



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 311**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05779948 .8**
96 Fecha de presentación : **15.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1747282**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2007**

54 Título: **Productos de degradación proteolítica de MAP-2 como biomarcadores de diagnóstico para las lesiones neurales.**

30 Prioridad: **15.04.2004 US 562819 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es:
University of Florida Research Foundation, Inc.
223 Grinter Hall
Gainesville, Florida 32611, US
BANYAN BIOMARKERS

72 Inventor/es: **Wang, Ka-Wang, Kevin;**
Hayes, Ronald;
Liu, Ming-Chen y
Oli, Monika

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 367 311 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

Productos de degradación proteolítica de MAP-2 como biomarcadores de diagnóstico para las lesiones neurales.

5 Campo de la invención

La invención prevé la detección y la identificación fiables de biomarcadores que se producen únicamente en casos de daño cerebral o de estrés o trastornos neuronales, importantes para el diagnóstico, el pronóstico y el control de las lesiones del mismo sistema orgánico/tisular de interés. El perfil de los productos proteolíticos o de los fragmentos de proteínas/péptidos orgánicos con concentraciones especialmente altas o específicos en pacientes con daños en órganos o tejidos y en sus células se distingue de los controles normales que utilizan técnicas baratas. Estas técnicas ofrecen enfoques sencillos a la par que sensibles de cara al diagnóstico del daño o del estrés sobre el sistema nervioso central y periférico, en los que se encuentran comprometidos o alterados órganos principales que utilizan líquidos biológicos.

15 Antecedentes de la invención

La incidencia anual de lesiones cerebrales traumáticas (LCT) en los Estados Unidos, en términos conservadores, se estima en más de 2 millones de casos, con aproximadamente 500.000 hospitalizaciones. De estas personas, entre 70.000 y 90.000 afectados por traumatismos cerebrales quedan discapacitados de forma permanente. El coste económico anual en concepto de atención de los pacientes con traumatismos cerebrales se estima en 25.000 millones de \$. Estas cifras corresponden únicamente a la población civil, y la incidencia es mucho mayor cuando se incluyen los heridos en combate. En los enfrentamientos bélicos contemporáneos (1993-2000), las LCT constituyen la principal causa de muerte (53%) entre los heridos que son atendidos en los centros sanitarios.

La evaluación de las afectaciones patológicas y neurológicas inmediatamente después de una LCT es fundamental de cara a determinar un tratamiento clínico adecuado y pronosticar el resultado a largo plazo. Las medidas de los resultados del paciente que se utilizan con mayor frecuencia son la Escala del Coma de Glasgow (GCS), la Escala de Resultados de Glasgow (GOS) y las imágenes por tomografía computarizada (TAC) y resonancia magnética (RMN) para detectar la patología intracraneal. No obstante, a pesar de la drástica mejora en los sistemas de clasificación de urgencia a partir de estas mediciones de los resultados, la mayor parte de los pacientes con LCT sufre una incapacidad a largo plazo, y una gran parte de los supervivientes de LCT se ven notablemente afectados a pesar de las predicciones de «buena recuperación» de la GOS. Además, los sistemas TAC y RMN son caros y no pueden utilizarse rápidamente en los servicios de urgencias. En el austero entorno médico asociado a la medicina de combate, el diagnóstico preciso de las LCT es un requisito previo fundamental para una clasificación adecuada de los heridos.

Así, las vías neurales de los mamíferos están especialmente en riesgo si las neuronas sufren un traumatismo mecánico o químico, o bien una degeneración neuropática suficiente como para que las neuronas que integran la vía estén en riesgo de morir. Hasta la fecha se han descubierto un gran número de neuropatías, algunas de las cuales afectan sólo a un subconjunto o a un sistema de neuronas del sistema nervioso periférico o central. Las neuropatías, que pueden afectar a las neuronas o a las células gliales asociadas, pueden derivarse de un trastorno metabólico celular, una infección, una exposición a sustancias tóxicas, un trastorno autoinmunitario, desnutrición o isquemia. En algunos casos se cree que la alteración celular puede provocar directamente la muerte de las células, pero en otros casos, la neuropatía puede causar necrosis tisular en grado suficiente para estimular el sistema inmunitario/inflamatorio del organismo, y los mecanismos inmunitarios responden a la lesión neural inicial y destruyen las neuronas y la vía integrada por éstas.

Otra lesión habitual del SNC es la apoplejía, la destrucción del tejido cerebral como consecuencia de una hemorragia o de un infarto intracerebral. La apoplejía es una de las principales causas de fallecimiento en el mundo desarrollado; puede venir provocada por la reducción del riego sanguíneo o isquemia que provoca la disminución de la irrigación y el fallecimiento de los tejidos en un área del cerebro (infarto). Entre las causas que provocan la apoplejía isquémica se incluyen los coágulos sanguíneos que se forman en los vasos sanguíneos del cerebro (trombos) y los coágulos sanguíneos o fragmentos de placas ateroscleróticas o de otros materiales que llegan al cerebro desde otro lugar (émbolos). Las hemorragias dentro del cerebro también pueden provocar síntomas similares a los de la apoplejía. Las técnicas precedentes no pueden detectar esta lesión.

Las vías nerviosas de los mamíferos también se encuentran en riesgo como consecuencia de los daños provocados por las lesiones neoplásicas. Se han identificado neoplasias tanto de las neuronas como de las células gliales. Las células transformadas de origen neural suelen perder su capacidad de comportarse como células normales diferenciadas y pueden destruir las vías nerviosas por la pérdida de función. Además, los tumores en crecimiento pueden provocar lesiones al distorsionar la estructura normal del tejido nervioso, inhibiendo las vías por compresión de los nervios, alterando el riego sanguíneo o del líquido cefalorraquídeo (LCR), o estimulando la respuesta inmunitaria. Los tumores metastásicos, una causa importante de lesiones neoplásicas en el cerebro y la médula espinal, también pueden dañar de forma similar las vías neurales y provocar la muerte de las neuronas.

La identificación y el desarrollo de productos proteolíticos como biomarcadores o marcadores diagnósticos se circunscribe sobre todo al SNC. Las lesiones de los nervios periféricos, como sucede en las neuropatía diabética o por la administración de quimioterápicos como los utilizados para tratar el cáncer, también pueden generar un daño proteolítico similar al experimentado en el SNC. Además, debido a la gran importancia que la activación de las proteasas tiene en las lesiones celulares asociadas a las lesiones en otros órganos (hígado, riñón, pulmón, intestino, corazón, etc.), así como a los casos de sobreentrenamiento muscular, la proliferación de células cancerosas o la muerte de células tumorales y disminución del tumor causadas por la quimioterapia, esta invención ofrece múltiples aplicaciones en el diagnóstico y el seguimiento de lesiones orgánicas, lesiones multiorgánicas, CABG, septicemia, lesiones pulmonares causadas por hiperventilación, sobreentrenamiento muscular, cáncer y similares.

Existe por lo tanto la necesidad de contar con evaluaciones clínicas diagnósticas adecuadas, específicas, económicas y sencillas de lesiones o sobrecargas orgánicas individuales o multiorgánicas, de diversos cánceres de órganos específicos y del entrenamiento o sobreentrenamiento muscular, así como de su severidad; también existe la necesidad de medios para seguir el tratamiento terapéutico y evaluar la eficacia. Así pues, la identificación de productos proteolíticos de proteínas o péptidos que sean específicos de un órgano dado o que se encuentren predominantemente en dicho órgano sería una herramienta muy útil para predecir los resultados, orientar el tratamiento terapéutico o el entrenamiento muscular, y supervisar la rehabilitación.

Sumario

La invención prevé la detección y la identificación fiables de biomarcadores que aparecen únicamente en casos de lesión o estrés cerebral, y los trastornos neuronales son importantes para el diagnóstico, el pronóstico y el control de daños del mismo sistema de interés orgánico/tisular. El perfil de los productos proteolíticos o de fragmentos de proteínas/péptidos orgánicos con concentraciones especialmente altas o específicos en pacientes con daños en órganos o tejidos y en células de éstos se distingue de los controles normales que utilizan las técnicas baratas. Estas técnicas ofrecen enfoques sencillos a la par que sensibles de cara al diagnóstico de daño o estrés en el sistema nervioso.

En una forma de realización preferida, la invención suministra biomarcadores indicativos de lesión cerebral traumática, daños neuronales, trastornos neurológicos, lesiones cerebrales, daños neurológicos provocados por la adicción a las drogas o el alcohol, o enfermedades asociadas con el cerebro o el sistema nervioso central y periférico (SNC, SNP). Las enzimas proteolíticas se activan como consecuencia del daño sufrido por diferentes órganos, como por ejemplo: corazón, cerebro, hígado, riñones, pulmón, intestino, el sistema nervioso central y periférico, así como los músculos esqueléticos. Las enzimas proteolíticas se activan y degradan las proteínas diana, así como los péptidos y los fragmentos de éstos que aparecen a consecuencia de las lesiones neurales y orgánicas. Las proteínas diana incluyen, entre otras, proteínas, péptidos o fragmentos de éstos asociados con neuronas, células cerebrales o cualquier otra célula presente en el cerebro y en el sistema nervioso central, además de en órganos como el corazón, hígado, riñones, etc. Algunos ejemplos de enzimas proteolíticas que se detectan en las lesiones neurales u orgánicas son (en orden alfabético en el documento original): acromopeptidasa, aminopeptidasa, Ancrod, enzima convertidora de la angiotensina, bromelaína, calpaína, calpaína I, calpaína II, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa G, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa W, carboxipeptidasa Y, caspasa, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, caspasa 11, cathepsina B, cathepsina C, cathepsina D, cathepsina G, cathepsina H, cathepsina L, quimopapaína, quimasa, quimotripsina, α -clostripaína, colagenasa, complemento C1r, complemento C1s, factor del complemento D, factor del complemento I, cucumisina, dipeptidilpeptidasa IV, elastasa leucocitaria, elastasa pancreática, endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, enteroquinasa, factor Xa, ficina, furina, granzima A, granzima B, proteasa del VIH, Igasa, calicreína tisular, quinasa, leucina aminopeptidasa (general), leucina aminopeptidasa citosólica, leucina aminopeptidasa microsómica, metaloproteasa de matriz, metionina aminopeptidasa, neutrasa, papaína, pepsina, plasmina, prolidasa, pronasa E, antígeno específico de la próstata, proteasa, proteasa S proteosómica, proteinasa, proteinasa 3, proteinasa A, proteinasa K, proteína C, piroglutamato aminopeptidasa, renina, rennina, trombina, activador tisular del plasminógeno, troponinas, tripsina, triptasa, uroquinasa. Preferentemente, cualquiera de los números de secuencia: 10, 67, 68 también se detectan.

Los biomarcadores de las enzimas proteolíticas ejercen una actividad específica en los sustratos proteicos; por ejemplo, los ejemplos no excluyentes recogidos en la Tabla 1 oscilan entre alrededor de 1 μ g y 500 μ g por 1 mg de proteína sustrato que va a proteolizarse en los órganos dañados o estresados (condiciones *in vivo*) en un plazo que va de minutos a días, o bien en condiciones *in vitro* con el uso de una mezcla de proteasa purificada-proteína sustrato en una proporción de 1/10.000 a 1/20 durante período que oscila entre minutos y horas.

Los biomarcadores se activan a consecuencia de la lesión, por ejemplo, de un órgano o de neuronas, y provocan la proteólisis de proteínas, péptidos asociados al órgano o neuronas. Entre los ejemplos de las proteínas preferidas se incluyen, entre otras: las troponinas cardíacas o musculares, como por ejemplo troponina I, troponina-T, troponina-C; los péptidos neurales, que incluyen, entre otros, péptidos de proteínas axonales, proteína precursora amiloidea, proteínas dendríticas, proteínas del soma, proteínas presinápticas, fragmentos de proteínas postsinápticas y derivados de éstas.

En otra forma de realización preferida, los péptidos que actúan como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC/SNP o de trastornos neurales se identifican mediante los números de secuencia: 10, 67, 6810, 67, 68.

- 5 En otra forma de realización preferida, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son homólogos en aproximadamente un 50% a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son homólogos en aproximadamente un 70% a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas de los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son homólogos en aproximadamente un 80% a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas de los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son homólogos en aproximadamente un 90%, 95%, 96%, 97%, 95%, 99% ó 99,9% a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68.

- En otra forma de realización preferida, los péptidos identificados como dianas de los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son por lo menos 10 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal que los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son por lo menos 20 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con respecto a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son por lo menos 50 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con respecto a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son por lo menos 80 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con respecto a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son por lo menos 100 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con respecto a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son por lo menos 200 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con respecto a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68; preferentemente, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas destinados al diagnóstico y la detección de daños cerebrales o del SNC o de trastornos neurales son hasta 400 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con respecto a los péptidos identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68. Los ejemplos de aminoácidos más largos se encuentran en la Tabla 1, junto con sus números de registro. De ese modo, los aminoácidos que deben figurar en el extremo N-terminal o C-terminal de cada biomarcador identificado por los números de secuencia: 10, 67, 68 se determinan fácilmente.

- En otra forma de realización preferida, los péptidos identificados como dianas para los biomarcadores de enzimas proteolíticas para el diagnóstico y la detección de una lesión del SNC y/o cerebral o trastornos neurales, son preferentemente los péptidos dendríticos, tales como por ejemplo: MAP-2A/B, MAP-2C.

- En otra forma de realización preferida, los biomarcadores de las enzimas proteolíticas se detectan a partir de muestras de un paciente susceptible de sufrir daños neuronales o que ya los sufre.

- Los marcadores se caracterizan por su peso molecular, sus huellas de digestión enzimática y sus identidades proteicas conocidas. Los marcadores pueden resolverse a partir de otros péptidos en una muestra mediante el uso de técnicas de fraccionamiento, como por ejemplo la cromatografía acoplada a espectrometría de masas, o bien a través de inmunoensayos convencionales. Preferentemente, el método de resolución implica una espectrometría de masas con ionización/desorción por láser de superficie («SELDI»), en la que la superficie de la sonda objeto de la espectrometría de masas contiene adsorbentes que se unen a los marcadores.

- La presencia de determinados biomarcadores de enzimas proteolíticas es indicativa del alcance de la lesión del SNC/SNP o cerebral. Por ejemplo, la detección de uno o más marcadores de daños dendríticos, marcadores de daños del soma, marcadores de desmielinización o marcadores de daños axonales indicaría daños en el SNC, y la presencia de uno o más indicaría el alcance de la lesión nerviosa.

- En otra forma de realización preferida, la presencia de ciertas proteínas neurales degradadas indica actividad enzimática proteolítica, e indica un trastorno neurológico, es decir, marcadores de daños dendríticos.

Los métodos para la detección y el diagnóstico de los daños en el SNC/SNP o cerebrales consisten en detectar por lo menos uno o más biomarcadores de enzimas proteolíticas en una muestra, y en correlacionar la detección de dichos biomarcadores de enzimas proteolíticas con un diagnóstico de las lesiones del SNC o cerebrales, donde la correlación tiene en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de enzima proteolítica en cada diagnóstico en comparación con sujetos normales. Preferentemente, los biomarcadores de enzimas proteolíticas deben ser específicos; por ejemplo, las proteínas neuronales, MAP-2A/B, MAP-2C.

