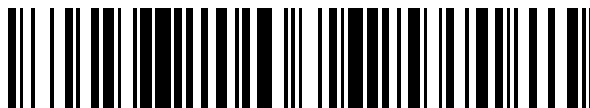


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 684**

21 Número de solicitud: 201431188

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.08.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.03.2016

Fecha de la concesión:

30.01.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.02.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070608

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, 117
28010 Madrid (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (25.0%) y
FUNDACION INSTITUTO DE INVESTIGACION
MARQUES DE VALDECILLA (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SAINZ MAZA, Jesus Vicente y
CRESPO FACORRO, Benedicto**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO DE MONITORIZACIÓN DE TRATAMIENTO ANTIPSICÓTICO**

57 Resumen:

Método de monitorización de tratamiento antipsicótico.

La presente invención se refiere a un método de monitorización de tratamiento antipsicótico y/o de indicación de respuesta al mismo en un sujeto diagnosticado con psicosis que comprende al menos la detección y/o cuantificación de la expresión del gen RPPH1. También se refiere al uso de la expresión del gen RPPH1 como biomarcador para el mismo fin. Además, también se refiere a un kit para la detección de la expresión del gen RPPH1 y el uso del mismo para los fines descritos.

ES 2 562 684 B1

DESCRIPCIÓN

Método de monitorización de tratamiento antipsicótico.

La presente invención se refiere a un método para la monitorización de un tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis que comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen RPPH1. Por lo tanto, la presente invención podría encuadrarse en el campo de la medicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las enfermedades psicóticas, también denominados trastornos psicóticos, presentan rasgos comunes etiopatológicos y sintomáticos, cursando con psicosis. Entre dichas enfermedades destacan la esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas, siendo la esquizofrenia considerada como representativa de este grupo.

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave caracterizada por síntomas positivos (alucinaciones, delirios, alteraciones de conducta) y negativos (afecto aplanado, alogia, anergia, asociabilidad), y un mal funcionamiento cognitivo ya desde las fases iniciales de la enfermedad (Pelayo-Terán JM *et al.* Early Interv. Psychiatry 2008 2: 178-187). Además de esta evidente disparidad psicopatológica con síntomas psicóticos, afectivos, cognitivos, etc., todas estas manifestaciones se asocian con efectos muy negativos sobre el funcionamiento y la personalidad del individuo afectado. El inicio de los síntomas se produce normalmente en la edad adulta joven, con una prevalencia a lo largo de la vida de alrededor del 0,3-0,7%. (van Os J *et al.* Lancet 2009 374(9690): 635-45; van Os J *et al.*, Psychol. Med. 2009 Feb;39(2): 179-95). Generalmente, los primeros síntomas de la enfermedad se producen en la adolescencia o en la edad adulta temprana, y raramente en niños; la edad de presentación se ha calculado entre los 15 y los 35 años (50% por debajo de los 25 años), siendo infrecuente después de los 40 años. La incidencia de esquizofrenia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (1,6:1). Un número considerable de pacientes presenta un grado importante de discapacidad durante los primeros años de evolución de la enfermedad. La expectativa de vida de las personas con la enfermedad se reduce una media de 10 años.

Aunque los síntomas y el desarrollo de la esquizofrenia son variables, en general, las personas afectadas suelen tener condiciones mórbidas adicionales como la depresión mayor y trastornos de ansiedad. Además de todo ello, al ser una enfermedad crónica conlleva un importante deterioro en la calidad de vida del paciente y por extensión también a las familias de las personas afectadas. De este modo la atención a esta patología se considera de máxima relevancia.

Históricamente se ha perseguido demostrar el papel de diversos factores (genéticos, biológicos y ambientales) como causantes o precipitantes de la esquizofrenia; pero ninguna teoría ha obtenido una aceptación plena, de tal manera que las hipótesis actuales defienden la existencia de mecanismos etiopatogénicos multifactoriales. La genética, los factores ambientales, la neurobiología, y procesos psicológicos y sociales son factores que parecen influir de manera necesaria en la aparición de la enfermedad. Los estudios epidemiológicos y genéticos han demostrado que una combinación de factores genéticos y ambientales contribuye a la aparición y desarrollo de la esquizofrenia. Según estudios realizados en parejas de gemelos, hay una transmisión compleja con un fuerte componente hereditario estimado en entre 80% -85% (Tandon R *et al.* Schizophr. Res. 2008 102 (1-3): 1-18; Cardno AG *et al.* Arch. Gen. Psychiatry 1999 Feb;56(2): 162-8). Se ha propuesto un modelo poligénico, con un número indefinido de genes con efecto aditivo, para explicar el componente genético en el desarrollo de la enfermedad.

Dada la ausencia de marcadores específicos definidos el diagnóstico se realiza mediante la observación del comportamiento del paciente y la descripción que el propio paciente hace de sus experiencias. El tratamiento en las etapas iniciales de la enfermedad es crucial para mejorar el pronóstico de la enfermedad. En la actualidad los fármacos antipsicóticos disponibles (con una acción principal de bloqueo de receptores dopaminérgicos) mejoran los síntomas positivos (alucinaciones, delirios, alteraciones de conducta) pero tienen un efecto muy limitado sobre los síntomas negativos (afecto aplanado, abulia, anergia, asocialidad, etc.) y déficits cognitivos (déficits de atención, memoria de trabajo, memoria visual) que sufren los pacientes. A pesar de que la medicación disminuye o mejoran los síntomas positivos solamente el 50-60% de los pacientes presentan una mejoría marcada (respondedores) (Crespo-Facorro B *et al.* *Psychopharmacology* 2012 Jan; 219(1): 225-33). Un inicio temprano de la enfermedad, problemas en la adaptación del individuo previos al inicio de la enfermedad, así como un retraso en el uso de un tratamiento efectivo parece estar relacionado con una peor respuesta al tratamiento (Marshall M *et al.* *Arch. Gen. Psychiatry.* 2005 Sep;62(9): 975-83; Crespo-Facorro B *et al.* *J. Psychiatr. Res.* 2007 Oct;41(8): 659-66). La caracterización de los factores predictivos de una respuesta adecuada al tratamiento farmacológico es una de las áreas importantes para la investigación y el tratamiento de la esquizofrenia. Determinar, antes del tratamiento, la probabilidad de obtener una respuesta favorable al tratamiento neuroléptico (antipsicótico) ayudaría en la práctica clínica para seleccionar tratamientos apropiados y mejorar el pronóstico. Sin embargo, aún no hay indicadores biológicos (biomarcadores) claros que permitan a los médicos predecir la respuesta del paciente individual a los fármacos antipsicóticos. Las razones para el éxito o el fracaso terapéutico de los fármacos antipsicóticos no están claramente establecidas, aunque se postula que la variabilidad de ciertos factores genéticos contribuye a determinar la respuesta que un individuo tendrá al tratamiento antipsicótico.

En relación a la variabilidad de la respuesta clínica al tratamiento con fármacos antipsicóticos, varios estudios han confirmado la importancia de las mutaciones funcionales detectadas en las enzimas metabólicas CYP (Ingelman-Sundberg M *et al.* *Pharmacogenetics* 2000 Feb;10(1): 91-3; Nebert DW *et al.* *Pharmacology* 2000 Sep;61(3): 124-35) y en genes relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica (Zhang JP *et al.* *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2011 Jan;7(1): 9-37). Algunas de estas mutaciones se han asociado con el desarrollo de efectos secundarios y se ha sugerido que se puede utilizar para ajustar las dosis terapéuticas de los fármacos antipsicóticos y anti-depresivos. Las investigaciones que estudian genes relacionados con las vías de neurotransmisores, tradicionalmente implicados con la enfermedad, no han proporcionado grandes progresos para explicar la variabilidad observada en la respuesta al tratamiento con fármacos antipsicóticos. Otros genes y/o otros factores genéticos y genómicos, que aún no se ha caracterizado, pueden contribuir a causar la enfermedad y la respuesta a los fármacos. Con el fin de ser capaz de seleccionar la medicación antipsicótica más adecuada para cada paciente, y para generar terapias nuevas y más eficaces, es necesario identificar los componentes genómicos hoy desconocidos.

