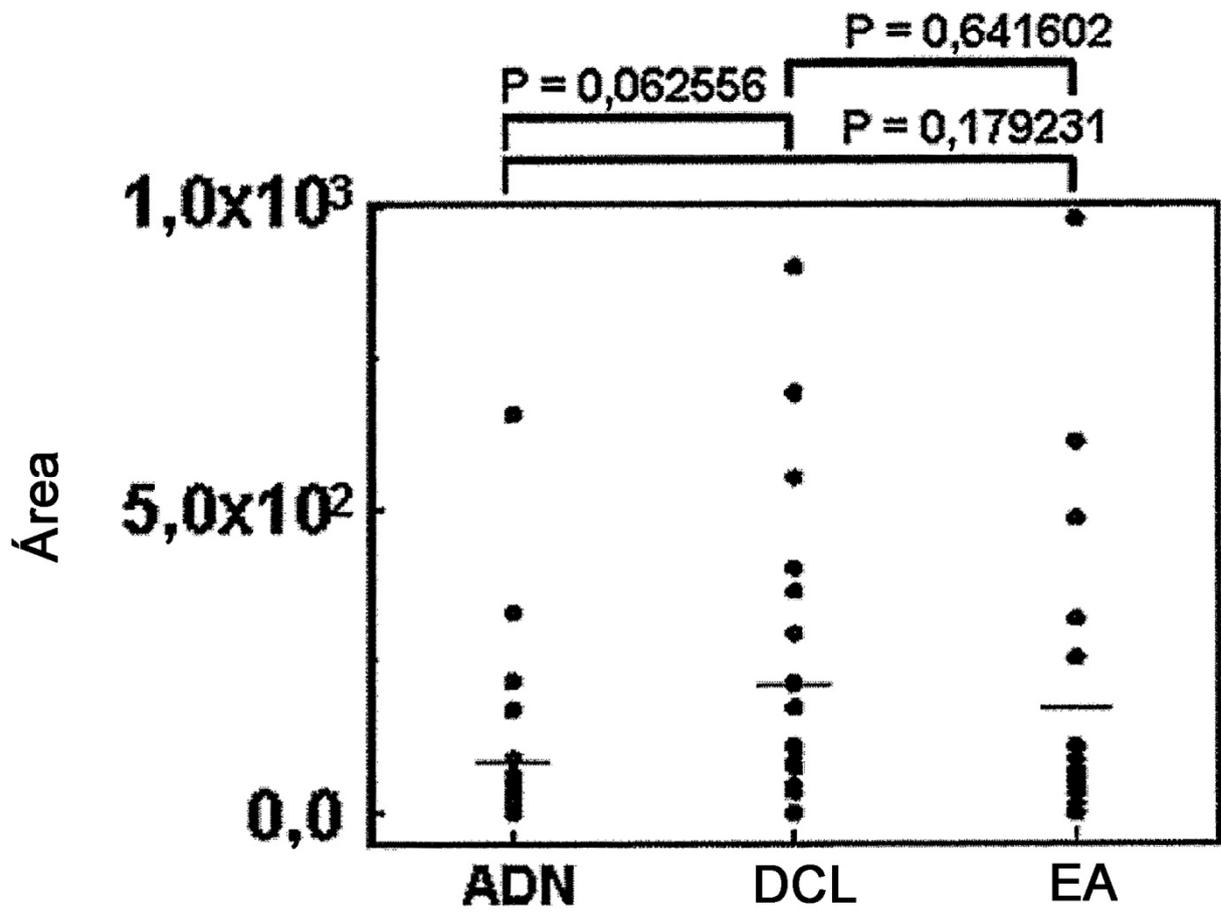
B

GELES



A Fig. 9