En otra forma de realización preferida, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68.

En otra forma de realización preferida, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a los epítomos que son homólogos en un porcentaje de aproximadamente 50% a las secuencias identificadas con los números: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a los epítomos que son homólogos en un porcentaje de aproximadamente 70% a las secuencias identificadas con los números: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a los epítomos que son homólogos en un porcentaje de aproximadamente 80% a las secuencias identificadas con los números: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a los epítomos que son homólogos en un porcentaje de aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 95%, 99% o 99,9% a las secuencias identificadas con los números: 67, 68.

En otra forma de realización preferida, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos que por lo menos son unos 10 aminoácidos más largos en su extremo N-terminal o C-terminal que los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos que por lo menos son unos 20 aminoácidos más largos en su extremo N-terminal o C-terminal que los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos que por lo menos son unos 50 aminoácidos más largos en su extremo N-terminal o C-terminal que los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos que por lo menos son unos 100 aminoácidos más largos en el extremo N-terminal o C-terminal que los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos que por lo menos son unos 200 aminoácidos más largos en su extremo N-terminal o C-terminal que los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68; más preferentemente, los anticuerpos específicos para los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos que por lo menos son unos 500 aminoácidos más largos en su extremo N-terminal o C-terminal que los epítomos identificados por los números de secuencia: 67, 68. Los ejemplos de aminoácidos más largos se encuentran en la Tabla 1, junto con sus números de registro. De ese modo, los aminoácidos que deben figurar en el extremo N-terminal o C-terminal de cada biomarcador identificado por los números de secuencia: 67, 68 pueden determinarse fácilmente, y pueden producirse los anticuerpos.

En otra forma de realización preferida, la invención ofrece un kit para analizar el daño celular en un sujeto. preferentemente, el kit incluirá: (a) un conjunto o panel de biomarcadores, identificado por cualquiera de los números de secuencia: 10, 67, 68; (b) un sustrato para retener y conservar una muestra biológica aislada de una persona sospechosa de sufrir daño neuronal, (c) un agente que se une de forma específica como mínimo a una o más de las enzimas proteolíticas; y (d) instrucciones impresas para llevar a cabo la reacción del agente con la muestra biológica o con una fracción de ésta destinada a detectar la presencia o la cantidad de por lo menos un marcador en la muestra biológica.

Preferentemente la muestra biológica es un líquido que haya estado en contacto con el sistema nervioso del sujeto antes de ser extraído de éste; por ejemplo, LCR o sangre, y el agente, podrá ser un anticuerpo, un haptámero u otra molécula que se una de forma específica como mínimo a una o más de las enzimas proteolíticas. El kit también puede incluir un marcador detectable, como un conjugado para el agente, o un conjugado para una sustancia que se una de forma específica al mismo (por ejemplo, un anticuerpo secundario).

Otros aspectos de la invención se describen a continuación.

Breve descripción de las figuras

La invención se señala con minuciosidad en las reivindicaciones adjuntas. Otras ventajas y las anteriores se comprenderán mejor haciendo referencia a la descripción siguiente a partir de los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una ilustración esquemática que representa un ejemplo de un método relacionado con el diagnóstico y el tratamiento tras el estrés o la lesión de un órgano. El estrés o la lesión de un órgano y la formación o el

tratamiento de tumores provocan un aumento de la actividad proteolítica, que da como resultado la aparición de fragmentos singulares de las proteínas tisulares que poseen un valor diagnóstico.

5 Las figuras 2A-2E son geles que representan ejemplos de proteínas neurales sometidas a un ataque proteolítico 48 horas después de una lesión cerebral traumática en el hipocampo de rata. Entre estas proteínas se incluyen NF-H (FIG. 2A), NF-L (FIG. 2B), Tau (FIG. 2C), APP (FIG. 2D) y β II-espectrina (Figura 2E). Se indican los principales productos de descomposición (BDP) con sus respectivos pesos moleculares. También se analizaron muestras corticales ipsilaterales, que mostraron unos patrones de proteólisis muy similares.

10 Las figuras 3A y 3B son geles que representan ejemplos de proteínas mielínicas (MBP, FIG. 3A; MOSP, FIG. 3B) que se escinden 24 horas después de una lesión cerebral traumática.

15 Las figuras 4A-4C son geles que representan ejemplos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que detectan específicamente un extremo N-terminal único y nuevo de un fragmento de proteína tisular (MBP-BDP). Las muestras corticales ipsilaterales intactas y afectadas por la LCT (48 horas tras la lesión) fueron analizadas mediante inmunotransferencia con una sonda de anticuerpo anti-MBP total (figura 4A) y anticuerpos policlonales de conejo específicos para el fragmento de MBP (figura 4B), o bien anticuerpos monoclonales de ratón (figura 4C). En la figura 4A, el anticuerpo anti-MBP total detecta las MBP-21 kDa y MBP-18 kDa intactas en el cerebro intacto y fragmentos de 12 kDa y 10 kDa (BDP-12 kDa, BDP-10 kDa) en el cerebro afectado por el TC. En las figuras 4B y 20 4C, sólo se detectaron las BDP-12 kDa y BDP-10 kDa; no se detectaron las MBP intactas (de 18 kDa y 21 kDa) con estos anticuerpos, lo que demuestra su selectividad elevada para los fragmentos de MBP generados *in vivo*.

25 La figura 5 representa geles de ejemplos de proteínas sinápticas (sinaptotagmina y sinaptojanina-1) que están siendo degradadas en la corteza o el hipocampo de rata 48 horas después del TC.

La figura 6 representa geles con los resultados obtenidos cuando las proteínas cardíacas humanas troponina-T2 y troponina-I3 son hidrolizadas por las proteasas calpaína-2 y caspasa-3, generando productos de descomposición únicos (indicados con una estrella).

30 La figura 7 representa geles de los resultados obtenidos cuando la proteína muscular humana troponina-T1/3 fue digerida por la proteasa calpaína-1, generando productos de descomposición únicos. Se utilizó una membrana de PVDF con tinción de Coomassie para suprimir bandas y secuenciar el extremo N-terminal. La transferencia Western muestra la identificación de la mayor parte de las bandas como BDP específicas de la TnT. El mapa que aparece a 35 continuación indica los lugares de escisión recién identificados, uno en la TnT1 y otro en la TnT2.

Descripción detallada

La presente invención detecta biomarcadores que permiten diagnosticar lesiones del SNC, lesiones o estrés celular o trastornos neuronales. La detección de diferentes biomarcadores por la invención también permite diagnosticar la 40 gravedad de las lesiones nerviosas, e identificar las células afectadas por la lesión y la localización subcelular de dicha lesión. En concreto, la invención correlaciona la presencia o la cantidad de una o más enzimas proteolíticas que se activan por la presencia de un péptido (o péptidos) procedentes de células nerviosas u órganos dañados por la lesión. La presencia de enzimas proteolíticas se correlaciona con la gravedad o con el tipo de lesión de las células 45 nerviosas o el órgano. La actividad de una enzima proteolítica y la generación de productos de descomposición de las proteínas tisulares se relacionan directamente con la gravedad de las lesiones del tejido nervioso o del órgano, puesto que una lesión más grave provoca daños en un mayor número de células, lo cual, a su vez, provoca la acumulación de una mayor cantidad de péptidos neurales o celulares en la muestra biológica (por ejemplo, LCR), activando en consonancia las enzimas proteolíticas.

Definiciones

Antes de exponer la invención, para poder entenderla, puede resultar útil definir ciertos términos que se utilizarán en adelante.

55 «Marcador», en el contexto de la presente invención, hace referencia a un polipéptido (de un peso molecular aparente determinado) que está presente de manera diferencial en una muestra tomada a pacientes con daños neurales y/o trastornos neuronales en comparación con una muestra comparable tomada a sujetos de control (por ejemplo una persona con un diagnóstico negativo o un sujeto normal o sano).

60 «Actividad» de una enzima será la cantidad de producto generado por unidad de tiempo a una temperatura y un pH fijos.

«Actividad específica» de una enzima será la cantidad de producto generado por unidad de tiempo y por mg de proteína.

65

«Sustrato» será la proteína diana catalizada por la enzima. La Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B.) fue la que estableció por primera vez las normas de la nomenclatura de las enzimas, las cuales recomiendan que los nombres de éstas indiquen tanto el sustrato sobre el que actúan como el tipo de reacción catalizada. Por ejemplo, con arreglo a este sistema, la enzima uricasa se denomina urato:O₂ oxidoreductasa, mientras que la enzima transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) se denomina L-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferasa.

«Complementario/a» en el contexto de la presente invención se referirá a la detección de por lo menos dos biomarcadores, los cuales, al ser detectados, ofrezcan juntos una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con la detección de un solo biomarcador.

La expresión «presente de manera diferencial» se refiere a las diferencias en la cantidad y/o la frecuencia de un marcador presente en una muestra tomada en pacientes que, por ejemplo, tienen lesiones neurales en comparación con un sujeto control. Por ejemplo, un marcador puede ser un polipéptido que esté presente en una concentración elevada o reducida en muestras de pacientes con lesiones neurales en comparación con las muestras de los sujetos control. Como alternativa, un marcador puede ser un polipéptido que sea detectado con una frecuencia más elevada o más reducida en muestras de pacientes comparadas con muestras de sujetos control. Un marcador puede estar presente de manera diferencial en términos de cantidad, frecuencia o ambos.

Un polipéptido está presente de manera diferencial entre las dos muestras si la cantidad de dicho polipéptido en una muestra es notablemente diferente desde un punto de vista estadístico con respecto a la cantidad del polipéptido en la otra muestra. Por ejemplo, un polipéptido está presente de manera diferencial entre las dos muestras si está presente por lo menos aproximadamente a un 120%, aproximadamente a un 130%, aproximadamente a un 150%, aproximadamente a un 180%, aproximadamente a un 200%, aproximadamente a un 300%, aproximadamente a un 500%, aproximadamente a un 700%, aproximadamente a un 900%, o aproximadamente a un 1000% más en comparación con su presencia en la otra muestra, o bien si es detectable en una muestra y no lo es en la otra.

Alternativa o adicionalmente, un polipéptido está presente de manera diferencial entre los dos conjuntos de muestras si la frecuencia de detección del polipéptido en muestras de pacientes que sufren lesiones neurales y/o trastornos neuronales es significativamente mayor o menor en términos estadísticos que con respecto a las muestras control. Por ejemplo, un polipéptido está presente de manera diferencial entre los dos conjuntos de muestras si se detecta con una frecuencia mayor o menor de por lo menos aproximadamente a un 120%, aproximadamente a un 130%, aproximadamente a un 150%, aproximadamente a un 180%, aproximadamente a un 200%, aproximadamente a un 300%, aproximadamente a un 500%, aproximadamente a un 700%, aproximadamente a un 900%, o aproximadamente a un 1000% según lo observado en un conjunto de muestras con respecto al otro.

«Diagnóstico» hace referencia a identificar la presencia o la naturaleza de una enfermedad o trastorno patológico. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La «sensibilidad» de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de «positivos reales»). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo serán los «falsos negativos». Los sujetos que no estén enfermos y den negativo en el ensayo se denominarán «negativos reales». La «especificidad» de un ensayo de diagnóstico es de 1 menos el índice de falsos positivos, donde el índice de «falsos positivos» se define como la proporción de aquellos individuos sin la enfermedad que dan positivo. Aunque un método concreto de diagnóstico podría no ofrecer un diagnóstico definitivo de un estado, es suficiente si dicho método ofrece una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

Una «cantidad de prueba» de un marcador hace referencia a la cantidad de un marcador presente en una muestra que está siendo analizada. Una cantidad de prueba puede expresarse en cantidad absoluta (por ejemplo $\mu\text{g/ml}$) o en cantidad relativa (por ejemplo intensidad relativa de las señales).

Una «cantidad diagnóstica» de un marcador se referirá a la cantidad de un marcador presente en la muestra de un sujeto que concuerde con el diagnóstico de lesión neural o trastorno neuronal. Una cantidad diagnóstica puede expresarse en cantidad absoluta (por ejemplo $\mu\text{g/ml}$) o en cantidad relativa (por ejemplo intensidad relativa de las señales).

Una «cantidad de control» de un marcador puede ser cualquier cantidad de un intervalo de cantidades que debe compararse con una cantidad problema de un marcador. Por ejemplo, una cantidad de control de un marcador puede ser la cantidad de un marcador en una persona sin lesiones neurales o trastorno neuronal. Una cantidad de control puede expresarse en cantidad absoluta (por ejemplo $\mu\text{g/ml}$) o en cantidad relativa (por ejemplo intensidad relativa de las señales).

«Sonda» hace referencia a un dispositivo extraíble e insertable en un espectrómetro de iones en fase gaseosa, y constará de un sustrato con una superficie para presentar un marcador de cara a su detección. Una sonda puede constar de un solo sustrato o varios.

«Sustrato» o «sustrato de sonda» hace referencia a una fase sólida en la cual puede incorporarse un adsorbente (por ejemplo mediante acoplamiento, deposición, etc.).

«Adsorbente» hace referencia a cualquier material capaz de adsorber un marcador. El término «adsorbente» se utilizará en la presente memoria para hacer referencia tanto a un solo material («adsorbente monoplex») (por ejemplo, un compuesto o grupo funcional) al que el marcador esté expuesto como a una serie de materiales distintos («adsorbente multiplex») a los que esté expuesto el marcador. A los materiales adsorbentes del adsorbente multiplex se les conocerá como «especies adsorbentes». Por ejemplo, un emplazamiento para un sustrato de sonda puede constar de un adsorbente multiplex caracterizado por multitud de especies adsorbentes diferentes (por ejemplo, materiales de intercambio de aniones, quelantes de metal o anticuerpos), con diferentes características de unión. El material del sustrato en sí también puede contribuir a la adsorción de un marcador, y puede ser considerado parte de un «adsorbente».

«Adsorción» o «retención» hace referencia a la unión detectable entre un adsorbente y un marcador, ya sea antes o después de lavarlo con un eluyente (modificador del umbral de selectividad) o una solución de lavado.

«Eluyente» o «solución de lavado» hace referencia a un agente que podrá utilizarse para mediar la adsorción de un marcador a un adsorbente. Los eluyentes y las soluciones de lavado también se conocen como «modificadores del umbral de selectividad». Los eluyentes y las soluciones de lavado pueden utilizarse para lavar y eliminar materiales no unidos de la superficie del sustrato de la sonda.

«Resolver», «resolución» o «resolución de marcador» harán referencia a la detección de por lo menos un marcador en una muestra. La resolución incluye la detección de una serie de marcadores en una muestra mediante la separación y la posterior detección diferencial. La resolución no requiere la separación completa de uno o más marcadores del resto de las biomoléculas presentes en una mezcla, será suficiente cualquier separación que permita distinguir entre por lo menos un marcador y otras biomoléculas.

«Espectrómetro de iones en fase gaseosa» hace referencia a un aparato que medirá un parámetro que puede traducirse en relaciones masa-carga de iones formados cuando una muestra se volatiliza y se ioniza. Por regla general, los iones de interés tienen una carga simple, y con frecuencia se suele aludir a las relaciones masa-carga como masa. Los espectrómetros de iones en fase gaseosa incluyen, por ejemplo, espectrómetros de masa, espectrómetros de movilidad de iones y dispositivos de medición de la corriente iónica total.

