

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 199**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2014 PCT/IB2014/062299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14203164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2014 E 14739556 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3011344**

54 Título: **Biomarcadores para respuesta inflamatoria**

30 Prioridad:

**17.06.2013 GB 201310734**

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

**08.03.2021**

73 Titular/es:

**MEIER, UTE-CHRISTIANE (100.0%)**

**Eislerstr 27**

**91717 Wassertruedingen, DE**

72 Inventor/es:

**MEIER, UTE-CHRISTIANE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 810 199 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

Biomarcadores para respuesta inflamatoria

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un ensayo de biomarcador combinatorio para evaluar procesos inflamatorios/inmunológicos, particularmente pero no exclusivamente, en esquizofrenia y/o esclerosis múltiple.

## 10 Antecedentes de la invención

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico severo crónico que afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. Sus principales características clínicas incluyen trastornos del pensamiento, alucinaciones auditivas y visuales, delirios, retraimiento social, falta de motivación y disfunción cognitiva. Su etiología es desconocida, pero ahora está demostrando ser multifactorial, con diversas contribuciones genéticas y ambientales. La identificación de los factores de riesgo debe contener pistas importantes para nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. Se han propuesto varias teorías etiológicas que involucran procesos de desarrollo o neurodegenerativos, alteraciones de neurotransmisores, infecciones, disfunción inmune y/o mecanismos autoinmunes (1).

20 La evidencia de las contribuciones del sistema inmune proviene de estudios de asociación de todo el genoma que encuentran asociación con la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la esquizofrenia (2).

25 La infección es uno de los presuntos factores de riesgo de la esquizofrenia. La primera respuesta a la infección es levantada por el sistema inmune innato y la inflamación es una parte clave. Las respuestas inmunes innatas comprenden varias reacciones que aíslan y destruyen el patógeno invasor. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales se expresan en las células presentadoras de antígenos como lo propuso Janeway en 1989 (12). Los receptores incluyen receptores de tipo Toll (TLRs), receptores de tipo de gen inducible por ácido retinoico (RIG-I) y de dominio de oligomerización de nucleósidos (NOD). TLR-3, -7 y -9 reconocen patrones microbianos dentro de las células infectadas, mientras que TLR-2, -4 y -5 reconocen patrones bacterianos en las superficies celulares. Una vez estimulados, estos receptores activan vías de señalización, las cuales inician la secreción de quimiocinas/citocinas innatas y ayudan a levantar respuestas antipatógenas adaptativas adaptadas con éxito.

35 Las infecciones cerebrales en la primera infancia aumentan el riesgo de esquizofrenia ~5-veces (4, 5). Incluso durante el embarazo, particularmente en el segundo trimestre, las infecciones se correlacionan con un aumento del riesgo de la descendencia más adelante en la vida (5, 6). Se han estudiado varias infecciones durante el embarazo, tales como la rubéola, la gripe y el toxoplasma (7). Inyectar ratones embarazados con ADN sintético bicatenario poli I:C, para simular infecciones virales/ respuestas de interferón, y el lipopolisacárido (LPS), un componente altamente inflamatorio de las paredes celulares bacterianas, provocó cambios morfológicos y de comportamiento característicos del cerebro en la esquizofrenia (8-11); sin embargo, los mecanismos subyacentes de este cambio no se entienden completamente.

45 Curiosamente, la exposición fetal a la quimiocina innata IL-8, que es parte de la fase aguda de la respuesta innata, se correlacionó significativamente con el riesgo de esquizofrenia en la descendencia (13). Además, los niveles de IL-8 en las madres durante el segundo trimestre del embarazo se correlacionaron significativamente con un aumento del riesgo de esquizofrenia en un estudio prospectivo de cohorte de nacimiento (14). La exposición fetal a la IL-8 elevada desencadenó alteraciones neuroanatómicas estructurales, por ejemplo, aumentos significativos en el líquido cefalorraquídeo ventricular, y una disminución significativa de los volúmenes de la corteza cingulada entorrinal izquierda y posterior derecha (15). Los niveles elevados de IL-8 también se han descrito en pacientes esquizofrénicos no tratados *ex vivo* y tras la estimulación con LPS (16).

50 Es conocido que la IL-8 induce la expresión de la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) *in vitro* (17), cambios que están implicados en la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular y también en la esclerosis múltiple, el cáncer y enfermedades cardíacas. Un análisis reciente de múltiples analitos de colecciones de controles de casos encontró niveles elevados de MMP-9 en la esquizofrenia, los cuales no fueron alterados por el tratamiento neuroléptico y pueden por lo tanto representar un marcador de "rasgo" (18). Además, estudios de genotipado recientes mostraron asociaciones con un polimorfismo funcional (-1562C/T) del gen de MMP-9 en la esquizofrenia (19), el cual se confirmó en una cohorte China (20), aunque no en un estudio de asociación basado en la familia (21). Curiosamente, el mismo polimorfismo de MMP-9 puede también influir en la susceptibilidad de la EM, donde los niveles séricos de MMP-9 se correlacionan con la actividad de la enfermedad documentada por IRM en la enfermedad remitente-recurrente (EMRR).