Las alteraciones en la expresión y regulación génica pueden explicar los procesos por los que pasa la enfermedad, los mecanismos de acción de los tratamientos y los resultados obtenidos con el tratamiento. Estas alteraciones no son detectables a través de estudios clásicos de ligamiento y asociación genética. El uso de técnicas (secuenciación a gran escala) para medir las diferencias en la expresión génica con gran precisión puede ayudar a discernir los cambios que reflejan alteraciones bioquímicas u otros mecanismos causantes de la patología de la enfermedad (Konradi C. *Brain Res. Rev.* 2005 Dec 1;50(1): 142-55).

Los estudios post-mortem de la expresión génica obtenidos en los cerebros de los pacientes con esquizofrenia se ven afectados por la variación en los niveles de ácido ribonucleico (ARN) dependiendo del fármaco utilizado y el tiempo de recolección de la muestra después de la muerte. Sin embargo, una alternativa viable es el análisis de los niveles de ARN en los

linfocitos, libres de la variabilidad observada en estudios post-mortem (Czermak C *et al.* J. Neuroimmunol. 2004 May;150(1-2): 145-9). Otros trabajos han demostrado que el nivel de expresión de genes que codifican los receptores de neurotransmisores y otras proteínas es similar en linfocitos de sangre periférica y en el sistema nervioso central (Gladkevich A *et al.* Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 2004 May;28(3): 559-76; Glatt SJ *et al.* 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005 Oct 25;102(43): 15533-8). Confirmando esta alternativa, un estudio reciente en linfocitos de sangre periférica mostró que los niveles de ARN del receptor de dopamina 3 (D3) es mayor en los pacientes con esquizofrenia que en los sujetos control, y se ha sugerido el uso de esta medida como un marcador diagnóstico de la enfermedad (Ilani T *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98(2): 625-8; van der Weide J *et al.* Pharmacogenetics 2003 13(3): 169-72). En un estudio de 13 pacientes no tratados, éstos mostraron niveles incrementados expresión del gen codificante del receptor de la dopamina 2 (D2) y modulación de los genes codificantes de los canales de potasio (Zvara A *et al.* Dis. Markers 2005;21(2): 61-9). Otro trabajo que analizaba 5 familias afectadas por la enfermedad y 9 controles utilizando microarrays para 1128 genes expresados en el cerebro, reveló que la expresión de varios receptores de neuropéptidos y proteínas reguladoras se vio alterada en pacientes (Vawter MP *et al.* Schizophr. Res. 2002 Nov 1;58(1): 11-20). Se observó una reducción en la expresión del receptor 7-acetilcolina (CHRNA7) en linfocitos de pacientes en comparación con los niveles medidos en los sujetos control (Perl O *et al.* FASEB J. 2003 Oct;17(13): 1948-50). Estos y otros estudios utilizan microarrays para caracterizar la expresión en esquizofrenia, pero la limitación de los microarrays es su poca reproducibilidad, lo cual ha propiciado su reemplazo por la secuenciación masiva para los análisis de expresión génica en esquizofrenia.

Se hace por lo tanto necesario un método para la monitorización de los tratamientos antipsicóticos así como para la predicción de la respuesta clínica a dicho tratamiento en individuos con psicosis.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se describe un método para la monitorización de tratamientos antipsicóticos así como para indicar la respuesta clínica a dicho tratamiento en individuos con psicosis.

Esta invención identifica nuevos marcadores genéticos que son útiles para monitorizar un tratamiento antipsicótico y/o indican la respuesta favorable o no al tratamiento de pacientes con psicosis, entre ellos, pacientes con esquizofrenia. En la presente invención se identifican genes con expresión diferencial significativa entre individuos con psicosis e individuos control y también entre individuos con psicosis tratados y no tratados con antipsicóticos (casos/controles; medicados/no-medicados). Se han identificación genes, entre los que destaca RPPH1, cuya expresión está alterada debido a los efectos de los fármacos antipsicóticos. Para ello se ha empleado secuenciación a gran escala de ARN mensajero (ARNm) a partir de muestras clínicas sub-divididas en diferentes categorías: "grupo 1: controles sanos; grupo 2: pacientes con enfermedad sin medicación (nunca han recibido tratamiento antipsicóticos alguno) y grupo 3: esos mismo pacientes del grupo 2 tras tres meses de tratamiento y con cambios en su sintomatología clínica. Los perfiles de expresión diferencial realizados han permitido caracterizar nuevos genes implicados en la acción terapéutica de los antipsicóticos que no han sido detectados identificados usando otros métodos, como los de asociación genómica. Entre los genes que se demuestra su utilidad para la monitorización de tratamientos antipsicóticos así como para indicar la respuesta clínica a dicho tratamiento en individuos con psicosis se encuentra el gen RPPH1 y también la combinación de éste con cualquiera de los genes ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la monitorización de un tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis que comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen RPPH1 en una muestra biológica aislada procedente de dicho sujeto antes y después de la administración del tratamiento antipsicótico y/o para indicar la respuesta clínica favorable o no a un tratamiento antipsicótico. En adelante nos referiremos a éste como al “método primero de la invención”.

Se entiende por “monitorización de un tratamiento” a la indicación de si el paciente se está medicando correctamente con dicho tratamiento; i.e. que está siguiendo adecuadamente la medicación pautaada (el abandono del tratamiento es común en estos pacientes).

Se entiende por “indicación de la respuesta clínica” a determinar si el tratamiento antipsicótico tiene una respuesta favorable o no, es decir, que logra mejorar o disminuir los síntomas de la enfermedad o no.

Se entiende por RPPH1 al gen conocido por su número de identificación 85495 (*Gene ID* del *NCBI*) (*Ribonuclease P RNA Component H1*).

Se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se emplean para curar o aliviar una enfermedad. Se entiende por “tratamiento antipsicótico” a las medidas conocidas por el experto en la materia tomadas para paliar la psicosis, preferentemente la administración de fármacos antipsicóticos, como por ejemplo, pero sin limitarse, clozapina (Clorazil®), risperidona (Risperdal®), olanzapina (Zyprexa®), quetiapina (Seroquel®), ziprasidona (Geodon®), aripiprazol (Abilify®), paliperidona (Invega®), asenapina, iloperidona (Zomaril®), zotepina, amisulpride, clorpromazina (Largactil®, Thorapine®), flufenazina (Prolixin®), haloperidol (Aldol®, Serenace®), loxapina (Loxapac®, Loxitane®), perfenazina, pimozida (Orap®) y zuclopentixol (Clopixol®).

En la presente invención el término “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan indistintamente. Preferiblemente el sujeto es un humano.

Se entiende por “psicosis” todo cuadro psicopatológico en el cual aparecen síntomas como alucinaciones, delirios y alteraciones conductuales que se asocian a una alteración del juicio de realidad y sin que se observe alteración del nivel de conciencia.

El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita detectar y/o cuantificar la expresión del gen o los genes del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarnos, a cualquiera de los fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica comprende ARN y/o proteína, preferiblemente ARN mensajero. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido sinovial o linfa. También puede ser una muestra de tejido. La muestra biológica además se puede provenir de extracciones realizadas de forma rutinaria en análisis que se pueden realizar periódicamente a los pacientes. La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca, congelada, fijada, o fijada y embebida en parafina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente los genes son ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

Los genes siguientes son los conocidos por el experto en la materia: ALPL (*alkaline phosphatase, liver/bone/kidney*, referido al gen de número de identificación o *geneID* 249), CRISP3 (*cysteine-rich secretory protein 3, geneID* 10321), ABCA13 (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13, geneID* 154664), CEACAM8 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, geneID* 1088), MMP8 (*matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase), geneID* 4317), OLFM4 (*olfactomedin 4, geneID* 10562), OLR1 (*oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1, geneID* 4973), LTF (*lactotransferrin, geneID* 4057), GPER (*G protein-coupled estrogen receptor 1, geneID* 2852), MIR3198 (*microRNA 3198-1, geneID* 100423025), ADAMTS2 (*ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2, geneID* 9509), UNC45B (*unc-45 homolog B (C. elegans), geneID* 146862), CD177 (*CD177 molecule, geneID* 57126) RFX2 (*regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression), geneID* 5990), CNTNAP3 (*contactin associated protein-like 3, geneID* 79937), y ENTPD2 (*ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2, geneID* 954). Donde los número de identificación (o *geneID*) son los de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

En una realización más preferida del primer aspecto de la invención el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen ALPL. En una realización aún más preferida el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, los genes son CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.