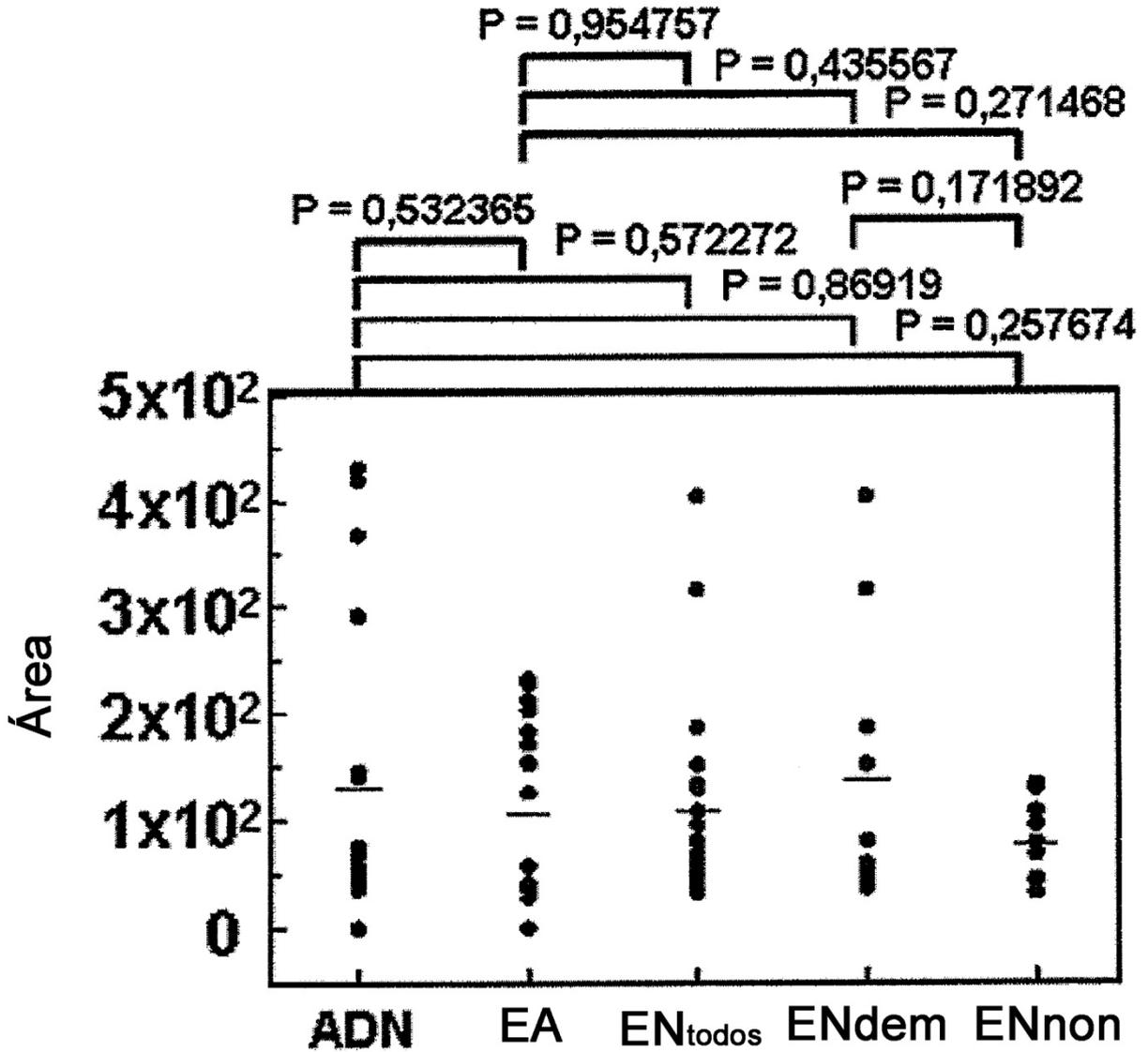
CLUS
SDVP N-term.