60 El sistema proteolítico extracelular comprende metaloproteinasas y sus inhibidores de tejido endógeno (TIMPs). Algunas MMPs pueden procesar varias de las proteínas involucradas en la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo (22). La MMP-9 regula la plasticidad sináptica en el hipocampo *in vitro* (23,24), y la relación de TIMP-1 y MMP-9 según se informa, modula los procesos de aprendizaje y de memoria (25). También se han descrito niveles plasmáticos alterados de MMP-9 en la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular (26). Curiosamente, el mismo polimorfismo de MMP-9 también influyó en la susceptibilidad de la EM (27), donde los niveles séricos de MMP-9 se

correlacionaron con la actividad de la enfermedad documentada por IRM en la enfermedad remitente-recurrente (EMRR) (28).

La MMP-9 puede también jugar un papel en la defensa contra patógenos, donde la estimulación con poli I:C conduce a una regulación positiva significativa de los niveles de MMP-9 en las células epiteliales (29). Además, la MMP-9, y el TIMP-1 fueron significativamente más altos en pacientes con encefalitis por HHV-6 (30). Los niveles de MMP-9 se correlacionan también con el daño hepático progresivo en la infección por VHB y VHC (31). Además, la MMP-9 es fundamental para la fagocitosis bacteriana efectiva de *Streptococcus pneumoniae* y la generación de especies reactivas del oxígeno en los neutrófilos (32). La estimulación del receptor tipo Toll-4 con LPS bacteriano aumenta la expresión de MMP-9 en fibroblastos (33).

Es de particular interés el hallazgo de que la expresión, secreción y actividad del gen de MMP-9 es inhibida significativamente por la vitamina D en la infección por M tuberculosis (34). La vitamina D es producida por la exposición de la piel a la radiación solar ultravioleta B (UVB). La UVB convierte los precursores del 7-deshidrocolesterol en previtamina D3, la cual cambia espontáneamente a vitamina D3 (VitD3). La VitD3 se convierte en 25-hidroxivitamina D3 (25-OHD) y en su forma activa final, 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25-OHD). Curiosamente, hay un exceso de pacientes con esquizofrenia nacidos de enero a marzo (35, 36), lo cual podría reflejar hipovitaminosis-D materna (37, 38) y/o infección materna durante el embarazo. Un estudio adicional también identificó una variación >10 veces en la prevalencia de la esquizofrenia y una tendencia a que la prevalencia aumente con la latitud (39), al igual que para la EM, donde la VitD3 también está implicada (40). Un reciente estudio de controles de casos en muestras de sangre neonatal identificó una asociación significativa entre el estado neonatal de la vitamina D y el riesgo de esquizofrenia (41). En mujeres adultas, el alto consumo de vitamina D y pescado se correlacionó con un índice más bajo de síntomas de tipo psicóticos (42). Sin embargo, no se detectó ninguna asociación significativa entre cuatro polimorfismos de un solo nucleótido del receptor de vitamina D y el riesgo de esquizofrenia (43). Sin embargo, se informaron bajos niveles séricos de 25-OHD entre una cohorte de pacientes ambulatorios psiquiátricos en Suecia. En la cohorte de esquizofrenia sueca, la mediana de 25-OHD fue de 45 nmol/l, considerablemente más baja que la informada para sujetos suecos sanos. Solo el 14,5 % tenía niveles recomendados de 25-OHD (>75 nmol/l). La hipovitaminosis-D estuvo presente en el 56,5 % de los pacientes con esquizofrenia (niveles < 50 nmol/l) (44).

Actualmente, el diagnóstico de esquizofrenia se basa en la capacidad de un clínico para hacer inferencias sobre las experiencias internas de los pacientes, ya que no hay pruebas de laboratorio disponibles que ayuden en el diagnóstico, informen estrategias de tratamiento o ayuden a monitorear y predecir la respuesta al tratamiento. Las comorbilidades perjudiciales incluyen el síndrome metabólico, otros factores de riesgo cardiovascular y la diabetes mellitus. El descubrimiento de biomarcadores eficientes y las técnicas de ensayo son, por lo tanto, primordiales y facilitarán el desarrollo futuro de estrategias de estratificación de pacientes y medicina personalizada.