En otra realización más preferida del primer aspecto de la invención el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen ADAMTS2. En una realización aún más preferida, el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen UNC45B. En otra realización aún más preferida, el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2 o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente los genes son CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o la indicación de la respuesta clínica a un tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis que comprende:

- a. detectar y/o cuantificar los niveles de un producto de expresión del gen RPPH1 en una muestra biológica aislada procedente de dicho sujeto antes de la administración del tratamiento;
- b. detectar y/o cuantificar el nivel del producto de expresión del gen descrito en el paso (a) en una muestra biológica aislada procedente del mismo sujeto después de la administración del tratamiento;
- c. comparar los niveles obtenidos en los pasos (a) y (b);
- d. asociar una disminución significativa de la expresión del gen RPPH1 con el seguimiento adecuado del tratamiento antipsicótico y/o con una respuesta favorable al mismo.

En adelante nos referiremos a éste como al “método segundo de la invención”.

El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

Los niveles del producto de expresión en la presente invención pueden estar normalizados previamente.

Se entiende por “respuesta favorable” la reducción significativa, por ejemplo de un 40%, de los síntomas de la psicosis del paciente de acuerdo con la escala *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) (Overall, JE y Gorham, DR (1962) *The Brief Psychiatric Rating Scale. Psychol Rep* 10: 799-812).

Se entiende por “después de la administración del tratamiento” a un tiempo considerado por el experto en la materia como el necesario para que el tratamiento se considere efectivo, por ejemplo tras varios meses de tratamiento, preferiblemente tres meses.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención el método además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión en la etapa (a) y en la etapa (b) es al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente los genes son ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; y donde en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de RPPH1 y de una disminución significativa de la expresión de ALPL, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y/o ENTPD2; y/o un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y/o LTF, o cualquiera de sus combinaciones, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico. Preferiblemente en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de RPPH1, ALPL, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; y un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y LTF, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención el método además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión del gen ALPL; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de ALPL con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico. En una realización aún más preferida el método además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198, o cualquiera de sus combinaciones; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de GPER, MIR3198; o un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 o LTF, o cualquiera de sus combinaciones, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico. Preferiblemente la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) es de los genes CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de GPER y MIR3198; o un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y LTF, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención el método además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión del gen ADAMTS2; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de ADAMTS2 con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico. En una realización aún más preferida el método además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) del nivel de la expresión del gen UNC45B; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de UNC45B con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico. Más preferiblemente además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa

- (b) de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2 o cualquiera de sus combinaciones; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de los genes CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico. Aún más preferiblemente la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) es de los genes CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2 con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
- La detección y/o cuantificación en la presente invención puede realizarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, por ejemplo por secuenciación, amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), *microarray* o SAGE. La detección puede realizarse mediante el empleo de cebadores y/o sondas.
- Por este motivo, en una realización aún más preferida del primer, segundo y tercer aspecto de la invención, la detección y/o cuantificación se realiza mediante secuenciación, PCR, *microarray* o mediante análisis en serie de la expresión génica (SAGE).
- El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación de los nucleótidos de un ácido nucleico molde y de su orden. Las condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente (por ejemplo, Mg^{2+}), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y al menos, un ddNTP (dideoxinucleótidotrifostato), y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.
- El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde. Las condiciones en las cuáles se realiza la amplificación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende al menos un cebador (siendo normalmente dos cebadores), un catión bivalente (por ejemplo, Mg^{2+}), y nucleótidos, generalmente, dNTPs, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y dé lugar a una población de moléculas de ADN complementario generalmente del mismo tamaño.
- La PCR también puede ser PCR cuantitativa en tiempo real.
- El término “ácido nucleico molde” o “molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser amplificada o secuenciada.
- El término “cebador” (también denominado “primer” u “oligo”), como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa. Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

De acuerdo con la presente invención un “cebador” puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

5 El término “microarray” (o “chip”) en la presente invención se refiere un soporte sólido al que está unido el ARN o proteína para el análisis de expresión génica mediante hibridación con sondas o detección por anticuerpos.

10 El término “SAGE” se refiere a la detección y cuantificación de la expresión génica mediante medición de ARN. En la presente invención se pueden utilizar las variantes de SAGE conocidas por el experto en la materia como, por ejemplo, *SuperSAGE*, *MicroSAGE* y *LongSAGE*.

15 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de la expresión del gen RPPH1 como biomarcador de monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o la indicación de la respuesta clínica a dicho tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis.

20 Una realización preferida del tercer aspecto de la invención además comprende el uso de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente los genes son RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

25 Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención además comprende el uso de la expresión del gen ALPL. Más preferiblemente además comprende el uso de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198 o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente los genes son CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.

30 Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención además comprende el uso de la expresión del gen ADAMTS2. Más preferiblemente además comprende el uso de la expresión del gen UNC45B. Aún más preferiblemente además comprende el uso de la expresión al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente de CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

35 En una realización aún más preferida del primer, segundo y tercer aspecto de la invención la psicosis es producida por al menos una de las enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas. Preferiblemente la enfermedad es esquizofrenia.

40 Se entiende por “esquizofrenia” aquella enfermedad en la cual existe alteración sensorio-perceptiva y del pensamiento que dura más de seis meses sin que existan otras alteraciones psicopatológicas (afectivas y de nivel de conciencia) que se asocien a la aparición del cuadro. Su duración debe ser al menos de seis meses (según la Asociación Americana de Psiquiatría, DSM-V).

50 Los términos “trastorno bipolar”, “depresión”, “alcoholismo”, “drogadicción”, “síndrome de abstinencia” son los conocidos por el experto en la materia.

En otra realización aún más preferida del primer, segundo y tercer aspecto de la invención, el tratamiento antipsicótico se selecciona de la lista que comprende: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, zotepina, amisulpride, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, loxapina, perfenazina, pimozida y zuclopentixol.

En otra realización aún más preferida del primer, segundo y tercer aspecto de la invención la expresión es de ARN y/o proteína. El ARN puede ser ARN mensajero (ARNm) o un microARN.

La presente invención también se refiere al uso de la expresión de los genes descritos en la presente invención (RPPH1; RPPH1 y al menos ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 o ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; RPPH1 y ALPL; RPPH1, ALPL y al menos CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 o ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; RPPH1 y ADAMTS2; RPPH1, ADAMTS2 y UNC45B; RPPH1, ADAMTS2, UNC45B y al menos CD177, RFX2, CNTNAP3 o ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; RPPH1, ADAMTS2 y UNC45B; RPPH1, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2) para la evaluación del grado de eficacia y tolerabilidad de fármacos antipsicóticos. La evaluación puede ser realizada *in vitro*, *ex vivo* o en animales de experimentación.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen RPPH1.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención el kit además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente el kit comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de los genes RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención el kit además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen ALPL. En una realización aún más preferida además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198 o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención el kit además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen ADAMTS2. En una realización aún más preferida además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen UNC45B. Más preferiblemente el kit además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente los genes son CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.

En una realización más preferida del cuarto aspecto de la invención el kit consiste en los primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de los genes y combinaciones descritos previamente.

- 5 Un quinto aspecto de la presente invención se refiera al uso del kit del cuarto aspecto de la invención para la monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o la indicación de la respuesta clínica favorable o no a un tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis.
- 10 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención la psicosis es producida por al menos una de las enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas. Preferiblemente la enfermedad es esquizofrenia.
- 15 En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención el tratamiento antipsicótico se selecciona de la lista que comprende: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, zotepina, amisulpride, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, loxapina, perfenazina, pimozida y zuclopentixol.

20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **FIG. 1** Gráfica que representa el nivel de expresión, obtenido mediante secuenciación masiva del transcriptoma, de ADAMTS2, CD177, CNTNAP3, ENTPD2, RFX2 y UNC45B. El nivel de expresión de los casos no tratados "1" fue obtenido en nuestro estudio anterior de un grupo de 36 pacientes con esquizofrenia, los niveles de los casos no tratados "2" corresponde al estudio posterior con los datos de 22 de los pacientes tratados previamente.

EJEMPLOS

35

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de la invención.