B

CLUS

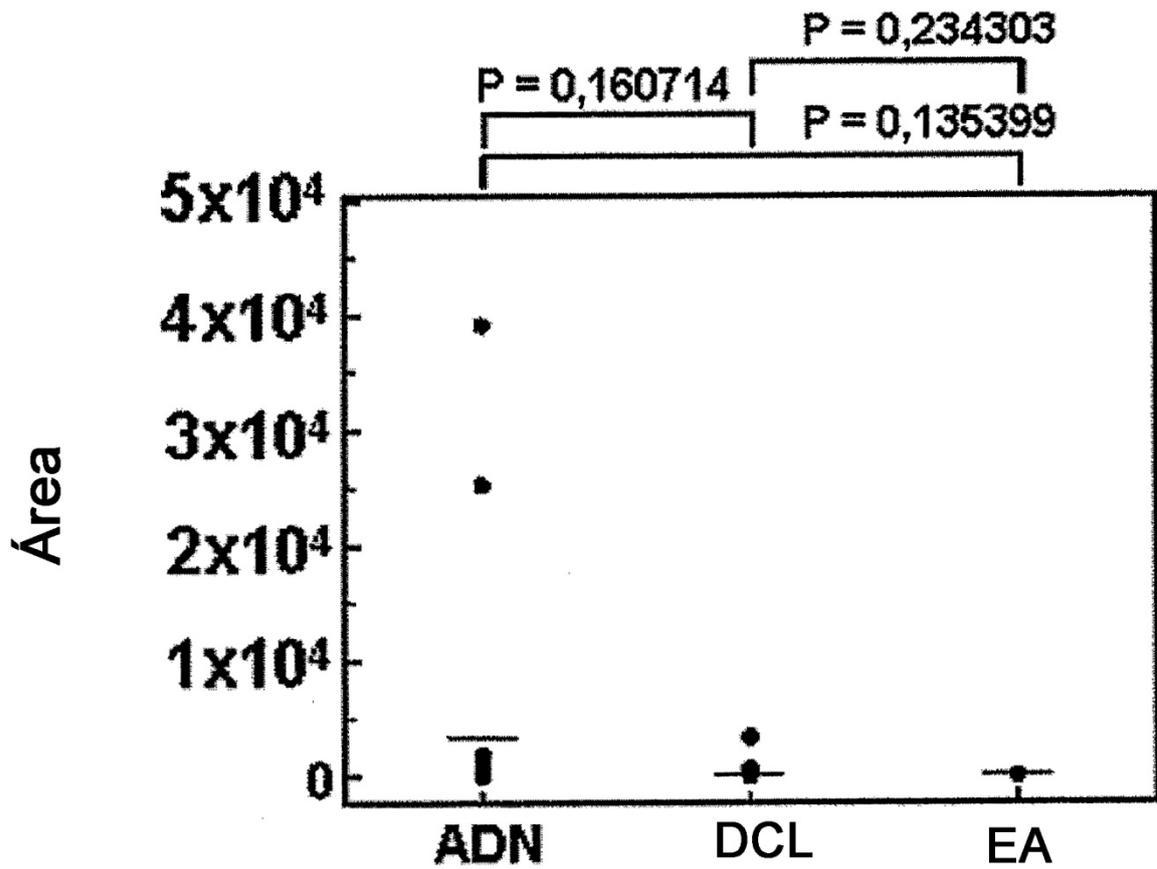
SDVP N-term.



C

CLUS

RFFT N-term.



D

CLUS

RFFT N-term.