Los tratamientos actuales tienen como objeto las vías neurotransmisoras en el cerebro. Los antipsicóticos actúan predominantemente como antagonistas de los receptores de dopamina D2, y tienen como objeto los síntomas pero no la causa subyacente de la enfermedad. Sin embargo, el mecanismo exacto que conduce a la disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia sigue siendo desconocido. Hallazgos recientes destacan el papel de la inflamación como un jugador importante en la desregulación del sistema neurotransmisor. Como las infecciones bacterianas y virales son desencadenantes de respuestas inflamatorias, son posibles responsables en al menos un subgrupo de pacientes con esquizofrenia.

Kim T.N. y otros: "Relationships between sarcopenic obesity and insulin resistance, inflammation, and vitamin D status: the Korean Sarcopenic Obesity Study", Clin.Endocrinol., vol.78, no.4, 12 de abril del 2013, páginas 525-532, describe que la inflamación y la deficiencia de vitamina D están asociadas con la obesidad sarcopénica. Azali P. y otros: "Low serum levels of vitamin D in idiopathic inflammatory myopathies", Ann. Rheum. Dis., vol. 72, no. 4, 19 de septiembre del 2012, páginas 512-516, correlaciona los bajos niveles de vitamina D en pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas. El documento WO 2012/129650 A1 describe un inmunoensayo de flujo lateral para detectar vitaminas y Coussens A. K. y otros: "Vitamin D accelerates resolution of inflammatory responses during tuberculosis treatment", Proc. Nat. Acad. Sci., vol. 109, no. 38, 18 de septiembre del 2012, páginas 15449-15454, se refiere a un estudio que propone la suplementación con vitamina D como una terapia complementaria en la TB. El documento US 2012/195984 A1 se ocupa del diagnóstico y el tratamiento del estado esquizofrénico prodermal e incluye el cribado de marcadores genéticos, que detallan los inhibidores de la MMP-9 para restaurar la función de la barrera hematoencefálica.

#### Resumen de la invención

Los inventores han identificado un conjunto de analitos como candidatos de firmas de biomarcadores sanguíneos para la esquizofrenia, los cuales reflejan la existencia de respuestas inmunes/inflamatorias desreguladas. Sorprendentemente, han encontrado interdependencia entre la respuesta inflamatoria en la esquizofrenia y la 25-hidroxivitamina D y que los bajos niveles séricos de 25-hidroxivitamina-D3 pueden usarse como un biomarcador de inflamación. Además, reivindican que medir varios biomarcadores inflamatorios putativos simultáneamente como un biomarcador combinatorio de inflamación activa puede mejorar significativamente la precisión diagnóstica de la prueba en comparación con la medición de un solo biomarcador y ofrecer estrategias de intervención. Los marcadores de analito pueden comprender citocinas/quimiocinas adicionales y metabolitos de la vitamina D.

Esta invención destaca una prueba nueva y única para monitorear el estado inflamatorio periférico mediante el uso de un biomarcador combinatorio.

5 La presente invención permitirá monitorear la inflamación periférica y los medios de modulación en la esquizofrenia y sus comorbilidades seleccionadas del grupo que consiste en trastornos del estado de ánimo, autismo, enfermedad de Alzheimer, demencia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, diabetes, síndrome metabólico, asma, psoriasis, colitis ulcerativa, enfermedades cardíacas y cáncer.

10 En el primer aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para la predicción, pronóstico o diagnóstico de una respuesta inflamatoria asociada con una enfermedad o afección particular en un sujeto, siendo el método como se define en la reivindicación 1 y sus reivindicaciones dependientes.

El método *in vitro* se usa para monitorear la inflamación periférica.

15 El método comprende determinar en la muestra biológica el nivel de al menos un biomarcador además del nivel de vitamina D3, preferentemente 25-hidroxivitamina D3, y comparar el nivel de al menos un biomarcador con un nivel de control del biomarcador para determinar una predicción, pronóstico o diagnóstico positivo o negativo de dicha respuesta inflamatoria. En particular, al menos un biomarcador es una citocina o una quimiocina seleccionada de la quimiocina innata (IL-8) y de la metaloproteinasa de matriz (MMP-9).

20 Una modalidad específica de la invención proporciona un método para monitorear la actividad/aparición de comorbilidades de la enfermedad en la esquizofrenia que comprende medir el nivel de vitamina D3, especialmente de 25-hidroxivitamina D3 en una muestra biológica de un sujeto en combinación con los niveles de uno o ambos, IL-8 y MMP-9, en la muestra biológica.