40 **Ejemplo 1. Expresión diferencial en 22 pacientes con esquizofrenia sin medicar (nunca han recibido tratamiento previamente) y medicados (esos mismos pacientes tras estar en tratamiento tres meses).**

45 En un estudio previo (Sainz J *et al.* Mol. Psychiatry. 2013 Oct;18(10): 1056-7) se describía la expresión diferencial entre 36 pacientes de esquizofrenia (nunca sometidos a tratamiento) y 40 controles sanos. Se caracterizaron 200 genes con expresión diferencial significativa entre los pacientes de esquizofrenia y los controles. Estos genes están significativamente enriquecidos en siete procesos biológicos categorizados en *Gene Ontology* incluyendo el procesamiento de proteínas, la respuesta inmune innata, la respuesta inflamatoria aguda y la respuesta a heridas. Sin embargo en dicho trabajo no se hace referencia a qué genes son útiles para el seguimiento

50 de un tratamiento antipsicótico o nos indiquen si el paciente está respondiendo a un tratamiento antipsicótico.

En la presente invención se analizó el transcriptoma de 22 de los 36 pacientes de esquizofrenia analizados en dicho estudio previo antes y después de la medicación antipsicótica.

5 El análisis de expresión mediante secuenciación masiva de ARN en muestras de sangre de los 22,278 genes (RefSeqs) analizados reveló que 17 genes tenían una expresión diferencial estadísticamente significativa ($P_{adjValue} < 0,05$, análisis estadístico *DESEQ*) después de corregir por tests múltiples (tabla 1). Los valores P, después de corregir por el número de tests realizados, oscilan entre 0,035 a 6,20E-40.

10 En diez de estos genes la expresión está disminuida en los pacientes medicados mientras que en los restantes siete genes está aumentada [ver tabla 1 columnas *baseMeanA* (sin medicar) y *baseMeanB* (medicados)]. Los genes de expresión disminuida son los genes: RPPH1, ALPL, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; mientras que los genes cuya expresión está aumentada son los genes: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y LTF. Seis genes de estos 17 genes tienen expresión significativamente mayor en esquizofrénicos que en individuos controles según la publicación de Sainz J *et al.* 2013 Mol Psychiatry 18: 1056-1057 (ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2), y además estos 6 genes tienen una expresión significativamente menor después de medicar que antes de medicar. En la tabla 2 y 3 se proporciona la expresión individualizada por paciente.

Tabla 1. Genes con expresión diferencial en pacientes medicados vs. pacientes sin medicar.

Gen	baseMean	(SIN MEDICAR)	baseMeanB(MEDICADO)	foldChange	log2FoldChange	pval	padj
ADAMTS2	24,22518549	43,98127834	4,469092648	0,10161352	-3,29883568	2,99E-44	6,20E-40
CD177	128,083514	186,7383086	69,42871946	0,37179687	-1,42741345	6,68E-15	6,92E-11
CRISP3	117,7190799	68,71958906	166,7185706	2,42607054	1,2786215	5,99E-09	4,14E-05
UNC45B	303,4750803	446,9024815	160,0476792	0,35812663	-1,4814583	9,09E-09	4,71E-05
RPPH1	26,16592678	39,82313298	12,50872059	0,31410689	-1,67067249	3,45E-07	0,00142833
ABCA13	93,49939621	62,71824426	124,2805482	1,98156931	0,98664343	1,87E-06	0,00480316
ALPL	4482,274181	5942,345814	3022,202547	0,50858746	-0,97543221	1,85E-06	0,00480316
CEACAM8	189,9011797	129,4051243	250,3972351	1,93498701	0,95232388	2,20E-06	0,00480316
MMP8	187,4971531	126,0164528	248,9778534	1,97575672	0,98240531	2,25E-06	0,00480316
OLFM4	139,3790734	94,29062918	184,4675175	1,95637169	0,96818049	2,55E-06	0,00480316
OLR1	33,91602638	21,64249091	46,18956184	2,13420729	1,09370031	2,36E-06	0,00480316
LTF	1654,714758	1183,803461	2125,626054	1,79559034	0,84445824	7,89E-06	0,01258022
RFX2	528,5947726	692,3131764	364,8763688	0,52703947	-0,92401709	7,47E-06	0,01258022
CNTNAP3	233,6810577	301,0391332	166,3229821	0,55249622	-0,85596351	1,04E-05	0,01545802
MIR3198	10,97812689	14,93162548	7,024628302	0,47045302	-1,08787743	2,22E-05	0,0307384
GPB	30,59314386	39,09736175	22,08892596	0,56497229	-0,82374799	2,62E-05	0,03390517
ENTPD2	29,60317303	37,18635039	22,01999566	0,59215264	-0,75595898	2,91E-05	0,03543291

Gen: Símbolo del gen; *baseMean*: $(baseMeanA + baseMeanB)/2$; *baseMeanA* (SIN MEDICAR): Media de bases en Medicados; *baseMeanB* (MEDICADO): Media de bases en No Medicados; *foldChange*: $baseMeanB/baseMeanA$; *log2FoldChange*: $\log_2$ del cambio de expresión; *pval*: Valor P; *padj*: Valor P ajustado por el número de análisis. A mayor número de "basemean-" más expresión.

Ejemplo 2. Genes con expresión diferencial en pacientes de esquizofrenia y modulados por antipsicóticos

- 5 De los 17 genes identificados con expresión diferencial (ver ejemplo 1, tabla 1) y comparándolo con los genes identificados con esquizofrenia en Sainz J *et al.* 2013, once de ellos no están relacionados previamente con el diagnóstico de esquizofrenia: RPPH1, ALPL, GPER, CEACAM8, OLR1, LTF, OLFM4, CRISP3, ABCA13, MMP8 y MIR3198 (tabla 2), por lo tanto, a la luz de los resultados encontrados, dicha expresión está moderada por la presencia de los fármacos antipsicóticos en el organismo. Dado que los fármacos antipsicóticos son comunes al
- 10 tratamiento de diversos tipos de psicosis, la regulación de estos genes resulta un indicador fiable del correcto seguimiento del tratamiento por parte de los individuos; la adherencia a dicho seguimiento de la medicación es uno de los mayores problemas en estos pacientes, por lo que estos marcadores son útiles para controlar mejor la evolución de los mismos (tabla 2).

Tabla 2. Pacientes con genes cuya expresión es mayor antes de medicar con antipsicóticos.

	510	511	513	514	515	517	518	519	520	522	523	524	525	604	607	608	609	610	612	613	616	617	Nº+	% +
RPPH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	18	81,81
ALPL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	18	81,81
GPGR	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	17	77,27
CEACAM8	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	31,81
OLR1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	7	31,81
LTF	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	27,27
OLFM4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	22,72
CRISP3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	18,18
ABCA13	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	18,18
MMP8	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	18,18
MIR3198	0	+	-	0	-	+	-	+	-	0	0	0	0	0	+	-	0	0	+	+	0	+	7	31,8

Las columnas desde "510" a "617" reflejan los códigos utilizados para cada uno de los pacientes (con esquizofrenia) analizados. La columna "Nº+" refleja el número de individuos donde la expresión del gen correspondiente es mayor antes de medicar. La columna "%+" indica el porcentaje de individuos cuya expresión es mayor antes de medicar o porcentaje de "+". Los valores "+" de las celdas indican los individuos donde la expresión del gen indicado es mayor antes de medicar.

Los otros seis genes (ADAMTS2, CD177, CNTNAP3, ENTPD2, RFX2, UNC45B) con expresión diferencial son comunes con el documento de Sainz J *et al.* 2013 entre esquizofrénicos sin medicar/medicados, también tienen expresión diferencial en esquizofrénicos sin medicar/controles sanos. Concretamente, en los pacientes seis de los
5 genes que tienen expresión alterada en esquizofrenia, su expresión vuelve a ser revertida a niveles de expresión de sujetos control, cuando toman medicación antipsicótica (tabla 3). Estos 6 genes tienen expresión más alta en pacientes de esquizofrenia sin medicar y al ser medicados con antipsicóticos la expresión se disminuye hasta el nivel de los controles sanos y además su expresión está alterada en individuos con esquizofrenia (ADAMTS2, CD177,
10 CNTNAP3, ENTPD2, RFX2, UNC45B). Estos 6 genes relacionados con esquizofrenia representan una fracción (35,29%) del total de los genes modulados por antipsicóticos del total significativamente más alta de la esperable (Test Chi; Valor P = 1,18971E-50).