«Espectrómetro de masas» hace referencia a un espectrómetro de iones en fase gaseosa que incluye un sistema de entrada, una fuente de ionización, una estructura óptica de iones, un analizador de masa y un detector.

«Espectrómetro de masas de desorción con láser» hace referencia a un espectrómetro de masas que utiliza láser como medio de desorción, volatilización e ionización de un analito.

«Detectar» hace referencia a la identificación de la presencia, la ausencia o la cantidad del objeto que deba ser detectado.

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizarán indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplicarán a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de dichos aminoácidos sean análogos o miméticos con respecto a un aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Los polipéptidos pueden ser modificados, por ejemplo, mediante la adición de residuos de carbohidratos para formar glucoproteínas. Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» engloban las glucoproteínas y las proteínas que no lo son.

«Región detectable» o «marca» hace referencia a un compuesto detectable mediante métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, algunas marcas útiles son: ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos electroopacos, enzimas (por ejemplo, tal y como suelen usarse en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las cuales hay disponibilidad de antiseros o anticuerpos monoclonales, o bien moléculas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a una diana. La región detectable suele generar una señal medible, ya sea de tipo radiactivo, cromogénico o fluorescente, que puede utilizarse para cuantificar la cantidad de región detectable unida en una muestra. La cuantificación de la señal se logra, por ejemplo, mediante gammagrafía, densitometría o citometría de flujo.

«Anticuerpo» hace referencia a un ligando polipeptídico sustancialmente codificado por un gen o genes de inmunoglobulinas, o por fragmentos de éstos, que se une a un epítipo y lo reconoce de forma específica (por ejemplo, un antígeno). Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de la región constante de las cadenas ligeras kappa y lambda, los genes de la región constante de las cadenas pesadas alfa, gamma, delta, épsilon y mu y los múltiples genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas y como numerosos fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas. Esto incluye, por ejemplo, fragmentos Fab' y F(ab)'₂. El término «anticuerpo» como se usa en la presente memoria también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante. También se incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos

de cadena sencilla. La porción «Fe» de un anticuerpo se refiere a toda porción de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende uno o varios dominios de la región constante de la cadena pesada CH₁, CH₂ y CH₃, pero no incluye la región variable de la cadena pesada.

5 «Inmunoensayo» es un ensayo que utiliza un anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno (por ejemplo un marcador). El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo concreto para aislar, marcar como diana o cuantificar el antígeno.

10 La frase «unión de forma específica (o selectiva)» a un anticuerpo o «inmunorreactivo de forma específica (o selectiva) con», cuando se refiere a una proteína o a un péptido, hace referencia a una reacción de unión determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de éstas y otras sustancias biológicas. Así pues, en condiciones concretas de inmunoensayo, los anticuerpos especificados se unen a una proteína concreta por lo menos dos veces más con respecto al fondo, y no se unen de forma sustancial en una cantidad importante a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en estas condiciones
15 puede requerir un anticuerpo que sea seleccionado por su especificidad para una proteína concreta. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales producidos frente a un marcador NF-200 a partir de especies concretas como la rata, el ratón o el ser humano, pueden seleccionarse para obtener sólo aquéllos que sean inmunorreactivos específicamente para el marcador NF-200 y no para otras proteínas, excepto en el caso de variantes polimórficas y alelos del marcador NF-200. Esta selección puede llevarse a cabo mediante la eliminación de los anticuerpos que reaccionan
20 de forma cruzada con moléculas del marcador NF-200 de otras especies. Pueden utilizarse diferentes formatos de inmunoensayo para seleccionar los anticuerpos inmunorreactivos de forma específica para una proteína concreta. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se usan de forma habitual para seleccionar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos de forma específica con una proteína (véase por ejemplo Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), para una descripción de los formatos y las condiciones de los inmunoensayos que
25 pueden utilizarse para determinar una inmunoreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva es aquella que emite una señal o un ruido que, como mínimo, duplica la del fondo o, más habitualmente, resulta entre 10 y 100 veces mayor que la de dicho fondo.

30 «Molécula absorbidora de energía» o «EAM» hace referencia a una molécula que absorbe energía de una fuente de ionización en un espectrómetro de masas, ayudando así a la desorción del analito, como por ejemplo un marcador, en la superficie de una sonda. Dependiendo del tamaño y de la naturaleza del analito, la molécula absorbidora de energía puede emplearse de forma opcional. Las moléculas absorbedoras de energía utilizadas en MALDI suelen conocerse como «matriz». Los derivados del ácido cinámico, ácido sinapínico («SPA»), ácido cianohidroxicinámico («CHCA») y ácido dihidroxibenzoico suelen utilizarse como moléculas absorbedoras de energía
35 en la desorción por láser de moléculas bioorgánicas.

40 «Muestra» se utilizará en la presente memoria en el sentido más amplio de la palabra. Una muestra que contenga polinucleótidos, polipéptidos, péptidos, fragmentos de anticuerpos y derivados de éstos puede consistir en un líquido corporal; una fracción soluble de una preparación celular o medios en los que hallan crecido células; un cromosoma, un orgánulo o una membrana aislada o extraída de una célula; ADN genómico, ARN o ADNc, polipéptidos, o péptidos en solución o unidos a un sustrato; una célula; un tejido; una huella tisular; una huella dactilar, piel o pelo; fragmentos y derivados de éstos.

45 «Sustancialmente purificada» hace referencia a moléculas de ácidos nucleicos o proteínas que sean extraídas de su entorno natural y se aíslen o separen, y que estén exentas de otros componentes a los que estén asociadas de forma natural con una pureza mínima aproximada del 60%, o preferentemente del 75%, o mejor del 90%.

50 «Sustrato» hace referencia a cualquier soporte rígido o semirrígido al cual estén unidas las moléculas de ácidos nucleicos o las proteínas, e incluirá membranas, filtros, chips, portaobjetos, discos, fibras, esferas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos capilares o de otro tipo, placas, polímeros y micropartículas con diversas formas superficiales, incluyendo pocillos, estrías, pasadores, canales y poros.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «fragmento o segmento», aplicado a una secuencia de ácidos nucleicos, gen o polipéptido, estará compuesto, como mínimo, de 5 bases de ácido nucleico contiguas (para secuencias de ácidos nucleicos o genes) o aminoácidos (para los polipéptidos); típicamente por lo menos 10 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, más habitualmente de por lo menos 20 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, típicamente de por lo menos 30 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, preferentemente de por lo menos 40 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, más preferentemente del al menos, 50 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos y aún más preferentemente de por lo menos entre 60 y
60 80 o más bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos en términos de longitud. «Fragmentos solapados», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a fragmentos contiguos de ácido nucleico o péptido que comiencen en el extremo amino-terminal de un ácido nucleico o proteína y terminen en el extremo carboxilo-terminal del ácido nucleico o la proteína. Cada fragmento de ácidos nucleicos o de péptido tiene por lo menos alrededor de una posición contigua de ácido nucleico o de aminoácido en común con el siguiente fragmento de ácido nucleico o péptido, más preferentemente por lo menos alrededor de tres posiciones contiguas de bases de ácido nucleico o
65

aminoácido en común y más preferentemente por lo menos alrededor de diez posiciones contiguas de bases de ácido nucleico o de aminoácido en común.

5 Un «fragmento» significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de por lo menos alrededor de 17 nucleótidos, generalmente de por lo menos 20 nucleótidos, más generalmente de por lo menos 23 nucleótidos, normalmente de por lo menos 26 nucleótidos, más normalmente de por lo menos 29 nucleótidos, frecuentemente de por lo menos 32 nucleótidos, más frecuentemente de por lo menos 35 nucleótidos, normalmente de por lo menos 38 nucleótidos, más normalmente de por lo menos 41 nucleótidos, habitualmente de por lo menos 44 nucleótidos, más habitualmente de por lo menos 47 nucleótidos, preferentemente de por lo menos 50
10 nucleótidos, más preferentemente de por lo menos 53 nucleótidos y, en las formas de realización especialmente preferidas, será de por lo menos 56 o más nucleótidos.

15 Tal y como se utilizan en la presente memoria, los términos «polipéptido» o «péptido» incluyen las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo además las proteínas de longitud completa que presentan en la presente memoria.

20 Tal y como se utilizan en la presente memoria, «polipéptidos o epítomos con secuencias amino más largas» incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo además las proteínas de longitud completa presentadas en la presente memoria. Preferentemente, los anticuerpos producidos se unen a epítomos que constan por lo menos de 3 aminoácidos. En otras formas de realización preferidas, el término «los productos proteolíticos de los biomarcadores enzimáticos se unen a epítomos por lo menos 10 aminoácidos más largos que los epítomos que se identifican por los números de secuencia: 10, 67, 68» incluye una cadena de 10 aminoácidos en el extremo amino y/o en el extremo carboxilo de un péptido deseado. Los ejemplos de aminoácidos más largos se encuentran en la
25 Tabla 1, junto con sus números de registro. De ese modo, los aminoácidos que deben figurar en el extremo N-terminal o C-terminal de cada biomarcador identificado por los números de secuencia: 10, 67, 68 se determinan fácilmente.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «variante» o «derivado» de polipéptidos hace referencia a una secuencia de aminoácidos modificada por uno o más residuos de éstos. La variante puede tener cambios «conservadores», en los que un aminoácido sustituido tenga unas propiedades estructurales o químicas parecidas (por ejemplo sustitución de leucina por isoleucina). Raras veces, una variante puede presentar cambios «no conservadores» (por ejemplo sustitución de glicina por triptófano). Las pequeñas variaciones análogas también pueden incluir la eliminación o la inserción de aminoácidos, o ambas cosas. La orientación para determinar qué
35 residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin suprimir la actividad biológica puede encontrarse a través de programas informáticos conocidos en la materia, como por ejemplo el software LASERGENE (DNASTAR).

40 Los polipéptidos resultantes, por regla general, mantendrán una identidad aminoacídica significativa entre sí. Una variante polimórfica es una variación de la secuencia de polinucleótidos de un gen concreto entre individuos de una especie determinada. Las variantes polimórficas también pueden incluir «polimorfismos de un solo nucleótido» (SNP) o mutaciones de una sola base en las que la secuencia del polinucleótido varía en una sola base.

45 «Restricción» hace referencia a la combinación de condiciones a las que los ácidos nucleicos están sujetos y que provocan que la doble cadena se disocie, como temperatura, fuerza iónica y concentración de aditivos como formamida. Las condiciones que tienen mayor probabilidad de provocar que la doble cadena se disocie se denominan de «restricción superior», como por ejemplo una mayor temperatura, menor fuerza iónica y mayor concentración de formamida.

50 Para aplicaciones que requieran una alta selectividad, lo habitual sería emplear condiciones relativamente restrictivas para formar los híbridos; por ejemplo, se seleccionarían condiciones con una concentración relativamente baja de sal y/o alta temperatura, como las registradas entre unos 0,2 y 0,10 M de NaCl y temperaturas de alrededor de 50 °C a 70 °C.

55 Para determinadas aplicaciones son necesarias unas condiciones menos restrictivas. En tales condiciones, la hibridación puede tener lugar incluso a pesar de que las secuencias de la sonda y cadena diana no sean perfectamente complementarias, aunque se desajustará en una o más posiciones. Las condiciones se volverán menos restrictivas mediante el aumento de la concentración de sal y la reducción de la temperatura. Por ejemplo, unas condiciones de restricción media vendrían dadas por entre 0,1 y 0,25 M de NaCl y temperaturas de entre 37 °C y 55 °C, mientras que unas condiciones de restricción reducida se producirían entre 0,15 M y 0,9 M de sal y
60 temperaturas que oscilaran aproximadamente entre los 20 °C y 55 °C. Así pues, las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente en función de los resultados deseados.

65 La frase «condiciones de hibridación» y sus equivalentes gramaticales, cuando se utilicen con un período de tiempo de mantenimiento, indicará el proceso de someter la mezcla a la reacción de hibridación, en el contexto de la concentración de los reactantes y los reactivos acompañantes de dicha mezcla, a unas condiciones de tiempo, temperatura y pH suficientes como para permitir que la sonda polinucleotídica pueda hibridarse con la secuencia

diana, normalmente para formar la doble cadena de ácido nucleico. Esas condiciones de tiempo, temperatura y pH que son necesarias para lograr la hibridación, tal y como es bien conocido por los expertos en la materia, dependen de la longitud de la sonda polinucleotídica que vaya a hibridarse, del grado de complementariedad entre dicha sonda y la diana, del contenido de guanidina y citosina del polinucleótido, de la restricción de la hibridación deseada y de la presencia de sales o de reactivos adicionales en la mezcla de la reacción de hibridación, puesto que podrían afectar a la cinética del proceso. Los métodos para optimizar las condiciones de hibridación de una mezcla de reacción de hibridación son bien conocidos por los expertos en la materia.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión «lesión o lesión neural» incluirá cualquier daño que afecte, directa o indirectamente, al funcionamiento normal del SNC o del SNP. Por ejemplo, la lesión puede venir en forma de daños sobre las células ganglionares de la retina o de lesión cerebral traumática, una lesión derivada de una apoplejía, una lesión relacionada con un aneurisma cerebral, enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple, una lesión de la médula espinal entre las que se incluyen la monoplejía, la diplejía, la paraplejía, la hemiplejía y la cuadriplejía, así como de un trastorno neuroproliferativo o de un síndrome de dolor neuropático. Algunos ejemplos de lesiones o enfermedades del SNC son: TC, apoplejía, conmoción cerebral (incluyendo el síndrome posconmocional), isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas del cerebro como la enfermedad de Parkinson, demencia pugilística, enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer, lesiones cerebrales derivadas de las convulsiones provocadas por radiación, exposición a la ionización o a hierro en plasma, toxinas nerviosas, cianuro, concentraciones tóxicas de oxígeno, neurotoxicidad provocada por malaria cerebral o al tratamiento con antipalúdicos sobre el SNC, patógenos de la malaria, lesiones provocadas por tripanosomas y otros traumatismos del SNC. Algunos ejemplos de lesiones o enfermedades del SNP son: neuropatías provocadas por toxinas (por ejemplo, quimioterapéuticos contra el cáncer), diabetes, traumatismos periféricos o cualquier proceso que produzca la destrucción patológica de nervios periféricos y/o de sus vainas de mielina.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «apoplejía» es un término conocido por los expertos en la materia e incluirá la disminución o la pérdida súbita de consciencia, sensibilidad y movimiento voluntario provocada por la rotura o la obstrucción (por ejemplo, por un coágulo sanguíneo) de una arteria del cerebro.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «lesión cerebral traumática» es conocida por los expertos en la materia, e incluirá las condiciones en las que un impacto traumático sobre la cabeza provoca daños al cerebro, frecuentemente sin penetrar en el cráneo. Habitualmente, el traumatismo inicial puede desembocar en un hematoma en expansión, una hemorragia subaracnoidea, un edema cerebral, un aumento de la presión intracraneal (ICP) y en hipoxia cerebral, los cuales, a su vez, pueden provocar importantes episodios secundarios como consecuencia de la reducción del riego sanguíneo cerebral (CBF).