25 El nivel de 25-hidroxivitamina D3 indicativo de un diagnóstico positivo es igual a o menor que 75 nmol/l, preferentemente igual a o menor que 50 nmol/l. El nivel de IL-8 es al menos 20 pg/ml, preferentemente superior a 32 pg/ml en comparación con un nivel de control inferior a estos valores. El nivel de MMP-9 es superior a 700 ng/ml, preferentemente superior a 705 ng/ml en comparación con un nivel de control inferior a estos valores.

30 La invención también proporciona un método para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar una respuesta inflamatoria, en particular la esquizofrenia como se define en la reivindicación 7 mediante la comparación de los niveles de 25-hidroxi vitamina D3 en una muestra biológica del sujeto, en combinación con los niveles de al menos un biomarcador en donde al menos un biomarcador se selecciona de IL-8 y MMP-9 en la muestra biológica antes, durante y después del tratamiento, en donde dicho tratamiento se considera eficiente si el nivel de 25-hidroxivitamina D3 y/o IL-8 o MMP-9 se acerca a un nivel de control predeterminado para la 25-hidroxivitamina y/o IL-8 y/o MMP-9.

35 Debe apreciarse que la determinación de un tratamiento eficiente se reconoce mediante la medición de un nivel de 25-hidroxivitamina D3 que sea superior a 50 nmol/l, preferentemente superior a 75 nmol/l con relación a una medición inicial anterior al tratamiento fuera de este intervalo. El nivel de IL-8 es preferentemente inferior a 20 pg/ml y el nivel de MMP-9 es preferentemente de 700 ng/ml, preferentemente en el intervalo de 169-705 ng/ml, con relación a una medición inicial anterior al tratamiento que está fuera de este intervalo

45 Otra modalidad específica de la invención también proporciona un método para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar la esquizofrenia/monitoreando la aparición de comorbilidades en un sujeto mediante la comparación de los niveles de 25-hidroxi vitamina D3 en una muestra biológica del sujeto en combinación con los niveles de IL-8 y MMP-9 en la muestra biológica antes, durante y después del tratamiento.

50 La presente invención también proporciona un método para establecer un perfil de biomarcadores de referencia como se define en la reivindicación 10 que comprende las etapas de (a) determinar una cantidad de vitamina D3, preferentemente 25-hidroxivitamina D3 y al menos un biomarcador seleccionado de IL-8 y MMP-9 en una muestra obtenida de un sujeto sano o de un sujeto que tiene una respuesta inflamatoria periférica, especialmente con esquizofrenia o esclerosis múltiple; y (b) almacenar la cantidad de 25-hidroxivitamina D3 y del biomarcador seleccionado en un perfil de biomarcadores de referencia respectivamente para sujetos sanos o sujetos que tienen una respuesta inflamatoria, especialmente que tienen esquizofrenia o esclerosis múltiple.

55 La invención también se refiere a un kit que comprende medios para detectar el nivel de 25-hidroxivitamina D3 en una muestra biológica de un sujeto, preferentemente en combinación con el nivel de al menos un biomarcador en donde al menos un biomarcador se selecciona de IL-8 y MMP-9. El kit comprende reactivos de detección apropiados y opcionalmente aditivos adicionales.

Una modalidad de la invención proporciona un kit que comprende medios para detectar el nivel de 25-hidroxivitamina D3 en una muestra biológica de un sujeto en combinación con los niveles de IL-8 y MMP-9 en la muestra biológica.

65 En modalidades particulares, la muestra biológica comprende suero, plasma, sangre total, saliva u orina. Con mayor preferencia, la muestra comprende suero.

El sujeto es preferentemente un sujeto humano y puede o no ser diagnosticado con una afección asociada con una respuesta inflamatoria periférica, en particular esquizofrenia.

La invención proporciona una justificación para disminuir la regulación de la respuesta inflamatoria mediante la suplementación con vitamina D3 para contrarrestar la hipovitaminosis-D. La inflamación es una parte importante del sistema inmune innato y en un subgrupo de pacientes con esquizofrenia, debe considerarse la activación de la inmunidad innata por patógenos tales como virus y bacterias, y puede ser objeto de tratamiento antibiótico o antiviral.

Breve descripción de los dibujos.

La invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y figuras adjuntas, en los cuales:

Figura 1: Niveles séricos de IL-8 en 16 pacientes con esquizofrenia (SCZ) y 10 controles sanos (HC), determinados por ELISA. La diferencia entre ellos fue significativa (29,17 +/- 17,66 pg/ml versus 1,88 +/- 0,52 pg/ml,  $p = 0,0001$ ). Los datos se expresan como medias +/- SEM;  $p$ -los valores se derivan de una prueba de Mann-Whitney de dos colas.