Tabla 3. Pacientes con genes relacionados con esquizofrenia cuya expresión es mayor antes de medicar con anti-psicóticos

Símbolo	510	511	513	514	515	517	518	519	520	522	523	524	525	604	607	608	609	610	612	613	616	617	nº	%
ADAMTS2	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	86,36
RFX2	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+	+	+	+	+	+	18	81,81
UNC45B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+		+	+	+			17	77,27
CD177	+				+	+		+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	16	72,72
CNTNAP3	+			+	+	+	+	+	+	+	+						+	+		+	+	+	14	63,63
ENTPD2				+	+		+	+	+	+	+			+	+			+		+	+	+	12	54,54

La columna "símbolo" refleja el nombre oficial del gene las celdas reflejan aquellos casos donde la expresión del gen es mayor en los individuos sin medicar. Las columnas desde "510" a "617" reflejan los códigos utilizados para cada una de los pacientes (esquizofrenia) analizados. La columna "nº+" refleja el número de individuos donde la expresión del gen correspondiente es mayor antes de medicar. El "%" refleja el porcentaje de individuos cuya expresión es mayor antes de medicar, o porcentaje de "+". Los valores "+" en las celdas indican los individuos donde la expresión del gen indicado es mayor antes de medicar.

Existe un gran desconocimiento de qué origina un brote psicótico en un paciente, y en determinados casos la remisión del brote psicótico se realiza sin intervención farmacológica. La esquizofrenia es considerada como una combinación de variantes genéticas que en cada caso individual origina la enfermedad de forma única. Es por ello que el análisis de los valores de los genes con expresión diferencial característicos de la esquizofrenia (tabla 3) debe acompañarse de la valoración de los genes alterados por la medicación (tabla 2) para poder identificar mejor la adhesión del paciente al tratamiento. En este sentido los genes de la tabla 2 que mejor identifican los pacientes que siguen el tratamiento son RPPH1 y ALPL (con un 81% de los pacientes identificados con estos genes). La combinación de ALPL con cualquiera de los genes identificados en la tabla 3 (i.e. ADAMTS2, CD177, CNTNAP3, ENTPD2, RFX2 y UNC45B) es la menos informativa ya que hay, al menos, un paciente (identificado como 511) que sólo tendría valores mayores antes de la medicación posteriormente en uno de los genes (UNC45B) y no en los demás, cuando dicha disminución provocada por el tratamiento es clave en todos estos genes: RPPH1, ALPL, ADAMTS2, CD177, CNTNAP3, ENTPD2, RFX2 y UNC45B (tabla 1); por tanto la combinación ALPL, ADAMTS2, CD177, CNTNAP3, ENTPD2, RFX2 y UNC45B podría subrepresentar el seguimiento del tratamiento y sus efectos en el progreso del paciente esquizofrénico. La combinación RPPH1 junto con los genes identificados en la tabla 3 (ADAMTS2, CD177, CNTNAP3, ENTPD2, RFX2 y UNC45B), sin embargo, sí identifica al menos dos genes cuya expresión disminuye con el tratamiento mejorando la información obtenida con la combinación mencionada anteriormente; además el *pval* de RPPH1 es menor que el ALPL (ver tabla 1, *pval* RPPH1 = 3,45E-07 vs *pval* ALPL = 1,85E-06) lo que indica que la expresión diferencial de RPPH1 antes y después de la medicación es estadísticamente más significativa que la diferencia de expresión de ALPL.

Por lo tanto, en la presente invención se demuestra la utilidad de la expresión del gen RPPH1 para la monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o para conocer la respuesta clínica a un tratamiento antipsicótico, así como la de su combinación con la expresión de los genes descritos en la presente invención para el mismo fin.

Ejemplo 3. Genes con expresión revertida por los antipsicóticos

Los seis genes comunes en las listas de expresión diferencial en caso/control y medicado/no medicado están significativamente sobre-expresados en los pacientes de esquizofrenia y la medicación disminuye la expresión hasta niveles de expresión de individuo no afectado por esquizofrenia (tabla 4) (figura 1).

Tabla 4. Genes con expresión revertida por la medicación.

Gen	<i>baseMean</i> Controles	<i>BaseMean</i> No med	<i>BaseMean</i> No med2	<i>baseMeanMed</i>
ADAMTS2	4,40	45,83	43,98	4,47
UNC45B	132,73	336,93	446,90	160,05
CD177	87,52	170,70	186,74	69,43
ENTPD2	18,76	35,71	37,19	22,02
CNTNAP3	161,69	304,89	301,04	166,32
RFX2	370,65	642,28	692,31	364,88

BaseMean es la media de expresión de los individuos del grupo. *BaseMean No med* es la media de expresión en individuos no medicados en el estudio caso/control. *BaseMean No med2* es la media de expresión en individuos no medicados en el estudio medicado/no medicado. *BaseMeanMed* es la media de expresión en individuos medicados

Ejemplo 4. Enriquecimiento en categorías de Gene Ontology

Para determinar los procesos biológicos, la función molecular y la localización celular de los genes con expresión diferencial encontrados en la presente invención se utilizaron los datos del repositorio *The Gene Ontology*, conocido por el experto en la materia, mediante la herramienta *FatiGO* de la suite informática *Babelomics*. De los 17 genes con expresión diferencial entre medicados y no medicados, cuatro de ellos (ENTPD2, MMP8, ADAMTS2, CRISP3) localizan en las categorías “extracellular matrix” y “proteinaceous extracellular matrix”. La fracción de genes en ambas categorías representa el 23,53% del total que comparada con las fracciones esperables, 1,49% y 1,59%, muestra un enriquecimiento significativo de genes en estas categorías, relacionadas con la comunicación inter-celular, después de corregir por los múltiples análisis realizados (valor *Padj* = 0,01541).

Ejemplo 5. Funciones y relación con enfermedad de los genes con expresión diferencial

Analizando el “Genome Wide Association Studies Catalog” (GWAS, a fecha 18 de enero 2013) encontramos que 6 de los 17 genes encontrados en el análisis medicados/no medicados (LTF, OLFM4, ADAMTS2, RFX2, ALPL, ABCA13) han sido asociados a 17 rasgos/enfermedades que incluyen esquizofrenia y trastorno bipolar (OLFM4 y RFX2; estos genes aparecen en el catálogo de GWAS asociados a esquizofrenia en la categoría “mapped”, pero no en la categoría “reported”), tiempo de aparición del déficit de atención con hiperactividad (ADAMTS2), isquemia (OLFM4, ADAMTS2), respuesta a anfetaminas (ABCA13), SIDA (LTF) y respuesta inmune a la vacuna del ántrax (OLFM4), entre otros (Troyer JL *et al.* J. Infect. Dis. 2011 203: 1491-502; Lasky-Su J *et al.* Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2008 147B: 1355-8; Wang KS *et al.* Schizophr. Res. 2010 124: 192-9; Pajewski NM *et al.* Vaccine 2012 30: 4778-84; Hart AB *et al.* PLoS One. 2012 7(8):e42646; Matarín M *et al.* Lancet Neurol. 2007 6:414-20; Arning A *et al.* Blood. 2012 120: 5231-6) pero nunca antes se había descrito su relación con los fármacos antipsicóticos o con el tratamiento de la esquizofrenia. Por lo tanto, son nuevos genes y nuevas vías biológicas que se encuentran alteradas en las enfermedades psicóticas y que son revertidos por el tratamiento.

El catálogo de GWAS incluye asociaciones a rasgos/enfermedades para 4.828 genes de los 22.278 que hemos analizado en nuestros estudios de expresión, o una fracción equivalente al 21,67% del total. La fracción de genes con expresión diferencial anotados en GWAS es algo mayor (35,29%), por tanto observamos un enriquecimiento, aunque no significativo, de genes asociados a enfermedades en los genes cuya expresión es modulada por los antipsicóticos.