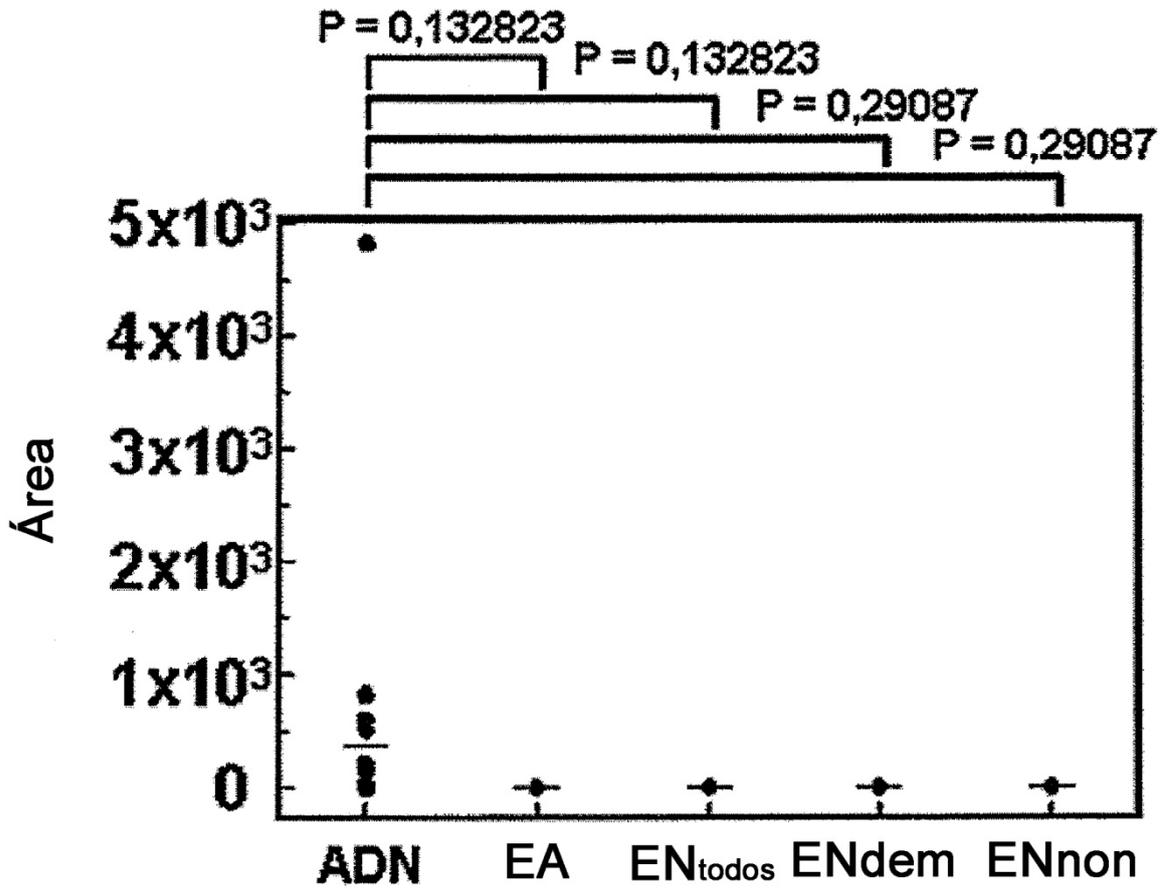
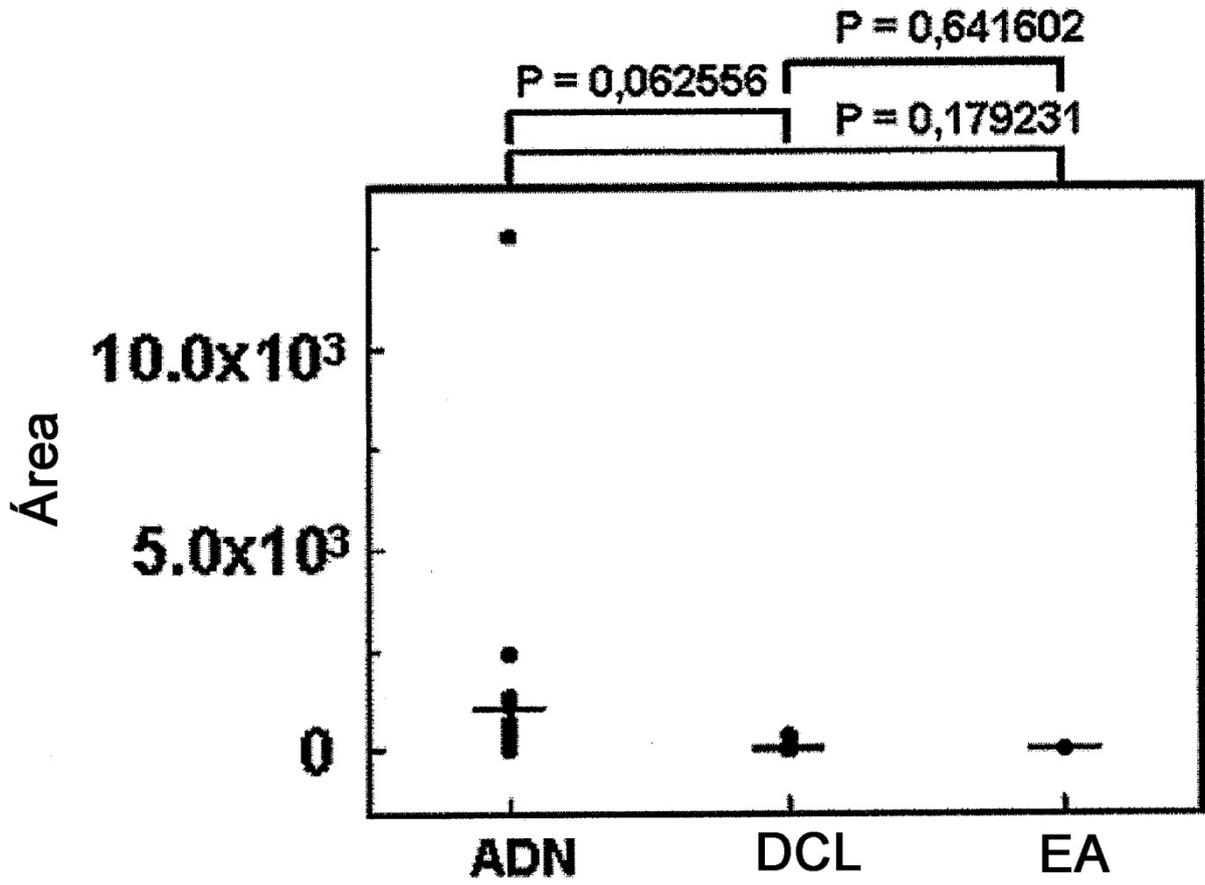