Figura 2: Niveles séricos de MMP-9 en pacientes con SCZ y controles sanos (1200 +/- 120 ng/ml versus 130 +/- 18 ng/ml,  $p = 0,0001$ ), determinado por ELISA. Los datos se expresan como medias +/- SEM;  $p$ -los valores se derivan de la prueba de Mann-Whitney de dos colas.

Figura 3: Correlación de los niveles de MMP-9 y 25-hidroxivitamina D3 en 16 pacientes con SCZ. La línea de regresión es mostrada. El análisis por la correlación de Spearman arrojó un valor  $r$  de -0,58 con  $p = 0,017$ .

Descripción detallada de la invención.

Ejemplo 1: Investigación observando niveles significativamente más altos de IL-8 en pacientes con esquizofrenia que en controles sanos.

Para investigar el papel potencial del sistema inmune innato en la fisiopatología de la esquizofrenia, probamos una firma(s) inmune/inflamatoria innata alterada en la sangre de los pacientes. Como habíamos encontrado niveles elevados de IL-8 en el suero de pacientes con esclerosis múltiple (EM), y en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (45) (el modelo animal de EM), estábamos interesados en el estado de IL-8 de pacientes con esquizofrenia (SCZ). Medimos los niveles séricos de IL-8 en pacientes con SCZ y controles sanos (Figura 1). Fueron significativamente más altos en pacientes con SCZ que en controles sanos ( $p < 0,05$ ).

Ejemplo 2: Investigaciones observaron MMP-9 significativamente elevados en pacientes con SCZ que en controles sanos.

Inicialmente comparamos los niveles de MMP-9 en el suero de pacientes con SCZ y en controles sanos. Como es mostrado en la Figura 2, el nivel de MMP-9 en pacientes con SCZ fue significativamente más alto que en controles sanos (Figura 2,  $p < 0,05$ ).

Ejemplo 3: Investigación sobre la hipovitaminosis-D en pacientes con SCZ.

Luego evaluamos el estado de la 25-hidroxivitamina-D3 de pacientes con SCZ. Su nivel recomendado es superior a 75 nmol/l (44) y los niveles por debajo de 50 nmol/l indican deficiencia (46). Todos excepto un paciente eran deficientes en 25-hidroxivitamina-D3 (93,75 %).

Ejemplo 4: Investigaciones observaron una correlación inversa significativa de los niveles de 25-hidroxivitamina D3 y MMP-9 en pacientes con SCZ.

En controles sanos, la 25-hidroxivitamina-D se correlacionó inversamente con la MMP-9 circulante (47). En nuestros pacientes con SCZ, también encontramos una correlación inversa significativa (Figura 3) - aunque no con los niveles de IL-8 (datos no mostrados).

Ensayos de cribado:

Medición de los niveles de MMP-9 e IL-8:

Los ELISA de IL-8/CXCL8 y MMP-9 (Qantikine Immunoassays R&D Systems, Reino Unido) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de SCZ y de control sanas se procesaron en la misma placa para controlar la variación interensayo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y las muestras se procesaron en dos ensayos por separado. La lectura de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de placas Reader BioTek Synergy HT.

Medición de los niveles de la 25-hidroxivitamina D3:

Los niveles séricos de la 25-hidroxivitamina D3 se midieron mediante cromatografía líquida por dilución de isótopos con espectrometría de masas en tándem tal como se describió anteriormente (48).

Análisis estadístico

Usamos GraphPad Prism (versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.) para todos los análisis estadísticos. Todos los análisis realizados usaron pruebas no paramétricas, incluyendo las pruebas de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre los grupos y el intervalo de correlaciones Spearman. *P*-Los valores menores de o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Referencias citadas.

1. Bown AaP, P. The Origins of Schizophrenia. Nueva York, Chichester, West Sussex: Columbia University Press, 2012.
2. Moises HW, Yang L, Kristbjarnarson H, y otros. An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Nat Genet* 1995;11:321-324.
3. Koponen H, Rantakallio P, Veijola J, Jones P, Jokelainen J, Isohanni M. Childhood central nervous system infections and risk for schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004;254:9-13.
4. Gattaz WF, Abrahao AL, Foccacia R. Childhood meningitis, brain maturation and the risk of psychosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004;254:23-26.
5. Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Bernstein D, Yolken RH. Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58:1032-1037.
6. Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Wagner RL, Yolken RH. Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain Behav Immun* 2001;15:411-420.
7. Brown AS. Exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia. *Front Psychiatry* 2011;2:63.
8. Zuckerman L, Weiner I. Post-pubertal emergence of disrupted latent inhibition following prenatal immune activation. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;169:308-313.
9. Meyer U, Feldon J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 2012;62:1308-1321.
10. Baharoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull* 2012;38:444-456.
11. Bitanirwe BK, Peleg-Raibstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:2462-2478.
12. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216. Epub 2001 Oct 2004.
13. Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, y otros. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:774-780.
14. Brown AS, Hooton J, Schaefer CA, y otros. Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry* 2004;161:889-895.
15. Ellman LM, Deicken RF, Vinogradov S, y otros. Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. *Schizophr Res* 2010;121:46-54.
16. Reale M, Patruno A, De Lutiis MA, y otros. Dysregulation of chemo-cytokine production in schizophrenic patients versus healthy controls. *BMC Neurosci* 2011;12:13.
17. Thirumangalakudi L, Yin L, Rao HV, Grammas P. IL-8 induces expression of matrix metalloproteinases, cell cycle and pro-apoptotic proteins, and cell death in cultured neurons. *J Alzheimers Dis* 2007;11:305-311.
18. Domenici E, Wille DR, Tozzi F, y otros. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS one* 2010;5:e9166.

19. Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Kaczmarek L, Hauser J. The-1562 C/T polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 gene is not associated with cognitive performance in healthy participants. *Psychiatr Genet* 2009;19:277-278.
- 5 20. Han H, He X, Tang J, y otros. The C(-1562)T polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with schizophrenia in China. *Psychiatry Res* 2011;190:163-164.
21. Groszewska A, Kapelski P, Skibinska M, Hauser J. Family based association study of MMP-9 gene-1562C>T polymorphism in schizophrenia. *Psychiatr Pol* 2011;45:317-324.
- 10 22. Ethell IM, Ethell DW. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 2007;85:2813-2823.
23. Bozdagi O, Nagy V, Kwei KT, Huntley GW. In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J Neurophysiol* 2007;98:334-344.
- 15 24. Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, y otros. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* 2006;26:1923-1934.
- 20 25. Chaillan FA, Rivera S, Marchetti E, y otros. Involvement of tissue inhibition of metalloproteinases-1 in learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 2006;173:191-198.
26. Lorenzl S, Buerger K, Hampel H, Beal MF. Profiles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in plasma of patients with dementia. *Int Psychogeriatr* 2008;20:67-76.
- 25 27. La Russa A, Cittadella R, De Marco EV, y otros. Single nucleotide polymorphism in the MMP-9 gene is associated with susceptibility to develop multiple sclerosis in an Italian case-control study. *J Neuroimmunol* 2010;225:175-179.
28. Waubant E, Goodkin DE, Gee L, y otros. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53:1397-1401.
- 30 29. Wang J, Watanabe S, Matsukura S, Suzaki H. Double-stranded RNA poly(I:C) enhances matrix metalloproteinase mRNA expression in human nasal polyp epithelial cells. *Acta Otolaryngol Suppl* 2009:105-109.
- 35 30. Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, y otros. Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. *J Clin Virol*;51:12-19.
31. Helaly GF. Differences in circulating MMP-9 levels with regard to viral load and AST:ALT ratio between chronic hepatitis B and C patients. *Br J Biomed Sci* 2011;68:38-42.
- 40 32. Hong JS, Greenlee KJ, Pitchumani R, y otros. Dual protective mechanisms of matrix metalloproteinases 2 and 9 in immune defense against *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2011;186:6427-6436.
33. Wong Y, Sethu C, Louafi F, Hossain P. Lipopolysaccharide regulation of toll-like receptor-4 and matrix metalloproteinase-9 in human primary corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2796-2803.
- 45 34. Coussens A, Timms PM, Boucher BJ, y otros. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 2009;127:539-548.
- 50 35. Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, y otros. Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. *N Engl J Med* 1999;340:603-608.
36. Disanto G, Morahan JM, Lacey MV, y otros. Seasonal distribution of psychiatric births in England. *PloS one* 2012;7:e34866.
- 55 37. McGrath J. Hypothesis: is low prenatal vitamin D a risk-modifying factor for schizophrenia? *Schizophr Res* 1999;40:173-177.
38. McGrath J. Is it time to trial vitamin D supplements for the prevention of schizophrenia? *Acta Psychiatr Scand* 2010;121:321-324.
- 60 39. Kinney DK, Teixeira P, Hsu D, y otros. Relation of schizophrenia prevalence to latitude, climate, fish consumption, infant mortality, and skin color: a role for prenatal vitamin d deficiency and infections? *Schizophr Bull* 2009;35:582-595.
- 65 40. Ramagopalan SV, Handel AE, Giovannoni G, Rutherford Siegel S, Ebers GC, Chaplin G. Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England. *Neurology* 2011;76:1410-1414.