Las «células neurales» tal y como se definen en la presente memoria son células que se encuentran en el cerebro y en los sistemas nerviosos central y periférico, que comprenden de manera no limitativa, neuronas, células gliales, oligodendrocitos, células microgliales o células madre neurales.

Las «proteínas específicas neuronales o con un alto contenido en las mismas» se definen en la presente memoria como proteínas que están presentes en las neuronas pero no en las células no neuronales, como por ejemplo cardiomiocitos, miocitos, en los músculos esqueléticos, hepatocitos, células renales y células testiculares. A continuación, en la Tabla 1, se muestran algunos ejemplos de proteínas nerviosas de las que pueden derivar los péptidos, mediante degradación enzimática por ejemplo.

«Defectos, trastornos o enfermedades nerviosas (neuronales)», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a cualquier trastorno neurológico, que comprenden de manera no limitativa, trastornos neurodegenerativos (Parkinson, Alzheimer) o trastornos autoinmunitarios (esclerosis múltiple) del sistema nervioso central; pérdida de memoria; trastornos de la memoria a largo y a corto plazo; trastornos del aprendizaje; autismo; depresión, olvidos benignos, trastornos del aprendizaje infantiles, traumatismo cefálico cerrado y trastorno por déficit de atención; trastornos autoinmunitarios del cerebro, reacción neuronal ante infecciones víricas; daños cerebrales; depresión; trastornos psiquiátricos como bipolaridad o esquizofrenia; narcolepsia/trastornos del sueño (incluyendo alteraciones del ritmo circadiano, insomnio y narcolepsia); rotura de nervios o daños en éstos; rotura de la médula espinal y cualquier daño al cerebro o células nerviosas; déficits neurológicos asociados con el SIDA, tics (por ejemplo, síndrome de la Tourette); enfermedad de Huntington, esquizofrenia, lesión cerebral traumática, tinnitus, neuralgia, neuralgia especialmente del trigémino, dolor neuropático, actividad neuronal inadecuada que provoca neurodistesias en enfermedades tales como diabetes, EM, y la enfermedad de la neurona motora, ataxias, rigidez muscular (espasmos) y disfunción de la unión temporo-mandibular; comportamientos según el síndrome de la deficiencia de la recompensa (RDS) en un sujeto.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los comportamientos «RDS» son aquellos comportamientos que se manifiestan como uno o más trastornos de la conducta relacionados con un sentimiento individual de bienestar con ansiedad, ira o adicción a una sustancia. Los comportamientos RDS incluyen el alcoholismo, TCS, tabaquismo, IMC u obesidad, juego compulsivo, ingesta masiva de carbohidratos, diagnóstico de 11 ejes, TAE, TDA/TDAH, CD, TS, antecedenentes familiares de TCS y obesidad. Todos estos comportamientos y otros descritos en la presente memoria como asociados con los comportamientos RDS o con los genes implicados en las vías neurológicas relacionadas

con el RDS se incluyen como comportamientos RDS como parte de esta invención. Además, muchos de los conceptos clínicos utilizados en la presente memoria para muchos trastornos específicos del tipo RDS se encuentran en Quick Reference to the Diagnostic Criteria From DSM-IV™, The American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994.

5 Los trastornos afectivos, entre los que se incluyen la depresión mayor y la enfermedad bipolar maníaco-depresiva, se caracterizan por cambios en el humor como la principal manifestación clínica. La depresión mayor es la más común de las enfermedades mentales importantes, y debe distinguirse clínicamente de períodos de pena, tristeza y decepción normales, y de la disforia o desmoralización relacionada y que se asocia frecuentemente con dolencias
10 médicas. La depresión se caracteriza por sentimientos de intensa tristeza y desconsuelo, ralentización mental y pérdida de concentración, pensamientos pesimistas, agitación y pérdida de la autoestima. También pueden producirse cambios físicos, entre los que se incluyen el insomnio, anorexia y pérdida de peso, una pérdida de vigor y de la libido y la alteración de los ritmos circadianos hormonales.

15 La manía, al igual que la depresión, se caracteriza por cambios en el humor como el síntoma principal. Cualquiera de estos dos extremos de humor puede acompañarse de psicosis con pensamientos desordenados y percepciones ilusorias. Como síntoma secundario, la psicosis puede presentar un cambio en el humor y, si éste se solapa con la depresión, puede existir mucha confusión en el diagnóstico. En la depresión suelen tener lugar importantes cambios de humor sin psicosis, que suelen acompañarse de ansiedad.

20 La enfermedad de Parkinson, independiente y de una etiología específica, es un trastorno crónico y progresivo del sistema nervioso central, que suele aparecer de forma insidiosa en las últimas décadas de la vida. La enfermedad produce una incapacidad cada vez mayor en el movimiento intencionado, y se caracteriza por cuatro características clínicas fundamentales como son: temblores, bradicinesia, rigidez y alteración de la postura. Con frecuencia, en los
25 pacientes se manifiesta acompañada de demencia. En el parkinsonismo idiopático suele haber una pérdida de células en la sustancia negra, en el locus coeruleus y en otras neuronas pigmentadas del cerebro, así como un descenso del contenido de dopamina en las terminaciones de los axones de las células procedentes de la sustancia negra. Descubrir que el parkinsonismo es un síndrome de deficiencia de dopamina y el descubrimiento de la levodopa como un importante fármaco para el tratamiento de la enfermedad fue la culminación lógica de una serie de observaciones básicas y clínicas relacionadas, que sirven como base lógica para el tratamiento farmacológico.

La expresión «enfermedad de Alzheimer» hace referencia a un deterioro mental progresivo que se manifiesta por la pérdida de memoria, la confusión y la desorientación, que aparece en la mitad de la vida y que suele desembocar en la muerte transcurridos entre cinco y diez años. Patológicamente, la enfermedad de Alzheimer puede caracterizarse
35 por el engrosamiento, la aglutinación y la deformación de las neurofibrillas intracelulares que da lugar a la aparición de ovillos neurofibrilares y placas seniles compuestas de masas argentofílicas granulares o filamentosas con un núcleo amiloideo. Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer: para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer pueden utilizarse los criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINCDS-ADRDA) (McKhann et al., 1984, *Neurology* 34:939-944). La función cognitiva del paciente puede evaluarse mediante la subescala cognitiva ADAS (Escala de Evaluación para la Enfermedad de Alzheimer) (ADAS-cog; Rosen et al., 1984, *Am. J. Psychiatry* 141:1356-1364).

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «autismo» hace referencia a un estado de introversión mental que se caracteriza por una autoabsorción patológica, exclusión social, retraso en el lenguaje y comportamiento estereotipado.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «depresión» hace referencia a un síndrome clínico que incluye una tristeza persistente o una pérdida de interés en actividades, que dura por lo menos dos semanas en ausencia de tratamiento.

50 La expresión «ser olvidadizo», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una leve tendencia a incapacidad de recuperar o recordar información que se hubiera registrado, aprendido y almacenado en la memoria (por ejemplo, incapacidad de recordar dónde se han dejado las llaves o el coche en un aparcamiento). El hecho de ser olvidadizo suele afectar a personas mayores de 40 años de edad, y puede reconocerse mediante instrumentos de evaluación estándar, como la escala de memoria de Wechsler (Russell, 1975, *J. Consult Clin. Psychol.* 43:800-809).

55 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión «trastornos del aprendizaje infantiles» hace referencia a la deficiente capacidad de aprendizaje experimentada por algunos niños.

60 La expresión «traumatismo cefálico cerrado», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una situación clínica tras una lesión o traumatismo en la cabeza, cuya condición se caracteriza por un deterioro cognitivo y de memoria.

65 La expresión «trastorno por déficit de atención», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un trastorno que suele manifestarse con mayor frecuencia en niños, y que se caracteriza por un aumento de la actividad

- 5 motora y un deterioro de la capacidad de concentración. El trastorno por déficit de atención («TDA») es un trastorno comportamental sobre el aprendizaje común en niños, que afecta negativamente al rendimiento escolar y a las relaciones familiares. Los síntomas e indicios incluyen hiperactividad (por ejemplo, TDAH y DA/DH, DSM-IV), impulsividad, inestabilidad emocional, descoordinación motora y algunas dificultades en la percepción. El tratamiento incluye psicoestimulantes que, aunque eficaces, también son polémicos, y pueden provocar efectos secundarios problemáticos, como disforia, dolor de cabeza y retraso en el crecimiento. Otros medicamentos, entre los que se incluyen los antidepresivos tricíclicos, parecen mejorar la atención, pero pueden ser menos eficaces que los psicoestimulantes.
- 10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «localización subcelular» hace referencia a estructuras subcelulares definidas dentro de una sola célula nerviosa. Estas estructuras definidas a nivel subcelular se combinan con proteínas nerviosas únicas que se derivan, por ejemplo, de localizaciones dendríticas, axonales, de las vainas de mielina, de terminales presinápticos y zonas postsinápticas. La monitorización de la liberación de péptidos exclusivos de cada una de estas regiones, permite controlar y definir los daños subcelulares tras una lesión cerebral. Además,
- 15 las neuronas maduras se diferencian en subtipos concretos en los que se fusiona un transmisor nervioso primario, como los de tipo colinérgico (nicotínico y muscarínico), glutamatérgico, gabaérgico, serotoninérgico o dopaminérgico. Cada uno de estos subtipos neuronales expresa proteínas nerviosas únicas, como aquellas destinadas a la síntesis, metabolismo y al transportador y receptor de cada sistema neurotransmisor único (Tabla 1 a continuación).
- 20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el componente «farmacéuticamente aceptable» es aquel que es adecuado para utilizarse en seres humanos y/o animales sin causar efectos secundarios adversos intolerables (como toxicidad, irritación y reacción alérgica) y que presenta un balance beneficio/riesgo razonable.
- 25 Los términos «paciente» e «individuo» se utilizan indistintamente en la presente memoria, y harán referencia a un mamífero que vaya a ser tratado, con preferencia por los pacientes humanos. En algunos casos, los métodos de la invención se utilizan en animales experimentales, en aplicación veterinaria y en el desarrollo de modelos vertebrados para enfermedades, que comprenden de manera no limitativa, roedores, como ratones, ratas y hámsteres; aves, peces, reptiles y primates.
- 30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «mejora» o «tratamiento» harán referencia a un síntoma que alcance un valor normalizado, como por ejemplo, con un porcentaje inferior al 50% de diferencia con respecto a un valor normalizado, preferentemente inferior a alrededor de un 25% de diferencia con respecto a un valor normalizado, más preferentemente inferior al 10% de diferencia con respecto a un valor normalizado, y aún más preferentemente sin una diferencia significativa con respecto a un valor normalizado, según se determine mediante el uso de pruebas estadísticas rutinarias. Por ejemplo, una mejora o un tratamiento de depresión incluye el alivio de los síntomas de depresión, que comprenden de manera no limitativa, cambios en el humor, sentimientos de intensa tristeza y desconsuelo, ralentización mental, pérdida de concentración, pensamientos pesimistas, agitación y pérdida de la autoestima. También pueden mitigarse los cambios físicos, entre los que se incluyen el insomnio, la anorexia y la pérdida de peso, la pérdida de vigor y de la libido, y la recuperación de los ritmos circadianos hormonales. Otro
- 35 ejemplo: cuando se utilizan los términos «tratamiento de la enfermedad de Parkinson» o «mejora» tal y como se utilizan en la presente memoria, harán referencia a una mitigación de los síntomas de la enfermedad de Parkinson, que comprenden de manera no limitativa, temblores, bradicinesia, rigidez y alteración de la postura.

Marcadores proteolíticos

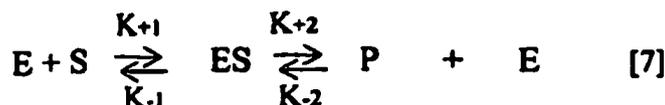
- 45 Esta descripción describe la nueva utilización y muy práctica de marcadores proteolíticos que pueden detectarse en tejidos, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y otros líquidos biológicos (sudor, orina, saliva) de cara a propósitos de diagnóstico y tratamiento tras una lesión o tumor en un órgano. Las proteasas sólo se activan cuando las células están dañadas, sufren estrés o se encuentran ante una agresión química. La sobreactivación de estas proteasas suele contribuir a los fenotipos de muerte celular, incluyendo la apoptosis y la oncosis (o necrosis oncótica) (ver, por ejemplo, la FIG. 1). Por ejemplo, tras una lesión cerebral traumática (LCT), apoplejía e isquemia renal, las calpains I y II se activarán y, en consecuencia, contribuirán a la muerte celular oncótica y apoptótica. Del mismo modo, las caspasas activadas 3, 8 y 9 provocan la apoptosis en estas mismas condiciones de enfermedad. De hecho, hay muchas proteasas que se activan tras una lesión en un órgano, entre las cuales se incluyen la catepsina B, L y D,
- 50 MMP2, 9 y 13, UCH-L1, proteasas de unión a la ubiquitina (UBP), quimasa, triptasa y subunidades de proteosoma (consulte la Tabla 1). La Tabla 1 muestra algunos ejemplos de posibles enzimas proteolíticas y marcadores de proteínas tisulares sensibles a la proteasa. Todos los marcadores de proteína tisular que aparecen en la Tabla 1 pueden producir un biomarcador proteolítico cuando éste es degradado por enzimas. La Tabla 2 que figura a continuación muestra algunos ejemplos de lugares no evidentes y únicos de segmentación de las proteínas tisulares
- 55 producidos por el ataque de las proteasas. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, la invención suministra biomarcadores que son indicativos de lesiones cerebrales traumáticas, daños neuronales, trastornos nerviosos, daños cerebrales, daños nerviosos provocados por la adicción a las drogas o al alcohol, o enfermedades asociadas con el cerebro o el sistema nervioso central y periférico (SNC, SNP). Las enzimas proteolíticas se activan como consecuencia del daño provocado sobre órganos, como por ejemplo: corazón, cerebro, hígado, riñones, pulmón, intestino; neuronas, sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y músculos esqueléticos. Las enzimas proteolíticas se activan y degradan las proteínas diana, generando péptidos y fragmentos de éstos como
- 60
- 65