De acuerdo con la literatura científica depositada en el *GeneRIF repository* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), ABCA13 ha sido relacionado con la esquizofrenia (aunque no se ha relacionado con el efecto terapéutico de los fármacos antipsicóticos), trastorno bipolar y depresión (Knight HM *et al.* Am. J. Hum. Genet. 2009 85(6):833-46) y los genes LTF y OLR1 con el sistema inmune en varios estudios (Guillén C *et al.* J Immunol. 2002 168(8):3950-7; Huang D *et al.* J. Cardiovasc. Pharmacol. 2012 60: 133-9), LTF con la respuesta a heridas (Engelmayer J *et al.* J. Surg. Res. 2008 149(2): 278-86), y ALPL, GPER, LTF, MMP8, OLR1 y CRISP3 han sido relacionados con la respuesta inflamatoria en varios estudios (Filipowicz R *et al.* Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2013 8(1): 26-32; Chakrabarti S *et al.* PLoS One. 2012 7(12):e52357; Weinberg AD *et al.* Immunol Rev. 2011 244(1): 218-31; Quintero PA *et al.* J. Immunol. 2010 184(3):1575-88; Lubrano V *et al.* Lipids. 2008 43(10): 945-50; Plager DA *et al.* PLoS One. 2010 5(7):e11450). Es decir, 6 de los 17 genes con expresión diferencial en el análisis de expresión diferencial entre medicados/no medicados están relacionados con el sistema inmune, el sistema inflamatorio y la respuesta a heridas. Esto representa el 35,29% de los genes modulados por los antipsicóticos mientras que la fracción de genes humanos relacionados con estas categorías en GeneRIF es el 19,78% (3.083 genes de los 15.589 genes humanos anotados) lo muestra un enriquecimiento en genes de los sistemas de defensa e

inflamación modulados por los antipsicóticos, lo que implica una relación de estos genes de respuesta inmune también en la esquizofrenia.

MATERIALES Y MÉTODOS

5

Diseño del estudio

Los datos de la presente investigación se obtuvieron a partir de un programa de intervención epidemiológica continua y longitudinal de tres años de un primer episodio de psicosis (PAFIP) que se llevó a cabo en la clínica ambulatoria y la unidad de hospitalización del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, (Santander, España). Cumpliendo con las normas internacionales de ética en la investigación, este programa fue aprobado por la junta de revisión institucional local. Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y sus familias por escrito el consentimiento informado para ser incluidos en el PAFIP.

15 Los pacientes reclutados en este estudio fueron obtenidos de una muestra consecutiva de pacientes psicóticos no afectivos inscritos en el programa de primer episodio de psicosis (PAFIP) a partir de mayo 2010 hasta mayo 2012. Los pacientes tenían que cumplir los siguientes criterios: 1) edad 15-60 años, 2) vivir en la zona de captación, 3) que fuera su primer episodio de psicosis 4) no haber sido tratados nunca con medicamentos antipsicóticos, 5) 20 cumplir con los criterios DSM-IV para psicosis de duración breve, trastorno esquizofreniforme, esquizofrenia, o trastorno esquizoafectivo, 6) que hayan comprendido la naturaleza del estudio y firmado un documento de consentimiento informado.

Los pacientes fueron excluidos por alguna de las siguientes razones: 1) cumplir los criterios DSM-IV para la dependencia de drogas, 2) cumplir los criterios DSM-IV para el retraso mental, 3) tener una enfermedad grave. Los diagnósticos fueron confirmados según los criterios DSM-IV, utilizando la Entrevista Clínica Estructurada para el DSM-IV (SCID-I) (First, MB et al.(2001) *Structured Clinical Interview for Dsm-Iv-Tr Axis I Disorders-Non-Patient Edition. Biometrics Research Department: New York*) por un psiquiatra experto después de 6 meses del primer 30 contacto.

Adicionalmente, un grupo de personas sanas (N=40) fueron también analizadas para servir como grupo control. Las personas sanas no tenían historia de enfermedad psiquiátrica (incluyendo la ausencia de dependencia a drogas), neurológica o medica general: No recibían tratamiento farmacológico alguno de manera habitual como mostraba la versión abreviada de la 35 escala *Comprehensive Assessment of Symptoms and History*(CASH) (Andreasen NC, et al. *The Comprehensive Assessment of Symptoms and History (CASH) an instrument for assessing diagnosis and psychopathology. Arch Gen Psychiatry* 1992;49:615–623). La ausencia de historia familiar de psicosis entre los familiares de primer grado fue también evaluada por la 40 historia médica y entrevista familiar. Después de una descripción detallada del protocolo los controles sanos dieron su consentimiento escrito para participar en el estudio acorde a las norma éticas internacionales. Las características demográficas y clínicas de los pacientes y controles se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes y controles estudiados en el análisis caso/control

Características	Total (N=76)		Pacientes (N=36)		Controles (N=40)		F(df=1)	p
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
Edad admisión, años	31,4	9,1	29,7	9,7	33	8,3	2,562	0,114
Edad inicio psicosis, año			29,1	9,6	-			
Duración enfermedad, m			8	10,4	-			
Duración psicosis, m			5,6	9,2	-			
Diagnóstico	N	%	N	%	N	%	χ^2 (df=1)	p
Esquizofrenia			5	16,1	-			
Otros diagnósticos spectrum esquizofrenia			26	83,9	-			
Trast. Psicótico breve			9	29	-			
Trast. Psicótico no especificado			1	3,2	-			
Trast. Esquizofreniforme			14	45,2	-			
Trast. esquizoafectivo			1	3,2	-			
Trast. delirante			1	3,2	-			
Sexo(varón)	40	52,6	19	52,8	21	52,5	0,001	0,981
Caucásicos(sí)	73	96,1	33	91,7	40	100,0	3,470	0,062
Nivel educacional (elemental)	29	40,8	14	45,2	15	37,5	0,424	0,515
Uso Tabaco (sí)	46	60,5	21	58,3	25	62,5	0,138	0,711
Uso Cannabis (sí)	28	36,8	15	41,7	13	32,5	0,684	0,408
Uso Alcohol (sí)	54	71,1	22	61,1	32	80	3,287	0,07
Otras drogas (sí)	11	14,5	7	19,4	4	10	1,365	0,243

Trast, trastorno. Mean, media. SD, desviación estándar. M, meses. F(df=1), análisis estadístico y grados de libertad.

5

En el momento basal (momento inicial) de obtención de muestras de sangre, los pacientes analizados no habían recibido previamente ninguna dosis de tratamiento antipsicótico, aunque ciertas medicaciones concomitantes (lormetazepam y clonazepam) fueron permitidas para el tratamiento de la agitación, la ansiedad y/o insomnio.

10

Los fármacos antipsicóticos (risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona y aripiprazol) con los que los pacientes fueron tratados son antipsicóticos de segunda generación que se caracterizan por tener una acción común de antagonismo a nivel de los receptores 5-HT₂ y D₂ y representan a la mayoría de los antipsicóticos de segunda generación que se utilizan en la actualidad. Una acción relativamente potente de antagonismo de receptores de serotonina 5-HT_{2A} asociado a un antagonismo más leve de receptores dopaminérgicos D₂ es la característica central común de los antipsicóticos de segunda generación. El único de esos fármacos utilizados que tiene una acción diferenciada es el aripiprazol que tiene una acción asociada de agonista parcial de los receptores dopaminérgicos D₂ de alta afinidad. (Schwartz TL y Stahl SM CNS Neurosci. Ther. 2011 17(2): 110-7).

15

20

Las escalas de gravedad "Clinical Global Impression (CGI) scale" (Guy W (1976) ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology. US Department of Health, Education, and Welfare publication ADM 76338. Washington, DC: National Institute of Mental Health; 217–222), "Brief Psychiatric Rating Scale" (BPRS), (Overall, J.E. y Gorham, D.R. (1962) The Brief Psychiatric Rating Scale. *Psychol Rep* 10: 799-812), "Scale for the Assessment of Positive symptoms" (SAPS), "Scale for the Assessment of Negative symptoms" (SANS) (Andreasen, N.C. (1983) Scale for the Assessment of Negative Symptoms (Sans). University of Iowa: Iowa City.; Andreasen, N.C. (1984) Scale for the Assessment of Positive Symptoms (Saps). University of Iowa: Iowa City, "Calgary Depression Scale for Schizophrenia" (CDSS) (Addington, D., Addington, J., and Maticka-Tyndale, E. (1993) Assessing Depression in Schizophrenia: The Calgary Depression Scale. *Br J Psychiatry Suppl*: 39-44.) y "Young Mania Rating Scale (YMRS)" (Young, R.C., Biggs, J.T., Ziegler, V.E., and Meyer, D.A. (1978) A Rating Scale for Mania: Reliability, Validity and Sensitivity. *Br J Psychiatry* 133: 429-435) se utilizaron para evaluar la sintomatología clínica. El mismo psiquiatra (Benedicto Crespo Facorro) completó todas las evaluaciones clínicas para asegurar la fiabilidad de las evaluaciones clínicas. La gravedad de la psicopatología al inicio del estudio se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Psicopatología de los 22 pacientes medicados, utilizados en el estudio medicado/no medicado, en el momento basal y a los tres meses y descripción de los cambios en la gravedad de los síntomas.