41. McGrath JJ, Burne TH, Feron F, Mackay-Sim A, Eyles DW. Developmental vitamin D deficiency and risk of schizophrenia: a 10-year update. *Schizophr Bull* 2010;36:1073-1078.
- 5 42. Hedelin M, Lof M, Olsson M, y otros. Dietary intake of fish, omega-3, omega-6 polyunsaturated fatty acids and vitamin D and the prevalence of psychotic-like symptoms in a cohort of 33,000 women from the general population. *BMC Psychiatry* 2010;10:38.
- 10 43. Handoko HY, Nancarrow DJ, Mowry BJ, McGrath JJ. Polymorphisms in the vitamin D receptor and their associations with risk of schizophrenia and selected anthropometric measures. *Am J Hum Biol* 2006;18:415-417.
44. Humble MB, Gustafsson S, Bejerot S. Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) among psychiatric outpatients in Sweden: relations with season, age, ethnic origin and psychiatric diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:467-470.
- 15 45. Campbell SJ, Meier U, Mardiguian S, y otros. Sickness behaviour is induced by a peripheral CXC-chemokine also expressed in multiple sclerosis and EAE. *Brain Behav Immun* 2010;24:738-746.
- 20 46. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, y otros. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-1930.
47. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, y otros. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM* 2002;95:787-796.
- 25 48. Maunsell Z, Wright DJ, Rainbow SJ. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D2 and D3. *Clin Chem* 2005;51:1683-1690.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de una respuesta inflamatoria periférica asociada con una afección o enfermedad en un sujeto, en donde dicha afección o enfermedad es esquizofrenia o una comorbilidad de la misma seleccionada del grupo que consiste en trastornos del estado de ánimo, autismo, enfermedad de Alzheimer, demencia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, diabetes, síndrome metabólico, asma, colitis ulcerativa, psoriasis y otras afecciones autoinmunes, enfermedades cardíacas y cáncer, el método que comprende determinar en una muestra biológica de un sujeto el nivel de vitamina D3 y al menos un biomarcador seleccionado de la quimiocina innata IL-8 y la metaloproteinasa de matriz MMP-9 y comparar los niveles de dicha vitamina D3 y al menos un biomarcador con un nivel de control de vitamina D3 y un nivel de control del biomarcador para determinar una predicción, pronóstico y/o diagnóstico positivo o negativo de dicha respuesta inflamatoria periférica asociada con una enfermedad o afección, en donde el nivel de vitamina D3 indicativo de un estado inflamatorio positivo en la muestra es igual a o menor que 75 nmol/l, el nivel de IL-8 indicativo de un estado inflamatorio positivo es al menos 20 pg/ml y/o el nivel de MMP-9 indicativo de un estado inflamatorio positivo es al menos 700 ng/ml.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se mide el nivel de la 25-hidroxivitamina D3 y se compara con un nivel de control de este metabolito.
3. Un método como se reivindicó en la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad o afección es esquizofrenia o esclerosis múltiple.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de vitamina D3, preferentemente 25-hidroxivitamina D3, indicativo de un estado inflamatorio positivo está por debajo de 50 nmol/l.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de IL-8 indicativo de un estado inflamatorio positivo es al menos 32 pg/ml y/o el nivel de MMP-9 indicativo de un estado inflamatorio positivo es al menos 705 ng/ml.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además monitorear la actividad de la enfermedad/aparición de comorbilidades en dicha afección o enfermedad mediante la medición del nivel de 25-hidroxivitamina D3 en una muestra biológica de un sujeto en combinación con los niveles de uno o ambos de IL-8 y MMP-9 en la muestra biológica.
7. Un método para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar una respuesta inflamatoria periférica, asociada con una afección o una enfermedad en un sujeto, siendo dicha afección o enfermedad esquizofrenia o una comorbilidad de la misma seleccionada del grupo que consiste en trastornos del estado de ánimo, autismo, enfermedad de Alzheimer, demencia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, diabetes, síndrome metabólico, asma, colitis ulcerativa, psoriasis y otras afecciones autoinmunes, enfermedades cardíacas y cáncer, mediante la comparación de los niveles de 25-hidroxivitamina D3 en una muestra biológica del sujeto, en combinación con los niveles de al menos un biomarcador, en donde al menos un biomarcador se selecciona de IL-8 y MMP-9 en la muestra biológica antes, durante y después del tratamiento, en donde dicho tratamiento se considera eficiente si el nivel de 25-hidroxivitamina D3 y/o IL-8 y/o MMP-9 en la muestra se acerca a un nivel de control predeterminado para estos metabolitos, en donde la determinación de un tratamiento eficiente se reconoce mediante la medición de un nivel de 25-hidroxivitamina D3 que sea superior a 50 nmol/l, con relación a una medición inicial anterior al tratamiento fuera de este intervalo, el nivel de IL-8 es inferior a 32 pg/ml y/o el nivel de MMP-9 es inferior a 705 ng/ml con relación a una medición inicial anterior al tratamiento que está fuera de este intervalo.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los niveles de ambos, IL-8 y MMP-9 en la muestra biológica se comparan antes, durante y después del tratamiento.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde la determinación de un tratamiento eficiente se reconoce mediante la medición de un nivel de 25-hidroxivitamina D3 que sea superior a 75 nmol/l con relación a una medición inicial anterior al tratamiento fuera de este intervalo, y el nivel de MMP-9 está en el intervalo de 169-705 ng/ml, con relación a una medición inicial anterior al tratamiento que está fuera de este intervalo.
10. Un método para establecer un perfil de biomarcadores de referencia que comprende las etapas de (a) determinar una cantidad de vitamina D3, preferentemente 25-hidroxivitamina D3 y al menos un biomarcador seleccionado de IL-8 y MMP-9 en una muestra obtenida de un sujeto sano o de un sujeto que tiene una respuesta inflamatoria periférica asociada con una afección o enfermedad en un sujeto, siendo dicha afección o enfermedad esquizofrenia o una comorbilidad de la misma seleccionada del grupo que consiste en trastornos del estado de ánimo, autismo, enfermedad de Alzheimer, demencia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, diabetes, síndrome metabólico, asma, colitis ulcerativa, psoriasis y otras afecciones autoinmunes, enfermedades cardíacas y cáncer; y (b) almacenar la cantidad de vitamina D3, preferentemente 25-hidroxivitamina D3 y el biomarcador seleccionado