Fig. 10

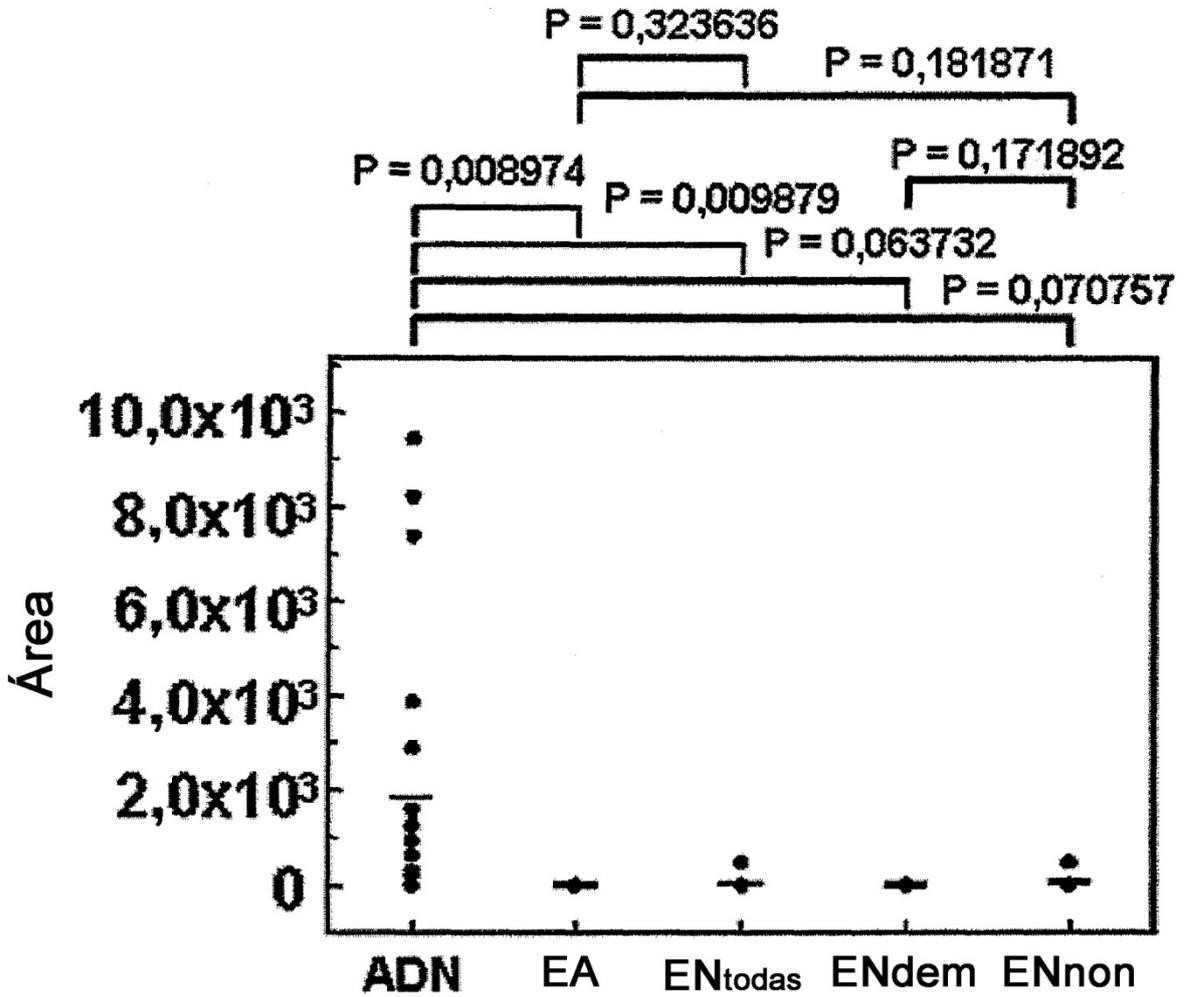
A

EIF3J



B

EIF3J



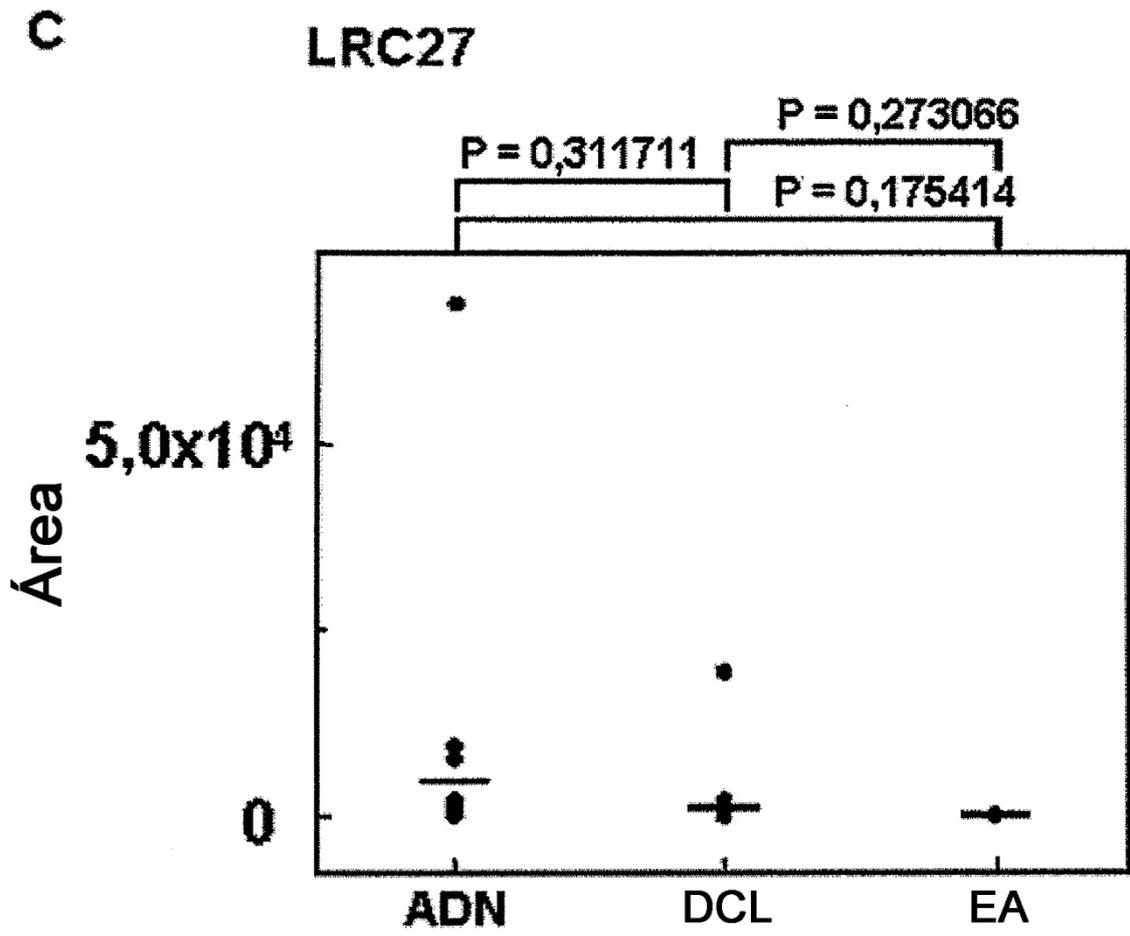