- consecuencia de lesiones nerviosas y orgánicas. Las proteínas diana comprenden de manera no limitativa, proteínas, péptidos o fragmentos de éstos asociados con las neuronas, células cerebrales o cualquier célula que esté presente en el cerebro y en el sistema nervioso central, además de órganos como el corazón, el hígado, los riñones, etc. Algunos ejemplos de enzimas proteolíticas que son detectables en las lesiones nerviosas y/u orgánicas incluyen (en orden alfabético en el documento original): acromopeptidasa, aminopeptidasa, Ancrod, enzima convertidora de la angiotensina, bromelaina, calpaína, calpaína I, calpaína II, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa G, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa W, carboxipeptidasa Y, caspasa, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, caspasa 13, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina G, catepsina H, catepsina L, quimopapaína, quimasa, quimotripsina, α -clostripaína, colagenasa, complemento C1r, complemento C1s, factor del complemento D, factor del complemento I, cucumisina, dipeptidilpeptidasa IV, elastasa leucocítica, elastasa pancreática, endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, enteroquinasa, factor Xa, ficina, furina, granzima A, granzima B, proteasa del VIH, Igasa, calicreína tisular, quinasa, leucina aminopeptidasa (general), leucina aminopeptidasa citosólica, leucina aminopeptidasa microsómica, metaloproteasa de matriz, metionina aminopeptidasa, neutrasa, papaína, pepsina, plasmina, prolidasa, pronasa E, antígeno específico de la próstata, proteasa, proteasa S proteosómica, proteinasa, proteinasa 3, proteinasa A, proteinasa K, proteína C, piroglutamato aminopeptidasa, renina, rennina, trombina, activador tisular del plasminógeno, troponinas, tripsina, triptasa, uroquinasa. Preferentemente, cualquiera de los números de secuencia: 10, 67, 68 se detectan.
- El seguimiento de la sobreactivación de estas y otras proteasas, permitiría diagnosticar y facilitar ayuda en el tratamiento terapéutico de enfermedades de los órganos, incluyendo, entre otras, la apoplejía o las lesiones cerebrales, los fallos renales, las enfermedades pulmonares, los ataques cardíacos y las cataratas. En caso de tumores cancerosos, es probable en el interior del tumor activo se produzca un incremento de la muerte celular como consecuencia de su rápido crecimiento. La muerte celular también es notablemente elevada durante el tratamiento del cáncer (por ejemplo, quimioterapia), donde el objetivo es provocar la apoptosis de las células tumorales. Así pues, medir la activación de las proteasas (como un índice de muerte celular) sería una herramienta útil para seguir la evolución del crecimiento del tumor y evaluar el éxito de determinados tratamientos terapéuticos contra el cáncer.
- Se utilizará un enfoque para medir la enfermedad o la activación de las proteasas inducida por procesos médicos. El enfoque tecnológico consiste en analizar sustratos que son escindidos por las proteasas activadas (consulte la Tabla 1). Por ejemplo, las calpaínas activadas hidrolizan varias proteínas, entre las que se incluyen β 1-espectrina, β 1-espectrina [sic], MAP2A/2B, sinaptotagmina, tau, neurofilamento H, M, y L y proteína básica de mielina. Si se conocen los lugares exactos de segmentación del sustrato es posible desarrollar anticuerpos específicos para ciertos fragmentos; una vez más, la eficacia de esta técnica es especialmente notoria cuando se hidroliza un sustrato específico de tejido conocido, puesto que este producto de segmentación puede hacer las veces de biomarcador para ese tipo de tejido.
- Las ventajas de medir los marcadores proteolíticos en situaciones de enfermedad son tres. I) El concepto de activación excesiva de las proteasas es un aspecto común en el cáncer y en muchas lesiones tisulares y de órganos, que comprenden de manera no limitativa el cerebro, el hígado, los riñones y el corazón. II) Muchos productos proteolíticos de las proteasas activadas se liberan en líquidos biológicos como la sangre, LCR, orina, sudor y saliva. Aunque sus concentraciones serían más bajas que los niveles encontrados directamente dentro del tejido lesionado que los hubiera originado, aún podrían seguir siendo detectados (utilizando anticuerpos u otros agentes de captura), cuantificados y correlacionados con otras mediciones de resultados. III) La capacidad de utilizar procedimientos relativamente no invasivos para diagnosticar, tratar y efectuar un seguimiento a los pacientes es otra utilidad eficaz en relación con el uso de marcadores proteolíticos en situaciones de enfermedad.
- La detección de enzimas proteolíticas que degradan uno o más productos de segmentación sirve como diagnóstico de daño nervioso y/o enfermedad neuronal. Los ejemplos de sustratos de enzimas proteolíticas detectados comprenden de manera no limitativa: péptidos nerviosos, como por ejemplo péptidos axonales–NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), NF-68 (NF-L); péptidos precursores amiloideos; péptidos dendríticos–alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P0 4691), MAP-2A/B, MAP-2C, tau, dinamina-1 (P21575), dinactina (Q13561), P24; péptidos somales–UCH-L1 (Q00981), PEBP (P31044), NSE (P07323), thy 1.1, prión, Huntington; péptidos presinápticos–sinapsina-1, sinapsina-2, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), GAP43, sinaptofisina, sinaptotagmina (P21707), syntaxina; péptidos postsinápticos–PSD95, PSD93, receptor NMDA (incluyendo todas las subcategorías); biomarcadores de desmielinización–péptidos básicos de la mielina (MBP), péptidos proteolíticos de la mielina, péptidos gliales–GFAP (P47819), péptidos de la proteína disulfuro isomerasa (PDI-P04785); biomarcadores de neurotransmisor–biomarcadores colinérgicos: péptidos de acetilcolinesterasa, péptido de colina acetiltransferasa; biomarcadores dopaminérgicos–péptidos de tirosina hidroxilasa (TH), péptidos fosfo-TH, péptidos DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos–péptidos de dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores serotoninérgicos–péptidos de triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos–péptidos de glutaminasa, péptidos de glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos–péptidos de GABA transaminasa (4-aminobutirato-2-cetoglutarato transaminasa [GABAT]), péptidos de ácido glutámico descarboxilasa (GAD25, 44, 65, 67); receptores de neurotransmisor–péptidos del subtipo beta-adrenoreceptor, (por ejemplo, beta (2)), péptidos del subtipo alfa-adrenoreceptor, (por ejemplo, alfa (2c)), péptidos de receptores GABA (por ejemplo, GABA (B)), péptidos del

receptor de glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), péptidos de la subunidad del receptor NMDA (por ejemplo, NR1A2B), péptidos de la subunidad del receptor del glutamato (por ejemplo, GluR4), péptidos de los receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), péptidos de los receptores de dopamina (por ejemplo, D4), péptidos de los receptores muscarínicos de ACh (por ejemplo, M1), péptidos del receptor nicotínico de la acetilcolina (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores—péptidos del transportador de norepinefrina (NET), péptidos del transportador de dopamina (DAT), péptidos del transportador de serotonina (SERT), péptidos del transportador vesicular (VMAT1 y VMAT2), péptidos del transportador GABA/transportador de aminoácidos inhibidores vesiculares (VIAAT/VGAT), péptidos del transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), péptidos del transportador vesicular de acetilcolina, péptidos del transportador de colina (por ejemplo, CHT1); otros biomarcadores de péptidos son, a título no limitativo, péptidos de vimentina (P31000), péptidos CK-BB (P07335), péptidos 14-3-3-epsilon (P42655), péptidos MMP2 o péptidos MMP9.

Los biomarcadores de enzimas proteolíticas presentan una actividad específica para las proteínas nerviosas; por ejemplo, los ejemplos no excluyentes que se recogen en la Tabla 1, desde alrededor de 1 g hasta alrededor de 500 µg por 1 mg de proteína sustrato.

Experimentalmente se ha demostrado que si la cantidad de enzima se mantiene constante y la concentración de sustrato se va incrementando de forma gradual, la velocidad de reacción aumentará hasta alcanzar un máximo. Tras pasado ese punto, el aumento de la concentración del sustrato no aumentará la velocidad (delta A/delta T). Se ha especulado con que, cuando se alcanza esta velocidad máxima, toda la enzima disponible se ha convertido en ES, el complejo de sustrato enzimático. Este punto en el gráfico se denomina $V_{m\acute{a}x}$. Utilizando esta velocidad máxima y la ecuación (7), Michaelis desarrolló una serie de expresiones matemáticas para calcular la actividad enzimática en términos de velocidad de reacción a partir de datos de laboratorio medibles.



La constante de Michaelis K_m se define como la concentración de sustrato a la cual la velocidad alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. Utilizando esta constante y el hecho de que la K_m también puede definirse como:

$$K_m = \frac{K_{+1} + K_{-1}}{K_{-2}} = [S] \text{ a } v_{m\acute{a}x}/2$$

donde K_{+1} , K_{-1} y K_{-2} son las constantes de velocidad de la ecuación (7). Michaelis desarrolló la siguiente fórmula:

$$v_t = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]}$$

donde

- V_t = velocidad en un momento determinado
- $[S]$ = concentración de sustrato en ese momento
- $V_{m\acute{a}x}$ = velocidad más elevada con esta serie de condiciones experimentales (pH, temperatura, etc.)
- K_m = constante de Michaelis para la enzima concreta que se esté investigando

Se han determinado las constantes de Michaelis de muchas de las enzimas utilizadas con frecuencia. Una K_m pequeña indica que la enzima sólo requiere una pequeña cantidad de sustrato para saturarse. Así pues, la velocidad máxima se alcanza con concentraciones de sustrato relativamente bajas. Una K_m elevada indica la necesidad de altas concentraciones de sustrato para lograr la máxima velocidad de reacción.

Suele considerarse que el sustrato con la menor K_m sobre el que la enzima actúa como catalizador es el sustrato natural de la enzima, aunque esto no es cierto para todas las enzimas.

Sin desear resultar vinculados por la teoría, en caso de lesión, la integridad estructural y funcional de la membrana celular, así como la barrera hematoencefálica, quedarán comprometidas. Las proteínas, los péptidos o los fragmentos de éstos que sean específicos del cerebro o que aparezcan en altas concentraciones en el mismo son liberados en el espacio extracelular y, posteriormente, en el LCR y la sangre. Las enzimas proteolíticas específicas de estos sustratos se activarán e hidrolizarán dicho sustrato. La detección de los biomarcadores de una o más de estas enzimas proteolíticas es indicativo de lesión neural y/u orgánica.

En una forma de realización preferida, la detección de por lo menos una enzima proteolítica específica para péptidos nervioso liberados por células nerviosas y/u órganos que hayan sufrido lesiones en el LCR, la sangre o en otros

líquidos biológicos será indicativo de la gravedad de la lesión cerebral y/o del control de la evolución de la terapia. Preferentemente, los marcadores de enzimas proteolíticas se detectarán durante las primeras fases de la lesión. Un aumento en la cantidad de fragmentos de biomarcadores de enzimas proteolíticas o de derivados de éstos en un paciente que sufriera una lesión neural o un trastorno neuronal en comparación con una persona sana normal será indicativo de lesiones neurales y/o trastornos neuronales.

En una forma de realización preferida, la invención suministra biomarcadores que son indicativos de lesiones cerebrales traumáticas, daños neuronales al SCN o SNP, trastornos nerviosos, daños cerebrales, daños nerviosos provocados por la adicción a las drogas o al alcohol, o enfermedades asociadas con el cerebro o el sistema nervioso, como por ejemplo que afecten al sistema nervioso central. Las enzimas proteolíticas se activan como consecuencia del daño provocado sobre órganos, como por ejemplo: corazón, cerebro, hígado, riñones; neuronas, sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. Preferentemente, las enzimas proteolíticas se activan e hidrolizan las proteínas diana, los péptidos y fragmentos de éstos como consecuencia de lesiones neurales y orgánicas. Las proteínas diana comprenden de manera no limitativa, proteínas, péptidos o fragmentos de éstos asociados con células neuronales, células cerebrales o cualquier célula que esté presente en el cerebro y en el sistema nervioso central, además de en órganos como el corazón, el hígado, los riñones, etc. Algunos ejemplos de enzimas proteolíticas que se detectan en las lesiones nerviosas y/u orgánicas incluyen (en orden alfabético en el documento original): acromopeptidasa, aminopeptidasa, Ancrod, enzima convertidora de la angiotensina, bromelaína, calpaína, calpaína I, calpaína II, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa G, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa W, carboxipeptidasa Y, caspasa, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, caspasa 13, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina G, catepsina H, catepsina L, quimopapaína, quimasa, quimotripsina, α -clostripaína, colagenasa, complemento C1r, complemento C1s, factor del complemento D, factor del complemento I, cucumisina, dipeptidilpeptidasa IV, elastasa leucocítica, elastasa pancreática, endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, enteroquinasa, factor Xa, ficina, furina, granzima A, granzima B, proteasa del VIH, igasa, calicreína de tejido, quinasa, leucina aminopeptidasa (general), leucina aminopeptidasa citosólica, leucina aminopeptidasa microsómica, metaloproteasa de matriz, metionina aminopeptidasa, neutrasa, papaína, pepsina, plasmina, prolidasa, pronasa E, antígeno específico de la próstata, proteasa, proteasa S proteosómica, proteinasa, proteinasa 3, proteinasa A, proteinasa K, proteína C, piroglutamato aminopeptidasa, renina, rennina, trombina, activador tisular del plasminógeno, troponinas, tripsina, triptasa, uroquinasa.

La detección de por lo menos, una enzima proteolítica que tiene un péptido nervioso como sustrato en el LCR, la sangre o en otro líquido biológico es diagnóstico de la gravedad del daño tras una serie de lesiones en el SNC, como por ejemplo apoplejía, lesiones en la médula espinal o neurotoxicidad provocada por el abuso del alcohol o de otras sustancias (por ejemplo, éxtasis, metanfetaminas, etc.).

El SNC comprende muchos péptidos específicos del cerebro y con alta presencia en éste que, preferentemente, serán sustratos para biomarcadores de las enzimas proteolíticas en el diagnóstico de las lesiones cerebrales o nerviosas, fragmentos de trastornos nerviosos y derivados de éstos. Algunos ejemplos no excluyentes de sustratos para enzimas proteolíticas se muestran en la Tabla 1, mientras que la Tabla 2 muestra ejemplos no excluyentes de lugares no evidentes y únicos de segmentación de las proteínas tisulares producida por el ataque de las proteasas. (Por ejemplo, números de secuencia: 10, 67, 68). Por ejemplo, los biomarcadores de enzimas proteolíticas son específicos de proteínas específicas nerviosas, y pueden incluir péptidos axonales como péptidos de neurofilamento pesado (NF-200), neurofilamento medio (NF-160), neurofilamento ligero (NF-68) y péptidos precursores amiloides; péptidos dendríticos como la alfa-tubulina, la beta tubulina, MAP-2A/B/C, tau, dinamina-1, dinactina; y péptidos hallados en el soma (cuerpo celular) que incluyen péptidos de ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1), péptidos PEBP, péptidos de enolasa específica neuronal (NSE), péptidos NeuN, péptidos thy 1.1, péptidos priónicos y de Huntington. También hay péptidos que se encuentran en una localización presináptica y postsináptica. Además, diferentes tipos de neuronas muestran distintas proteínas de vía enzimática específicas de neurotransmisor a partir de las que se identifican los péptidos. Por ejemplo, la acetilcolina esterasa se encuentra sólo en las neuronas colinérgicas, mientras que la tirosina hidroxilasa (TH) es exclusiva de las neuronas dopaminérgicas. Otros péptidos de vía enzimática específica de neurotransmisor incluyen los péptidos de la dopamina beta-hidroxilasa (DbH) en las neuronas noradrenérgicas, péptidos de la triptófano hidroxilasa (TrH) en las neuronas serotoninérgicas, péptidos de la glutaminasa y la glutamina sintentasa en las neuronas glutamatérgicas, y péptidos de la GABA transaminasa y de la ácido glutámico descarboxilasa en las neuronas GABAérgicas. Además, los péptidos derivados de proteínas como GFAP y disulfuro isomerasa (PDI) sólo se sintetizan en las células gliales del SNC, una característica que podría aprovecharse para delimitar mejor el alcance del daño en el SNC. Por tanto, la detección de uno o más biomarcadores de enzimas proteolíticas es un elemento indicativo de la célula dañada, de la gravedad de la lesión y del tipo de ésta. Por ejemplo, los tumores pierden antígenos, de modo que la activación de enzimas proteolíticas específicas para estos antígenos sirve como diagnóstico de un tumor y del tipo de tumor.