en un perfil de biomarcadores de referencia respectivamente para sujetos sanos o sujetos que tienen una respuesta inflamatoria periférica asociada con dicha afección o enfermedad.

- 5
11. Un kit que comprende medios para detectar el nivel de 25-hidroxivitamina D3 en una muestra biológica de un sujeto, en combinación con medios para detectar el nivel de al menos un biomarcador en donde al menos un biomarcador se selecciona de IL-8 y MMP-9.
  12. Un kit como se reivindicó en la reivindicación 11, en donde el kit comprende reactivos de detección apropiados y opcionalmente aditivos adicionales.
- 10

Figura 1

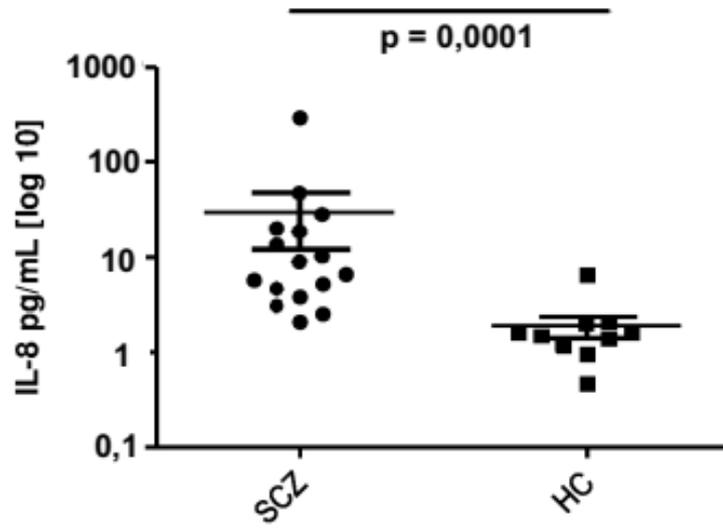


Figura 2

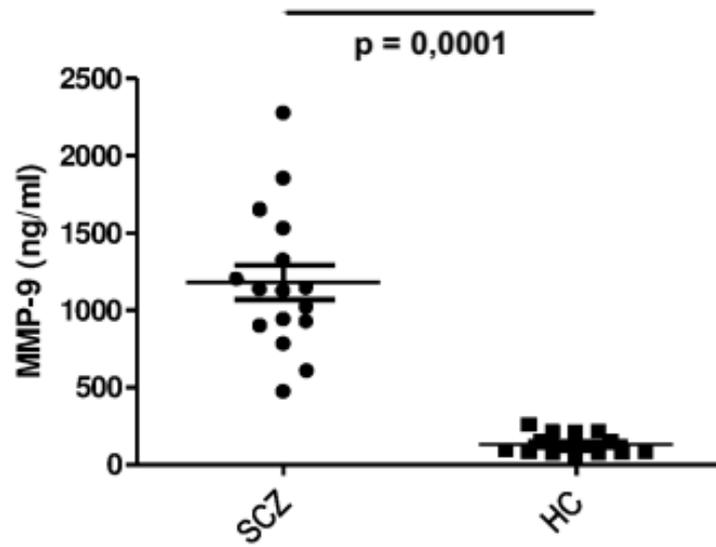


Figura 3