	Total		Protocolo		Cambio			
	(N=22)		(N=13)		(N=9)		F	
Variable	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	df=1,21	p
CGI								
Basal	6,0	0,8	5,7	0,9	6,3	0,5	4,058	0,058
3 meses	2,3	1,1	2,5	1,1	2,1	1,2	0,500	0,488
Cambio a los 3 meses desde basal	-3,6	1,6	-3,2	1,7	-4,2	1,4	2,097	0,163
Cambio a los 3 meses desde basal			-3,7	0,3	-3,6	0,4	0,005	0,945
BPRS								
Basal	53,0	9,1	51,7	8,8	54,9	9,7	0,643	0,432
3 meses	28,7	3,9	29,5	4,4	27,4	2,7	1,579	0,223
Cambio a los 3 meses desde basal	-24,3	10,2	-22,2	10,0	-27,4	10,1	1,472	0,239
Cambio a los 3 meses desde basal			-23,5	1,1	-25,5	1,3	1,406	0,250
SANS								
Basal	5,8	5,7	5,8	6,5	5,8	4,6	0,000	0,997
3 meses	4,0	3,7	3,4	3,0	4,9	4,5	0,879	0,360
Cambio a los 3 meses desde basal	-1,8	6,9	-2,4	7,6	-0,9	6,0	0,244	0,626
Cambio a los 3 meses desde basal			-2,4	1,1	-0,9	1,3	0,835	0,372
SAPS								
Basal	12,0	3,6	11,8	3,5	12,3	3,8	0,094	0,762
3 meses	0,4	1,0	0,4	1,0	0,3	1,0	0,015	0,905
Cambio a los 3 meses desde basal	-11,7	3,9	-11,5	4,1	-12,0	3,8	0,098	0,758
Cambio a los 3 meses			-11,7	0,3	-11,7	0,3	0,004	0,953

	Total		Protocolo		Cambio			
	(N=22)		(N=13)		(N=9)		F	
Variable	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	df=1,21	p
desde basal								
Dimensión positiva								
Basal	6,3	2,4	5,8	1,9	7,0	2,9	1,461	0,241
3 meses	0,3	0,8	0,3	0,8	0,3	1,0	0,005	0,946
Cambio a los 3 meses desde basal	-6,0	2,4	-5,5	2,3	-6,7	2,6	1,318	0,265
Cambio a los 3 meses desde basal			-5,9	0,2	-6,0	0,3	0,002	0,964
Dimensión negativa								
Basal	4,7	5,2	4,5	5,5	5,0	5,0	0,055	0,817
3 meses	3,5	3,2	2,9	2,4	4,2	4,2	0,845	0,369
Cambio a los 3 meses desde basal	-1,2	6,0	-1,5	6,2	-0,8	6,1	0,081	0,779
Cambio a los 3 meses desde basal			-1,8	0,9	-0,5	1,1	0,792	0,385
Dimensión desorganizada								
Basal	5,8	2,8	6,1	2,7	5,3	3,0	0,365	0,552
3 meses	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0	0,0	0,682	0,419
Cambio a los 3 meses desde basal	-5,7	2,8	-6,0	2,8	-5,3	3,0	0,281	0,602
Cambio a los 3 meses desde basal			-6,0	0,8	-5,3	1,0	0,281	0,602
CDSS								
Basal	2,0	3,1	1,2	2,5	3,0	3,7	1,806	0,194
3 meses	1,4	3,6	2,3	4,6	0,0	0,0	2,277	0,147
Cambio a los 3 meses desde basal	-0,6	5,3	1,1	5,7	-3,0	3,7	3,558	0,074
Cambio a los 3 meses desde basal			0,2	1,0	-1,8	1,2	1,526	0,232
Escala Mania Young								
Basal	10,9	6,7	10,5	7,3	11,6	6,2	0,135	0,718
3 meses	0,4	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0	0,020	0,890
Cambio a los 3 meses desde basal	-10,5	6,9	-10,1	7,3	-11,1	6,5	0,116	0,737
Cambio a los 3 meses desde basal			-10,5	0,3	-10,5	0,3	0,025	0,875

BPRS: *Brief Psychiatric Rating Scale*; CDSS: *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*; SANS: *Scale of the Assessment of Negative Symptoms*; SAPS: *Scale of the Assessment of Positive Symptom*; CGI: *Clinical Global Impression*; Mean, media. SD, desviación estándar.

5

Evaluaciones de laboratorio.

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron en las mismas condiciones con las personas (pacientes y controles) en ayuno y se recogieron entre 08:00-10:00 a.m. Este protocolo de extracción fue similar en la extracción inicial (basal) y a los tres meses después. Los pacientes

estaban sin tratamiento antipsicótico en el momento de la extracción de sangre del momento basal.

Extracción de ARN.

- 5 El ARN total fue extraído a partir de sangre usando el sistema “*Tempus™ Blood RNA Tube*” con “*Tempus™ Spin RNA Isolation Kit* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA)”, utilizando los protocolos del fabricante. Para definir los perfiles de expresión, un factor clave es que el ARN esté lo más intacto posible, es decir con la menor degradación posible. Para seleccionar ARN de buena calidad, se obtuvo el “RNA IntegrityNumber” (RIN) utilizando un Bioanalyzer
10 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Las muestras con un RIN de $\geq 6,9$ fueron seleccionadas. El conjunto de las muestras seleccionadas tienen RINs que van desde 6,9 hasta 9,4 con una media de 8,4.

ARN secuenciación de próxima generación (“next generación sequencing”).

- 15 Las secuencias (lecturas) de fragmentos únicos (“single-end”) de 35 nucleótidos se obtuvieron usando la plataforma de secuenciación masiva GenomeAnalyzerIIx (Illumina Inc.). Las secuencias obtenidas se filtraron utilizando criterios de calidad (fiabilidad de la lectura de cada base proporcionada por el software de la plataforma usada, *IlluminaIIx*). Pasaron los filtros de calidad una media de 76% de las lecturas obtenidas. Las lecturas de secuencia que pasaron
20 los filtros de calidad fueron alineadas con el genoma humano de referencia [*hg19, February 2009 human reference sequence (GRCh37), Genome Reference Consortium*] obtenido de UCSC Genome Bioinformatics. La alineación de las lecturas se realizó utilizando el paquete informático *Illumina Casava 1.8.1*, con un software específicamente configurado para procesar los datos de RNA-Seq. La longitud de las secuencias leídas varía entre 35 pares de bases (bp)
25 a 38bp, por lo que la alineación se configuró para enmascarar las secuencias hasta obtener una longitud uniforme de 35 nucleótidos. Este enmascaramiento se hizo con el fin de evitar los sesgos de alineamiento en el genoma que hemos observado cuando las secuencias analizadas variaban de longitud.

Análisis estadístico de expresión diferencial.

- Se utilizó la herramienta Bedtools 2.15.0 (“bedtoolscoverage”) para computar la cantidad de lecturas (secuencias) asignada a cada gen. El paquete DESeq 1.9.6 (Anders S y Huber JS Genome Biology 2010 11:R106)) para R en Bioconductor se utilizó para analizar la expresión
35 diferencial de los genes humanos de referencia (22.278 RefSeqs) según el número computado de secuencias obtenidas para cada gen. Se utilizó como método de ajuste la configuración “fit-only”. Casava 1.8.1 se utilizó para calcular los RPKMs (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas en el genoma de referencia). Los valores de RPKM permiten comparar los datos de expresión de genes obtenidos en experimentos diferentes y de diferentes genes al
40 estar normalizados.

Validación de los datos de expresión mediante QRT-PCR.