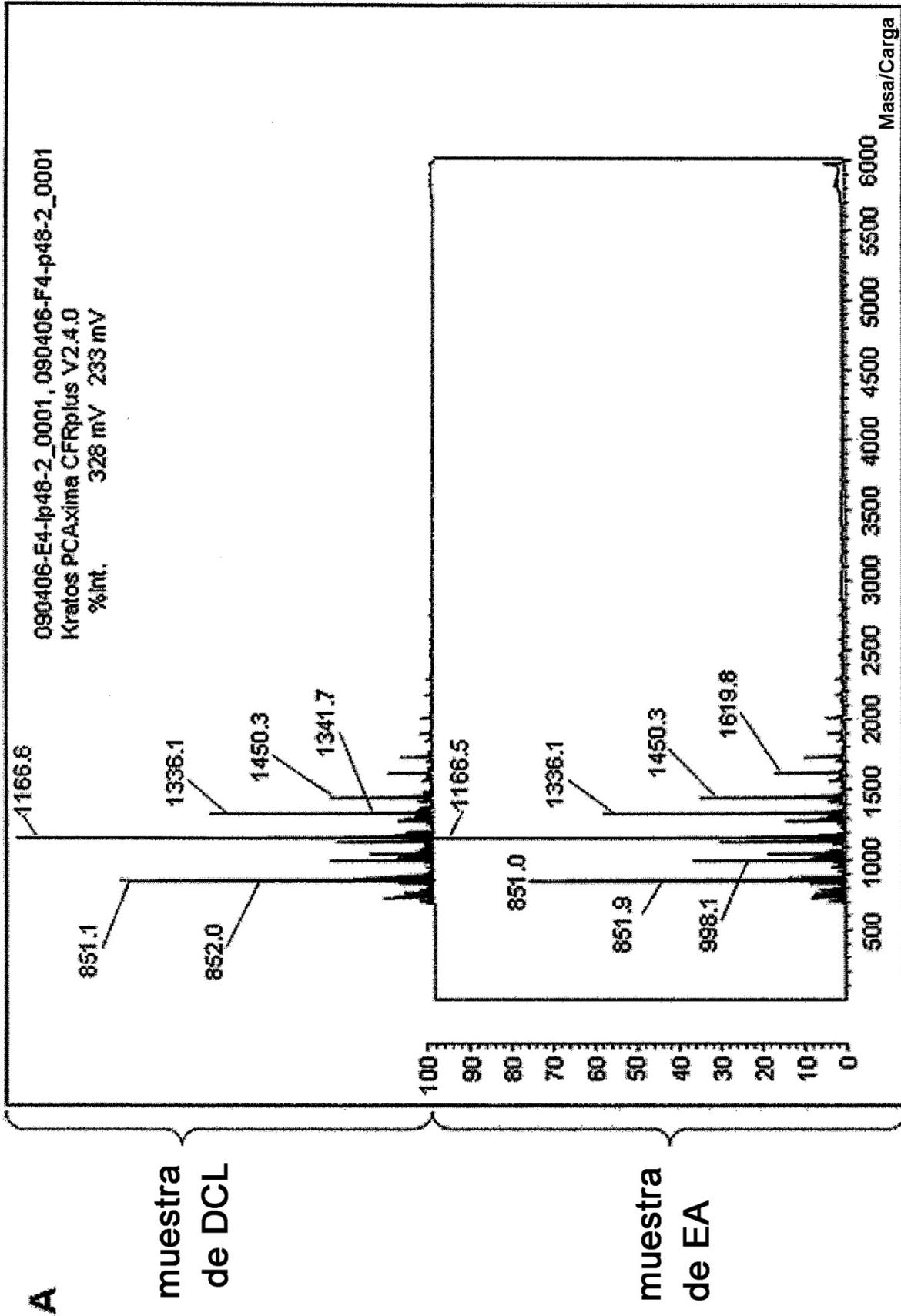


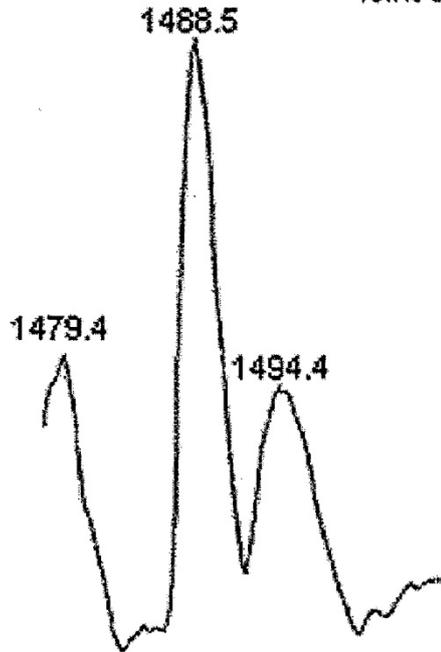
Fig. 11



B

090406-E4-lp48-2_0001, 090406-F4-p48-2_0001
Kratos PCAxima CFRplus V2.4.0
%Int 5.1mV 7.0mV

Muestra
de DCL



Muestra
de EA