En otra forma de realización preferida, la invención permite la detección cuantitativa de los daños provocados al SNC, el SNP y/o daños cerebrales a nivel subcelular. En función del tipo y de la gravedad de la lesión, las neuronas pueden sufrir daños en regiones celulares específicas. Los ejemplos no limitativos de sustratos para biomarcadores de enzimas proteolíticas, como los péptidos dendríticos, fragmentos y derivados de éstos comprenden de manera no limitativa: MAP-2A/B, MAP-2C. Además, la detección de diferentes biomarcadores no solo se diferencia, por

ejemplo, entre los daños axonales o dendríticos, sino que permite la evaluación de patologías sinápticas, daños específicos sobre elementos del terminal presináptico y densidad postsináptica.

5 La detección de determinados biomarcadores de enzimas proteolíticas es un elemento indicativo del tipo específico de célula afectada tras la lesión, puesto que las neuronas y las células gliales presentan proteínas distintas.

10 La capacidad de detectar y controlar los niveles de estos marcadores de enzimas proteolíticas tras una lesión del SNC mejora la capacidad diagnóstica, puesto que permite a los médicos (1) determinar la gravedad de la lesión en pacientes con diversas lesiones del SNC, (2) controlar a los pacientes en busca de signos de lesiones secundarias del SNC que pudieran provocar estos cambios celulares y (3) controlar los efectos del tratamiento mediante el análisis de estos péptidos en el LCR o en la sangre. Al contrario que en otras enfermedades orgánicas en las que el diagnóstico rápido de los biomarcadores secundarios se revelan como de un valor incalculable de cara a la acción a emprender para tratar la enfermedad, no existen pruebas diagnósticas definitivas tan rápidas para las lesiones cerebrales traumáticas o isquémicas que, quizá, podrían suministrar a los médicos marcadores neuroquímicos cuantificables para ayudarles a determinar la gravedad de la lesión, la patología anatómica y celular de la lesión y la aplicación del manejo y los tratamientos médicos adecuados.

20 En comparación con los productos que existen actualmente, la invención ofrece importantes ventajas y beneficios: en primer lugar, la identificación de biomarcadores neuronales permite un diagnóstico más rápido y más barato de la gravedad de la lesión que los dispositivos de diagnóstico existentes, como la tomografía computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RMN). La invención también permite la detección cuantitativa y la evaluación de alto contenido de los daños sobre el SNC a nivel subcelular. La invención también permite la identificación del tipo específico de célula afectada (por ejemplo, neuronas); además, los niveles de estos péptidos específicos del cerebro y con una alta concentración en éste ofrecen una información más precisa sobre la gravedad de la lesión que cualquier otra cosa que se encuentre actualmente en el mercado.

30 En otra forma de realización preferida, el daño de la célula nerviosa en un sujeto es analizado mediante (a) el suministro de una muestra biológica aislada de un sujeto sospechoso de tener células nerviosas dañadas; (b) la detección en la muestra de la presencia o de la cantidad de por lo menos un marcador seleccionado a partir de una o más proteínas neurales; y (c) la correlación de la presencia o la cantidad del marcador con la presencia o el tipo de daño en la célula nerviosa del sujeto.

35 La detección y la identificación de biomarcadores de enzimas proteolíticas es posible mediante varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ensayos fluorogénicos o colorimétricos. Están comercializados ensayos para la detección de diferentes enzimas; un ejemplo es el ensayo fluorogénico de Proteus BioSciences Inc. (San Diego, Calif., EUA), Sigma (St. Louis, Mo., EUA), que consiste en la detección fluorescente de la proteína activa caspasa-1. El AFC (7-amino-4-trifluorometilcumarina*) es un compuesto fluorogénico sintético que al ser hidrolizado por la enzima genera un producto que puede medirse mediante un fluorímetro o un espectrofotómetro. La placa puede leerse en A₃₈₀ en el caso de la detección cromogénica o en Em₅₁₀₋₅₄₀ (excitación a 390-400 nm) para la fluorogénica

40 Resulta preferido cualquier animal que produzca expresamente enzimas proteolíticas. Preferentemente, el sujeto será un mamífero, como por ejemplo un ser humano, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un primate, una rata o un ratón; o bien otros vertebrados como aves, peces y reptiles. Más preferentemente, el sujeto será un ser humano, y resultará particularmente preferido que se sospeche que los sujetos presenten lesiones traumáticas o no traumáticas en el sistema nervioso o que se encuentren en riesgo de desarrollarlas, como por ejemplo víctimas de lesiones cerebrales provocadas por traumatismos (por ejemplo, heridas de disparo, accidentes de automóvil, accidentes deportivos o síndrome del niño sacudido), episodios isquémicos (por ejemplo, apoplejía, hemorragia cerebral o paro cardíaco), trastornos neurodegenerativos (como enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson; enfermedades priónicas u otras formas de demencia), epilepsia, abuso de sustancias (por ejemplo, de anfetaminas, éxtasis/MDMA o etanol) y patologías del sistema nervioso periférico, como neuropatía diabética, neuropatía provocada por quimioterapia y daño neuropático.

TABLA 1. Ejemplos de nuevas proteínas tisulares vulnerables al ataque proteolítico

Formas reducidas de biomarcadores (basadas en los datos Powerblot)	Número de registro humano	Número de registro de rata (ratón)
a/b-SNAP	P54920,QH115	P54921
Adaptina	P17426	
AKAP220	Q9UKA4	Q62924
Alfa y beta-tubulinas	P02551,P04691	Q68FR8,P24636
Alfa sinucleína	P37840	P37377
Anfifisina	P49418	O08838
Arp3	P61158	Q99J72(ratón)
ASAP1 (ARF proteína activadora de la GTPAasa)	Q9ULH1	Q9QWY8(ratón)

ATP Sintasa a	P1599	
Bad	Q92934	O35147
Bax (tBax)	Q07812,Q07814	Q63690
Bcl(tBcl2)	P10415	P49950
BetaIII-espectrina	O15020	
BetaII-espectrina	Q01082	
BRaf	P15056	
BRMP2	O08539	
cAIP's	AAN23755	
CalgranulinaB	B31848	
Quinasa dependiente de calmodulina	CAI13791,Q5SQZ3,Q13554	P11275
Calpastatina	NP_001741	NP_445747
CaMPKII	CAI13791,Q13554	P11275,NP_037052
CaMPKIV	NP_001735	NP_036859
Catenina/pp120	P30999	
β Catenina	P35222	Q9WU82
Catepsina L	CAI16307	
cCbl	Q16773	Q08415
Cadena pesada clatrina	P11442	
Cofilina	P23528	P45592
colágeno, tipo IV, alfa 6	AAP35892	
CtBP1	Q13363	Q9Z2F5
DRBP76	Q12906	
Dinactina	Q14203, Q13561, O00399	P28023, Q6AYH5
Dinamina	Q05193, P50570, Q9UQ16	P21575, P39052, Q08877
Endopeptidasa	P42676	
Fibronectina	O088871	
GABABR2	O75899	O88871
Receptores de glutamato (AMPA/kainato)	NP_000818	NP_113796
Glucogenofosforilasa BB	P11216	P53534
GSPT2	Q8IYD1	NP_032205 ratón
hPrp17	O60508	Q8BJF8 ratón
Huntingtina	P42858	
Integrina, beta 3	P05106	
Ki67	P46013	
Lamina A, B, C	P02545;	
Lamininas		
MCalerina		
MEF2D	Q14814	Q66HL8
Receptores de glutamato metabotrópico	NP_000829,NP_000832	NP_058707,NP_073157
mGluR1	Q13255	P23385
Munc18	Q02410, Q99767, O96018	
Proteína básica de mielina (tMBP)	MBHUB	P02686
Proteína específica de oligodendrocito de mielina (MOSP)	AAC25187	
Cadena ligera de miosina	O14950	P02600
MYPT1	O14974	Q10728
NCK	P16333, O43639	
Nek2	P51955	Q91XQ1
Proteína neuronal 22(NP22); transgelina-3	NP_037391	AAL66341
Proteína neuronal 25(NP25)	AAP97165	NP_113864
NMDAR1 (NR1)	NP_067544	NP_058706 AAB29181; P35439
NMDAR2 (NR2A, 2B, 2C, 2D)	Q5IS45; NP_000825; NP_000826; NP_000827	Q00959; Q00960;
NMDAR3, NMDAR 4 (NR3, NR4)	AAB60368; Q91ZU9	Q9R1M7
Óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS)	G01946	NP_032738
Proteína de Fusión sensible N-etilmaleimida (NSF)	P46459	NP_542152
Nucleoporina NSP1	Q9Y2X4	AAB33384
P150Glued	P28023	AAB24566
Proteína activadora Rho-GTPasa 5 (p190-B)	Q13017	P84107
P55Cdc	Q12834	Q62623
PMCA2	Q01814	P11506

Profilina	P07737, P35080, P60673, Q8NHR9	P62963, Q9EPC6
PSD93	–	AAC52643
Rabfilina 3A	Q9Y2J0	P47709
Precursor del receptor de proteína estimuladora de macrófago (RONa)	Q04912	–
Miembro 1 de la familia de proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich (SCAR1)	Q92558	–
Proteína 1 con factor S-II de elongación de transcripción (SII/TFIIS)	P23193	Q63799
Smac/Diablo	Q9NR28	Q9JIQ3 ratón
SNAP25	P60880	P60881
Estriatina	O43815	P70483
Sinapsina I	P17600	P09951
Sinapsina II	Q92777	Q63537
Sinapsina III	O14994	NP_038750
Sinaptojanina-I, II	Q62910, O15056; O43426	Q62910, O55207
Sinaptotagmina-I	P21579	P21707
TNIK	Q9UKE5	P83510 ratón
αPKC-	P17252	P05696
βPKC-	P05771	P68403
εPKC-	P24723	Q64617
γPKC-	P05129	P63319

Tal y como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona la etapa que consiste en correlacionar la presencia o la cantidad de uno o más biomarcadores de enzimas proteolíticas con la gravedad y/o el tipo de lesión de la célula nerviosa. En una forma de realización preferida, la detección de un biomarcador de una enzima proteolítica puede estar correlacionada con la presencia de una proteína sustrato para la que el biomarcador presente una actividad específica, preferentemente, de alrededor de 1 µg hasta unos 500 µg por 1 mg de proteína sustrato que vaya a proteolizarse en órganos lesionados o estresados (*in vivo*) con arreglo a un período que va de minutos a días, o bien la utilización *in vitro* de una mezcla purificada de proteasa-proteína sustrato/proteína con una proporción de 1/10.000 a 1/20 en un período que oscila entre minutos y horas. Por ejemplo, la cantidad de péptidos neurales está directamente relacionada con la gravedad de la lesión del tejido nervioso, puesto que una lesión de mayor severidad daña un mayor número de células nerviosas, lo cual, a su vez, provoca la acumulación de una mayor cantidad de péptidos neurales en la muestra biológica (por ejemplo, LCR). Para averiguar si una lesión de célula nerviosa desencadena una muerte celular apoptótica, oncótica (necrótica) o de tipo 2 (autofágica) se pueden analizar los marcadores únicos de la enzima proteolítica que presentan una elevada actividad específica para los péptidos liberados en el líquido biológico como respuesta a cada fenotipo de muerte celular. Los péptidos también pueden detectarse a partir de los múltiples tipos de células que se encuentran en el sistema nervioso; por ejemplo, astrogliá, oligodendrocitos, células microgliales, células de Schwann, fibroblastos, neuroblastos, células madre neurales y neuronas maduras. Además, las neuronas maduras se diferencian en subtipos concretos en los que se fusiona un transmisor neural primario, como los de tipo colinérgico (nicotínico y muscarínico), glutamatérgico, gabaérgico, serotoninérgico o dopaminérgico. Cada uno de estos subtipos neuronales expresa proteínas neurales únicas, como aquellas destinadas a la síntesis, al metabolismo y al transportador y receptor de cada sistema neurotransmisor único (Tabla 1 a continuación). Por último, en una célula nerviosa hay estructuras subcelulares que pueden ser identificadas por proteínas neurales exclusivas (dendríticas, axonales, de las vainas de mielina, de terminales presinápticos y de densidad postsináptica). Si se analiza la liberación de los péptidos exclusivos de cada una de estas regiones, el daño subcelular puede controlarse, definirse y correlacionarse con la detección de biomarcadores de enzimas proteolíticas que aparecen a consecuencia de una lesión cerebral.

Los biomarcadores de la invención pueden detectarse en una muestra mediante cualesquier medios. Por ejemplo, los inmunoensayos comprenden de manera no limitativa, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos en los que se utilizan técnicas como transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo por inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos del tipo «sándwich», ensayos por inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina con difusión en gel, ensayos por inmunodifusión, fragmentos de inmunoensayos fluorescentes y derivados de éstos. Estos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora en su totalidad a la presente memoria como referencia).

Identificación de nuevos marcadores

Puede ser obtenida una muestra biológica de un paciente con lesiones neurales. Como comparación se utilizan muestras biológicas con biomarcadores de otros pacientes y de sujetos de control (es decir, personas normales sanas de la misma edad, sexo y condición física). Las muestras biológicas se extraen tal y como se expone anteriormente. Preferentemente, la muestra se preparará antes de la detección de biomarcadores. Típicamente, la

5 preparación implica el fraccionamiento de la muestra y la recogida de las fracciones que deben contener los biomarcadores. Los métodos de fraccionamiento previo incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía de heparina, la cromatografía de afinidad, la extracción secuencial, la electroforesis en gel y la cromatografía de líquidos. Los analitos también pueden modificarse antes de la detección. Estos métodos son útiles para simplificar la muestra que va a analizarse; por ejemplo, antes del análisis puede ser útil eliminar de la sangre proteínas muy abundantes como la albúmina.

10 Una muestra puede fraccionarse previamente según el tamaño de las proteínas presentes en la misma mediante la cromatografía de exclusión por tamaño. En el caso de una muestra biológica de pequeña cantidad, se utilizará preferentemente una columna de centrifugado de selección por tamaño. En general, la primera fracción que se eluye a partir de la columna («fracción 1») presenta el porcentaje más alto de proteínas de alto peso molecular; la fracción 2 tiene un porcentaje más pequeño de proteínas de alto peso molecular; la fracción 3 tiene un porcentaje aún menor de proteínas de alto peso molecular; la fracción 4 tiene la menor cantidad de proteínas grandes, y así sucesivamente. Cada fracción puede ser analizada posteriormente mediante inmunoensayos, espectrometría de iones en fase gaseosa, o fragmentos y derivados de éstos, para detectar los marcadores.