- Con el fin de validar los datos de expresión obtenidos por RNA-Seq, se realizó QRT-PCR
45 (“Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR”) en 10 genes seleccionados con muestras de 30 pacientes seleccionados al azar (15 casos y 15 controles). Se utilizaron sondas TaqMan pre-diseñadas (Life Technologies®) siguiendo las instrucciones del fabricante para los genes LAMP3 (Hs00180880_m1), RFX2 (Hs01100925_m1), CTAG2 (Hs00535628_m1), GPR128 (Hs00262184_m1), IFI27 (Hs01086373_g1), ADAMTS2 (Hs01029111_m1), BRS3
50 (Hs00179951_m1), MSLN (Hs00245879_m1), RSAD2 (Hs00369813_m1) y IFI144L (Hs00119115_m1), utilizando el gen GAPDH (Hs02758991_g1) como control interno. La relación de expresión obtenida a partir de cada gen en comparación con el control del gen “housekeeping” utilizado como control (GAPDH) se comparó, en cada muestra, con la relación de los mismos genes calculados a partir de los datos de RNA-Seq. Esta comparación se realizó

- 5 calculando el coeficiente de correlación lineal producto-momento de Pearson entre los datos obtenidos en las dos plataformas (RNA-seq y QTR-PCR) utilizando el paquete estadístico Libre Office. En promedio, se obtuvo un coeficiente de correlación de 87,15% entre los datos obtenidos con las dos tecnologías, con relaciones de correlación de genes individuales que varían de 75% (CTAG2) a 99,9% (MSLN). Se han observado menores tasas de correlación de los genes poco expresados, probablemente debido a una menor sensibilidad de la plataforma de QRT-PCR en comparación con la de RNA-Seq. Aparte de esto, el alto grado de correlación observada entre los datos de QRT-PCR y de RNA-Seq apoya los datos de expresión obtenidos en la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de obtención de datos útiles para la monitorización de un tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis que comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen RPPH1 en una muestra biológica aislada procedente de dicho sujeto antes y después de la administración del tratamiento antipsicótico y/o para indicar la respuesta clínica a un tratamiento antipsicótico.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 que además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 que además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen ALPL.
- 20 4. Método según la reivindicación 3 que además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198, o cualquiera de sus combinaciones.
- 25 5. Método según la reivindicación 4 donde los genes son CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.
- 30 6. Método según la reivindicación 1 que además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen ADAMTS2.
- 35 7. Método según la reivindicación 6 que además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión del gen UNC45B.
- 40 8. Método según la reivindicación 7 que además comprende la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2 o cualquiera de sus combinaciones.
- 45 9. Método según la reivindicación 8 donde los genes son CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
- 50 10. Método según la reivindicación 2 donde los genes son ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la psicosis es producida por al menos una de las enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el tratamiento antipsicótico se selecciona de la lista que comprende: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, zotepina, amisulpride, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, loxapina, perfenazina, pimozida, ziprasidone y zuclopentixol.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la expresión es de ARN y/o proteína.
- 5 14. Método *in vitro* para la monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o la indicación de la respuesta clínica a dicho tratamiento en un sujeto diagnosticado con psicosis que comprende:
- a. detectar y/o cuantificar los niveles de un producto de expresión del gen RPPH1 en una muestra biológica aislada procedente de dicho sujeto antes de la administración del tratamiento;
 - 10 b. detectar y/o cuantificar el nivel del producto de expresión del gen descrito en el paso (a) en una muestra biológica aislada procedente del mismo sujeto después de la administración del tratamiento;
 - c. comparar los niveles obtenidos en los pasos (a) y (b);
 - 15 d. asociar una disminución significativa de la expresión del gen RPPH1 con el seguimiento adecuado del tratamiento antipsicótico y/o con una respuesta favorable al mismo.
- 20 15. Método según la reivindicación 14 donde además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de ALPL, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y/o ENTPD2; y/o un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y/o LTF, o cualquiera de sus combinaciones, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
- 25 16. Método según la reivindicación 14 que además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión del gen ALPL; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de ALPL con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
- 30 17. Método según la reivindicación 16 que además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198 o cualquiera de sus combinaciones; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de GPER, MIR3198; o un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 o LTF, o cualquiera de sus combinaciones, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
- 35 40 18. Método según la reivindicación 17 donde la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) es de los genes CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de GPER y MIR3198; o un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y LTF, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
- 45 19. Método según la reivindicación 14 que además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión del gen ADAMTS2; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de ADAMTS2 con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
- 50

20. Método según la reivindicación 19 que además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) del nivel de la expresión del gen UNC45B; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de UNC45B con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
21. Método según la reivindicación 20 que además comprende la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2 o cualquiera de sus combinaciones; y en el paso (d) la asociación de una disminución significativa de la expresión de los genes CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
22. Método según la reivindicación 21 donde la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) es de los genes CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2 con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
23. Método según la reivindicación 14 donde la detección y/o cuantificación en la etapa (a) y en la etapa (b) es de los genes RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; y en el paso (d) se asocia una disminución significativa de la expresión de RPPH1, ALPL, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2; y un aumento significativo de la expresión de CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1 y LTF, con el seguimiento del tratamiento y/o una respuesta favorable al tratamiento antipsicótico.
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23 donde la psicosis es producida por al menos una de las enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas.
25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24 donde el tratamiento antipsicótico se selecciona de la lista que comprende: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, zotepina, amisulpride, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, loxapina, perfenazina, pimozida y zuclopentixol.
26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 donde la expresión es de ARN mensajero y/o proteína.
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26 donde la detección y/o cuantificación se realiza mediante secuenciación, PCR, microarray o SAGE.
28. Uso de la expresión del gen RPPH1 como biomarcador de monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o la indicación de la respuesta clínica a dicho tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis.
29. Uso según la reivindicación 28 que además comprende el uso de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones.
30. Uso según la reivindicación 29 donde el gen es ALPL.

31. Uso según la reivindicación 30 que además comprende el uso de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198 o cualquiera de sus combinaciones.
32. Uso según la reivindicación 31 donde los genes son CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.
33. Uso según la reivindicación 29 donde el gen es ADAMTS2.
34. Uso según la reivindicación 33 que además comprende el uso de la expresión del gen UNC45B.
35. Uso según la reivindicación 34 que además comprende el uso de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones.
36. Uso según la reivindicación 35 donde los genes son CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
37. Uso según la reivindicación 29 donde los genes son ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
38. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37 donde la psicosis es producida por al menos una de las enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas.
39. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 38 donde el tratamiento antipsicótico se selecciona de la lista que comprende: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, zotepina, amisulpride, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, loxapina, perfenazina, pimozida y zuclopentixol.
40. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 39 donde la expresión es de ARN y/o proteína.
41. Kit que comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen RPPH1.
42. Kit según la reivindicación 41 que además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones.
43. Kit según la reivindicación 42 donde el gen es ALPL.
44. Kit según la reivindicación 43 que además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198 o cualquiera de sus combinaciones.

45. Kit según la reivindicación 44 donde los genes son CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.
- 5 46. Kit según la reivindicación 41 que consiste en primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER y MIR3198.
- 10 47. Kit según la reivindicación 42 donde el gen es ADAMTS2.
48. Kit según la reivindicación 47 que además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen UNC45B.
- 15 49. Kit según la reivindicación 48 que además comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de al menos uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2, o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 50. Kit según la reivindicación 49 donde los genes son CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
51. Kit según la reivindicación 41 que consiste en primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de los genes que se seleccionan de la lista que comprende: RPPH1, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
- 25 52. Kit según la reivindicación 42 que comprende primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de los genes son RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
- 30 53. Kit según la reivindicación 41 que consiste en primers, sondas o anticuerpos específicos para la detección y/o cuantificación de la expresión de los genes son RPPH1, ALPL, CRISP3, ABCA13, CEACAM8, MMP8, OLFM4, OLR1, LTF, GPER, MIR3198, ADAMTS2, UNC45B, CD177, RFX2, CNTNAP3 y ENTPD2.
- 35 54. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 53 para la monitorización de un tratamiento antipsicótico y/o la indicación de la respuesta clínica a dicho tratamiento antipsicótico en un sujeto diagnosticado con psicosis.
- 40 55. Uso según la reivindicación 54 donde la psicosis es producida por al menos una de las enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, alcoholismo, drogadicción y síndrome de abstinencia de alcohol o drogas.
- 45 56. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 54 a 55 donde el tratamiento antipsicótico se selecciona de la lista que comprende: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol, paliperidona, asenapina, iloperidona, zotepina, amisulpride, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, loxapina, perfenazina, pimozida y zuclopentixol.

FIG. 1