20 Una muestra puede fraccionarse previamente mediante cromatografía de intercambio de aniones. La cromatografía de intercambio de aniones permite el fraccionamiento previo de las proteínas de una muestra aproximadamente en función de su carga. Por ejemplo, puede utilizarse una resina Q de intercambio aniónico (por ejemplo, Q HyperD F, Biosepra), y una muestra puede eluirse secuencialmente con eluyentes de diferentes pH. La cromatografía de intercambio de aniones permite separar los biomarcadores de una muestra que presentan una carga más negativa que otros tipos de biomarcadores. Las proteínas que se eluyen mediante un eluyente de pH alto probablemente tendrán una débil carga negativa, mientras que es posible que una fracción eluida con un eluyente de pH bajo tenga una fuerte carga negativa. Así pues, además de reducir la complejidad de una muestra, la cromatografía de 25 intercambio de aniones separa proteínas de acuerdo con sus características de unión.

30 Una muestra puede fraccionarse previamente con cromatografía de heparina. La cromatografía de heparina permite el fraccionamiento previo de los marcadores en una muestra, también sobre la base de la afinidad con la heparina y las características de carga. La heparina, un mucopolisacárido sulfatado, se unirá a los marcadores con regiones cargadas positivamente, y una muestra puede ser eluida posteriormente con eluyentes que presenten pH o concentraciones de sales diferentes. Los marcadores eluidos con un eluyente de pH bajo tienen más posibilidades de tener una carga ligeramente positiva, mientras que los marcadores eluidos con un eluyente de pH alto tienen más posibilidades de tener una carga fuertemente positiva. Así pues, la cromatografía de heparina también reduce la complejidad de una muestra y separa marcadores en función de sus características de unión.

35 Una muestra puede fraccionarse previamente aislando proteínas que presenten una característica concreta, como por ejemplo que estén glucosiladas. A título de ejemplo, una muestra de LCR puede fraccionarse pasando la muestra por una columna cromatográfica de lectina (que tiene una alta afinidad por los azúcares). Las proteínas glucosiladas se unirán a la columna de lectina, y las proteínas no glucosiladas la atravesarán sin quedar retenidas. Posteriormente, las proteínas glucosiladas son eluidas de la columna de lectina con un eluyente que contiene 40 azúcar, por ejemplo N-acetil-glucosamina, y estarán disponibles para un análisis adicional.

45 Así pues, hay muchas formas de reducir la complejidad de una muestra aprovechando las propiedades de unión de las proteínas contenidas en ella o bien otras características de éstas.

50 Una muestra puede fraccionarse utilizando un protocolo de extracción secuencial. En la extracción secuencial, una muestra se expone a una serie de adsorbentes para extraer diferentes tipos de biomarcadores de una muestra. Por ejemplo, una muestra se aplica sobre un primer adsorbente para extraer determinadas proteínas, y se recoge un eluyente que contiene proteínas no adsorbentes (es decir, proteínas que no se unieron al primer adsorbente). Posteriormente, la fracción se expone a un segundo adsorbente, el cual extrae otras proteínas de la fracción. Esta segunda fracción es expuesta posteriormente a un tercer adsorbente, y así sucesivamente.

55 Para realizar la extracción secuencial de una muestra puede utilizarse cualquier material o método adecuado. Por ejemplo, puede utilizarse una serie de columnas de centrifugado que consten de diferentes adsorbentes. En otro ejemplo, puede utilizarse un sistema multipocillo que cuente con diferentes adsorbentes en la parte inferior. En otro ejemplo, la extracción secuencial puede llevarse a cabo en una sonda adaptada para utilizarse en un espectrómetro de iones en fase gaseosa, cuya superficie contendrá adsorbentes que se unirán a los biomarcadores. La muestra se aplica sobre un primer adsorbente de la sonda, que posteriormente se lava con un eluyente; los marcadores que no se unen al primer adsorbente se eliminarán con un eluyente. Los marcadores que permanezcan en la fracción 60 podrán aplicarse a un segundo adsorbente de la sonda, y así sucesivamente. La ventaja de llevar a cabo la extracción secuencial en una sonda de espectrómetro de iones en fase gaseosa es que los marcadores que se unen a los diversos adsorbentes en cada fase del protocolo de extracción secuencial pueden analizarse directamente con un espectrómetro de iones en fase gaseosa.

65 Los biomarcadores de una muestra pueden separarse mediante electroforesis de alta resolución, como por ejemplo electroforesis bidimensional en geles. Una fracción que contenga un marcador puede aislarse y analizarse

adicionalmente mediante espectrometría de iones en fase gaseosa; preferentemente, se utilizará la electroforesis bidimensional en geles para generar una serie bidimensional de puntos de biomarcadores, incluyendo uno o más marcadores. Ver, por ejemplo, Jungblut y Thiede, *Mass Spectr. Rev.* 16:145-162 (1997).

5 La electroforesis bidimensional en geles puede llevarse a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Deutscher ed., *Methods In Enzymology* vol. 182. Típicamente, los biomarcadores de una muestra se separan, por ejemplo, mediante el punto isoelectrico, en el cual los biomarcadores de la muestra se separan en un gradiente de pH hasta que alcanzan un punto en el que su carga neta es cero (es decir, el punto isoelectrico). La primera fase de separación genera una serie unidimensional de biomarcadores. Los biomarcadores de esta serie unidimensional se separan utilizando una técnica generalmente distinta de la utilizada en la primera fase de la separación. Por ejemplo, en la segunda dimensión, los biomarcadores separados por el punto isoelectrico vuelven a ser separados mediante un gel de poliacrilamida, utilizando por ejemplo el método de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel SDS-PAGE permite una separación adicional basada en la masa molecular de los biomarcadores. Típicamente, la electroforesis bidimensional en geles puede separar químicamente diferentes marcadores en un intervalo de masa molecular de entre 1000 y 200.000 Da dentro de mezclas complejas.

Los biomarcadores de la serie bidimensional pueden detectarse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica; por ejemplo, los biomarcadores en un gel pueden marcarse o tefñirse (por ejemplo, azul de Coomassie o tinción de plata). Si la electroforesis en geles genera puntos que se ajustan al peso molecular de uno o más marcadores de la invención, dicho punto puede analizarse con densitometría o una espectrometría de iones en fase gaseosa. Por ejemplo, los puntos pueden extraerse del gel y analizarse mediante espectrometría de iones en fase gaseosa. Como alternativa, el gel que contiene los biomarcadores puede ser transferido a una membrana inerte mediante la aplicación de un campo eléctrico. A continuación, el punto sobre la membrana que corresponda aproximadamente al peso molecular de un marcador puede analizarse mediante espectrometría de iones en fase gaseosa. En la espectrometría de iones en fase gaseosa, los puntos pueden analizarse con cualquier técnica adecuada, como MALDI o SELDI.

Antes del análisis de la espectrometría de iones en fase gaseosa, puede ser deseable separar los biomarcadores del punto en fragmentos más pequeños utilizando reactivos de hidrolización, como proteasas (por ejemplo, tripsina). La digestión de los biomarcadores en fragmentos pequeños facilita la huella dactilar correspondiente a la masa de los biomarcadores en el punto, que puede utilizarse para determinar la identidad de los marcadores si así se desea.

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) puede utilizarse para separar una mezcla de biomarcadores en una muestra a partir de sus diferentes propiedades físicas, como polaridad, carga y tamaño. Los cromatógrafos HPLC suelen constar de un reservorio de fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector. Los biomarcadores presentes en la muestra se separan inyectando una parte alícuota de la muestra en la columna; los diferentes biomarcadores de la mezcla atraviesan la columna a distintas velocidades debido a las diferencias en su comportamiento de partición entre la fase líquida móvil y la fase estacionaria. Puede recogerse una fracción que se ajuste al peso molecular y/o propiedades físicas de uno o varios marcadores. Posteriormente, la fracción puede ser analizada mediante espectrometría de iones en fase gaseosa para detectar marcadores.

Opcionalmente un marcador puede modificarse antes del análisis para mejorar su resolución o determinar su identidad. Por ejemplo, los marcadores pueden estar sujetos a una digestión proteolítica antes del análisis. Puede utilizarse cualquier proteasa. Las proteasas, como la tripsina, que suelen separar los marcadores en un número discreto de fragmentos, son especialmente útiles; Los fragmentos que se derivan de la digestión actúan como una huella de los marcadores, permitiendo así su detección de forma indirecta. Esto resulta particularmente útil cuando concurren marcadores con masas moleculares similares que podrían resultar confusos para el marcador en cuestión. Asimismo, la fragmentación proteolítica es útil para los marcadores con alto peso molecular porque los marcadores más pequeños se resuelven más fácilmente mediante espectrometría de masas. En otro ejemplo, los biomarcadores pueden modificarse para mejorar la resolución de la detección. Por ejemplo, la neuraminidasa puede utilizarse para eliminar residuos de ácido siálico terminales generados a partir de glucoproteínas para mejorar la unión con un adsorbente aniónico y mejorar así la resolución de la detección. En otro ejemplo, los marcadores pueden modificarse mediante el acoplamiento de una etiqueta de un peso molecular concreto que se una específicamente a marcadores moleculares, distinguiéndolos aún más. Opcionalmente, tras detectar esos marcadores modificados, la identidad de los marcadores puede concretarse más comparando las características físicas y químicas de los marcadores modificados con una base de datos de proteínas (por ejemplo, SwissProt, MASCOT).

Tras la preparación, los biomarcadores de una muestra suelen capturarse en un sustrato para su detección. Los sustratos tradicionales incluyen las placas recubiertas de anticuerpos de 96 pocillos o membranas de nitrocelulosa que se exponen después a sondas para comprobar la presencia de proteínas. Preferentemente, los biomarcadores se identificarán utilizando inmunoensayos, tal y como se describe anteriormente; no obstante, los métodos preferidos también incluyen el uso de biochips. Preferentemente, los biochips serán biochips de proteínas para la captura y detección de éstas. En el sector se describen muchos biochips de proteínas. Entre éstos se incluyen, por ejemplo, biochips de proteínas producidos por Packard BioScience Company (Meriden Conn., EUA), Zyomyx (Hayward,

Calif., EUA) y Phyllos (Lexington, Mass., EUA). En general, los biochips de proteínas constan de un sustrato con una superficie; a la superficie de dicho sustrato se une un reactivo de captura o un adsorbente. Con frecuencia, la superficie suele constar de una variedad de emplazamientos direccionables, cada uno de los cuales tiene unido el reactivo de captura. El reactivo de captura puede ser una molécula biológica, como un polipéptido o un ácido nucleico, que capture otros biomarcadores de forma específica. Como alternativa, el reactivo de captura puede ser un material cromatográfico, como un material de intercambio aniónico o un material hidrofílico. Los ejemplos de estos biochips de proteínas se describen en las siguientes patentes o solicitudes de patentes: patente US nº 6.225.047 (Hutchens y Yip, «Use of retentate chromatography to generate difference maps», 1 de mayo de 2001), publicación internacional WO 99/51773 (Kuimelis y Wagner, «Addressable protein arrays», 14 de octubre de 1999), publicación internacional WO 00/04389 (Wagner et al., «Arrays of protein-capture agents and methods of use thereof», 27 de julio de 2000), publicación internacional WO 00/56934 (Englert et al., «Continuous porous matrix arrays», 28 de septiembre de 2000).

En general, una muestra que contiene los biomarcadores se sitúa sobre la superficie activa de un biochip durante el tiempo suficiente como para permitir la unión. Posteriormente, las moléculas no unidas son lavadas de la superficie utilizando un eluyente adecuado. En general, cuanto más restrictivo sea el eluyente, más fuerte deberá ser la unión de las proteínas para que puedan permanecer retenidas tras el lavado. A continuación, los biomarcadores de proteínas retenidos pueden detectarse con los medios apropiados.

Los analitos capturados en la superficie del biochip de proteínas pueden ser detectados mediante cualquier método conocido en la técnica. En la presente memoria se incluyen, por ejemplo, la espectrometría de masas, la fluorescencia, la resonancia de plasmones superficiales, la elipsometría y la microscopía de fuerza atómica. La espectrometría de masas, y en particular la espectrometría de masas SELDI, es un método especialmente útil para detectar los biomarcadores de esta invención.

Preferentemente, en las formas de realización de la invención se utilizará un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con desorción por láser; En la espectrometría de masas con desorción por láser, se introduce un sustrato o una sonda con marcadores en un sistema de entrada. Los marcadores sufren una desorción e ionización en su transición hacia la fase gaseosa mediante el láser de la fuente de ionización. Los iones generados son recogidos mediante una estructura óptica de iones y, posteriormente, en un analizador de masas de tiempo de vuelo, los iones son acelerados mediante un breve campo magnético de alto voltaje y liberados en una cámara de alto vacío. En el extremo más alejado de la cámara de alto vacío, los iones acelerados golpean una superficie detectora sensible en diferentes momentos. Puesto que el tiempo de vuelo depende de la masa de los iones, el tiempo transcurrido entre la formación de dichos iones y el impacto en el detector de iones puede utilizarse para identificar la presencia o la ausencia de marcadores de masa específica con respecto al índice de carga.

La espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por matriz, o MALDI-MS, es un método de espectrometría de masas que implica la utilización de una molécula absorbidora de energía, denominada frecuentemente matriz, para llevar a cabo una desorción de las proteínas que permanecen intactas en la superficie de una sonda. MALDI se describe, por ejemplo, en la patente US nº 5.118.937 (Hillenkamp et al.) y en la patente US nº 5.045.694 (Beavis y Chait). En la MALDI-MS, la muestra suele mezclarse con un material matricial y se coloca en la superficie de una sonda inerte. Algunos ejemplos de moléculas absorbedoras de energía son los derivados del ácido cinámico, el ácido sinapínico («SPA»), el ácido cianohidroxinámico («CHCA») y el ácido dihidroxibenzoico. Los expertos en la materia conocen otras moléculas adecuadas para la absorción de energía. La matriz se seca, formando cristales que encapsulan las moléculas de analito, y después estas moléculas de analito son detectadas mediante espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser. MALDI-MS es útil para detectar los biomarcadores de esta invención siempre que la complejidad de la muestra se haya reducido ostensiblemente utilizando los métodos de preparación que se describen anteriormente.

La espectrometría de masas con desorción/ionización por láser de superficie mejorada, o SELDI-MS, representa una mejora respecto a MALDI en lo que concierne al fraccionamiento y a la detección de las biomoléculas, como proteínas, en mezclas complejas. SELDI es un método de espectrometría de masas en el que las biomoléculas, como las proteínas, son capturadas en la superficie del biochip de proteínas mediante el uso de reactivos de captura que están unidos a éste. Típicamente, las moléculas no unidas son eliminadas de la superficie de la sonda antes del barrido mediante un proceso de lavado. SELDI se describe, por ejemplo, en: patente US nº 5.719.060 («Method and Apparatus for Desorption and Ionization of Analytes», Hutchens y Yip, 17 de febrero de 1998) patente US nº 6.225.047 («Use of Retentate Chromatography to Generate Difference Maps», Hutchens y Yip, 1 de mayo de 2001) y Weinberger et al., «Time-of-flight mass spectrometry», en Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers, ed., pp 11915-11918 John Wiley & Sons Chichester, 2000.

Los marcadores situados sobre la superficie del sustrato pueden someterse a un proceso de desorción e ionización mediante espectrometría de iones en fase gaseosa. Puede utilizarse cualquier espectrómetro de iones en fase gaseosa en la medida en que permita resolver los marcadores presentes en el sustrato. preferentemente, los espectrómetros de iones en fase gaseosa permitirán la cuantificación de marcadores.

En una forma de realización, un espectrómetro de iones en fase gaseosa es un espectrómetro de masas. En un espectrómetro de masas corriente, un sustrato o una sonda que cuenta con marcadores en su superficie se introduce en un sistema de entrada del espectrómetro de masas. A continuación, los marcadores son sometidos a una desorción por medio de una fuente de desorción como es un láser, un bombardeo de átomos rápidos, un plasma altamente energético, ionización por electroaspersión, ionización por termoaspersión, espectrometría de masas por iones secundarios líquidos, desorción de campo, etc. La muestra por desorción o la muestra volatilizada que se genera consta de iones preformados o neutros que se ionizan como consecuencia directa del proceso de desorción. Los iones generados son recogidos por una estructura óptica de iones y, posteriormente, un analizador de masas dispersa y analiza los iones que pasan. Los iones que salen del analizador de masas son detectados por un detector, el cual, posteriormente, traduce la información de los iones detectados en relaciones entre masa y carga. La detección de la presencia de marcadores u otras sustancias, por regla general, implicará la detección de la intensidad de la señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y el carácter de los marcadores unidos al sustrato. Cualquiera de los componentes de un espectrómetro de masas (por ejemplo, una fuente de desorción, un analizador de masa, un detector, etc.) puede combinarse con otro componente adecuado descrito en la presente memoria o con otros conocidos en la técnica en lo que respecta a las formas de realización de la invención.

En otra forma de realización, puede utilizarse un inmunoensayo para detectar y analizar marcadores en una muestra. Este método consta de las siguientes fases: (a) suministrar un anticuerpo que se une específicamente a un marcador; (b) poner una muestra en contacto con el anticuerpo; y (c) detectar la presencia de un complejo del anticuerpo unido al marcador en la muestra.

Para preparar un anticuerpo que se une específicamente a un marcador, pueden utilizarse marcadores purificados o las secuencias de sus ácidos nucleicos. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos correspondientes a los marcadores pueden obtenerse mediante la caracterización de estos marcadores. Los pesos moleculares de los fragmentos de digestión de cada marcador pueden utilizarse para buscar en las bases de datos, como por ejemplo en la SwissProt, secuencias que coincidan con los pesos moleculares de los fragmentos de digestión generados por diversas enzimas. Utilizando este método, las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de otros marcadores pueden identificarse si dichos marcadores son proteínas conocidas en las bases de datos.

Alternativamente, las proteínas pueden secuenciarse utilizando una secuenciación de escalera de dichas proteínas. Las escaleras de proteínas pueden generarse, por ejemplo, fragmentando las moléculas y sometiendo los fragmentos a una digestión enzimática o a otros métodos que eliminan secuencialmente un solo aminoácido del extremo del fragmento. Los métodos de preparación de escaleras de proteínas se describen, por ejemplo, en la publicación internacional WO 93/24834 (Chait et al.) y en la patente US nº 5.792.664 (Chait et al.). Posteriormente, la escalera se analiza mediante espectrometría de masas. La diferencia en las masas de los fragmentos de escalera identifica al aminoácido eliminado del extremo de la molécula.

Si los marcadores son proteínas no conocidas en las bases de datos, las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos pueden determinarse conociendo incluso una sola parte de la secuencia de aminoácidos del marcador. Por ejemplo, pueden elaborarse sondas degeneradas a partir de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del marcador. Estas sondas pueden utilizarse posteriormente para revisar una biblioteca genómica o de ADNc creada a partir de una muestra a partir de la cual se hubiera identificado inicialmente un marcador. Los clones positivos pueden identificarse y amplificarse, y sus secuencias de ADN recombinante pueden subclonarse utilizando técnicas bien conocidas. Ver, por ejemplo, *Current Protocols for Molecular Biology* (Ausubel et al., Green Publishing Assoc. y Wiley-Interscience 1989) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, NY 2001).

Utilizando los marcadores purificados o las secuencias de sus ácidos nucleicos, los anticuerpos que se unen específicamente a un marcador pueden prepararse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual* (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies. Principles and Practice* (2ª ed. 1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975). Estas técnicas comprenden de manera no limitativa, la preparación de los anticuerpos mediante una selección de éstos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fágicos o similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante la inmunización de conejos o ratones (ver, por ejemplo, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)).

Después de suministrar el anticuerpo, se puede detectar y/o cuantificar un marcador utilizando cualquiera de los ensayos inmunológicos de unión conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo enzimático (EIA) como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de transferencia Western o un ensayo de transferencia en ranura. Estos métodos también se describen, por ejemplo, en *Methods in Cell Biology Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7ª ed. 1991); y Harlow & Lane, anteriormente.

Generalmente, una muestra obtenida de un sujeto puede ponerse en contacto con el anticuerpo que se une al marcador de forma específica. Opcionalmente el anticuerpo puede fijarse a un soporte sólido para facilitar el lavado

y el posterior aislamiento del complejo antes de poner al anticuerpo en contacto con una muestra. Algunos ejemplos de soportes sólidos son cristal o plástico en forma, por ejemplo, de placa de microtitulación, varilla, esfera o microesfera. Los anticuerpos también pueden estar unidos a un sustrato de sonda o a una matriz de chips de proteínas, tal y como se describe anteriormente. Preferentemente, la muestra será una muestra de líquido biológico tomada de un sujeto. Los ejemplos de muestras de líquidos biológicos incluyen líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, plasma, células neuronales, tejidos, orina, lágrimas, saliva, etc. En una forma de realización preferida, el líquido biológico debe ser líquido cefalorraquídeo. La muestra puede diluirse con un eluyente adecuado antes de que entre en contacto con el anticuerpo.

Tras incubar la muestra con los anticuerpos, la mezcla se lavará y podrá detectarse el complejo de anticuerpo-marcador que se forme. Esto puede hacerse incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. Este reactivo de detección puede ser, por ejemplo, un segundo anticuerpo marcado de modo que sea una marca detectable. Las marcas detectables ejemplificativas incluyen esferas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), tintes fluorescentes, radiomarcaje, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras que suelen utilizarse en un ELISA), así como marcas colorimétricas como oro coloidal, o esferas de vidrio o plástico coloreados. Como alternativa, el marcador de la muestra puede detectarse utilizando un ensayo indirecto, en el que, por ejemplo, se utiliza un segundo anticuerpo marcado para detectar el anticuerpo unido específicamente al marcador, y/o en un ensayo de competición o inhibición en el que, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo distinto del marcador se incuba de forma simultánea con la mezcla.

Durante el curso de los ensayos, pueden ser necesarias fases de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las fases de incubación pueden variar desde unos 5 segundos hasta varias horas, y preferentemente desde unos 5 minutos a unas 24 horas. No obstante, el tiempo de incubación dependerá del formato del ensayo, del marcador, del volumen de la solución, de los fragmentos de concentraciones y de derivados de éstos. Típicamente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden efectuarse con arreglo a un intervalo de temperaturas, como entre 10 °C y 40 °C.

Los inmunoensayos pueden utilizarse para determinar la presencia o la ausencia de un marcador en una muestra, así como la cantidad de un marcador presente en una muestra. En primer lugar, puede detectarse una cantidad de prueba de un marcador en una muestra mediante los métodos de inmunoensayo descritos anteriormente. Si un marcador está presente en la muestra, formará un complejo anticuerpo-marcador con un anticuerpo que se unirá a dicho marcador de forma específica bajo las condiciones de incubación anteriormente descritas. La cantidad de complejo anticuerpo-marcador podrá determinarse mediante la comparación con un estándar, que puede ser, por ejemplo, un compuesto conocido u otra proteína que se sabe que está presente en una muestra. Tal y como se ha indicado anteriormente, la cantidad de prueba de un marcador no tiene que medirse en unidades absolutas mientras que la unidad de medición pueda compararse con un control.

Los métodos para detectar estos marcadores en una muestra tienen muchas aplicaciones. Por ejemplo, pueden medirse uno o más marcadores con el fin de colaborar en el diagnóstico de lesiones espinales, lesiones cerebrales, grado de la lesión, lesiones neurales provocadas por trastornos neuronales, abuso de alcohol y drogas, lesiones fetales debido al abuso del alcohol o las drogas por parte de madres embarazadas, etc. En otro ejemplo, los métodos para detectar los marcadores pueden utilizarse para controlar las respuestas de un sujeto al tratamiento. En otro ejemplo, los métodos para detectar los marcadores pueden utilizarse para evaluar e identificar componentes que modulen la expresión de estos marcadores *in vivo* o *in vitro*.

Los datos generados por la desorción y la detección de marcadores pueden analizarse utilizando cualquier método adecuado. En una forma de realización, los datos se analizan mediante el uso de un ordenador digital programable. Por regla general, el programa informático contiene un medio legible que almacena códigos; algunos códigos pueden destinarse a la memoria, que incluye la localización de cada característica en una sonda, la identidad del adsorbente en esa característica y las condiciones de elución empleadas para eliminar el adsorbente. El ordenador también contiene códigos que recibe a modo de información, datos sobre la potencia de la señal a diversas masas moleculares recibidas desde una localización direccionable concreta sobre la sonda. Estos datos pueden indicar el número de marcadores detectados, incluyendo la fuerza de la señal generada por cada marcador.

El análisis de datos puede incluir las fases de determinación de la potencia de la señal (por ejemplo, altura de los picos) de un marcador detectado y de eliminación de «valores atípicos» (datos que se salen de una distribución estadística previamente determinada). Los picos observados pueden normalizarse, proceso en el cual se calcula la altura de cada pico en relación con alguna referencia; por ejemplo, una referencia puede ser el ruido de fondo generado por el instrumento y los productos químicos (por ejemplo, molécula absorbente de energía), que se establece en cero en la escala. Posteriormente, la fuerza de la señal detectada para cada marcador u otras biomoléculas puede mostrarse en forma de intensidades relativas en la escala deseada (por ejemplo, 100). Como alternativa, puede admitirse un estándar (por ejemplo, una proteína del LCR) con la muestra, de tal forma que pueda utilizarse un poco de dicho estándar como referencia para calcular intensidades relativas de las señales observadas para cada marcador u otros marcadores detectados.

El ordenador puede transformar los datos resultantes en diversos formatos para su presentación. En un formato, al que se conoce como «vista de espectro o mapa concentrado», puede mostrarse una vista espectral estándar, en la que la vista muestra la cantidad de marcadores que alcanzan el detector a cada peso molecular concreto. En otro formato, al que se hace referencia como «mapa de picos», de la vista de espectro sólo se conservan la altura del pico y la información de masa, lo cual genera una imagen más clara y permite que los marcadores con pesos moleculares casi idénticos puedan verse más fácilmente. En otro formato más, al que se conoce como «vista de gel», cada masa procedente de la vista de picos puede convertirse en una imagen a escala de grises basada en la altura de cada pico, generando así en una apariencia similar a la de las bandas de los geles electroforéticos. En otro formato, conocido como «superposiciones en 3-D», pueden superponerse varios espectros para estudiar ligeros cambios en las alturas relativas de picos. En otro formato más, al que se conoce como «vista de mapa de diferencias», pueden compararse dos o más espectros, señalando debidamente los marcadores únicos y los marcadores regulados ascendente o descendientemente entre muestras. Los perfiles de marcador (espectros) de dos muestras cualesquiera pueden compararse visualmente. En otro formato más, puede utilizarse un diagrama de dispersión Spotfire, en el que los marcadores que se detectan son marcados como un punto en una representación gráfica, donde uno de los ejes de ésta representa la masa molecular aparente de los marcadores detectados y otro eje representa la intensidad de señal de los marcadores detectados. En el caso de cada muestra, los marcadores detectados y la cantidad de marcadores presentes en ésta pueden almacenarse en un medio legible por un ordenador. Estos datos pueden compararse posteriormente con un control (por ejemplo, un perfil o una cantidad de marcadores detectados en un control, por ejemplo, sujetos sanos y normales en los que una lesión neural es indetectable).

Métodos alternativos para la identificación de biomarcadores proteolíticos homólogos

En lo que respecta a la clonación de variantes alélicas de los genes humanos del marcador proteolítico y homólogos de otras especies (por ejemplo, ratón), las secuencias genéticas aisladas del marcador proteolítico pueden etiquetarse y utilizarse para revisar una biblioteca de ADNc construida a partir de ARNm obtenido de las células o los tejidos adecuados (por ejemplo, tejidos cerebrales) derivados del organismo (por ejemplo, ratón) de interés. Las condiciones de hibridación empleadas deberían ser de una menor restricción cuando la biblioteca de ADNc se deriva de un organismo diferente al tipo de organismo a partir del cual se hubiera derivado la secuencia etiquetada.

Como alternativa, el fragmento etiquetado puede utilizarse para revisar una biblioteca genómica derivada del organismo de interés, de nuevo, utilizando las condiciones de restricción adecuadas. Las condiciones poco restrictivas son bien conocidas por los expertos en la materia, y previsiblemente variarán en función de los organismos específicos a partir de los cuales se deriven la biblioteca y las secuencias etiquetadas. Para recibir orientación en lo que respecta a dichas condiciones, ver, por ejemplo, Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel, et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

Además, una variante alélica del gen del marcador proteolítico puede aislarse, por ejemplo, del ácido nucleico humano llevando a cabo una PCR con sondas panespecíficas. Por ejemplo, la plantilla para la reacción puede obtenerse a través del ADNc a través de una transcripción inversa del ARNm efectuada, por ejemplo, a partir de líneas celulares o tejidos, humanos o no, que se sepa o se sospeche que expresan un gen de un marcador proteolítico o una variante alélica de éste. Preferentemente, se aislará la variante alélica de un individuo que padezca un trastorno neuronal.

La tecnología PCR también puede utilizarse para aislar secuencias de ADNc de longitud completa; por ejemplo, el ARN puede aislarse, con arreglo a procedimientos estándar, a partir de una fuente celular o tisular adecuada (es decir, a partir de una que se sepa o se sospeche que expresa el gen del marcador proteolítico, como por ejemplo muestras de tejido cerebral obtenidas a través de biopsia o *post mortem*). Sobre el ARN podrá llevarse a cabo una reacción de transcripción inversa mediante el uso de un cebador de oligonucleótidos específico para la mayoría del extremo 5' del fragmento amplificado para iniciar la síntesis de la primera cadena. Posteriormente, al híbrido ARN/ADN resultante se le podrá añadir una «cola» de guaninas, mediante el uso de una reacción de transferasa terminal; el híbrido puede ser digerido con ARNsa H y, a continuación, iniciar la síntesis de la segunda cadena con un cebador poli-C. De este modo, es posible aislar fácilmente las secuencias de ADNc situadas corriente arriba del fragmento amplificado. Para analizar las estrategias de clonación que pueden utilizarse, ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, a continuación.

Otro método preferido incluye el proceso SAGE. El análisis en serie de la expresión génica (SAGE) está basado en la identificación y caracterización de secuencias parciales y definidas de transcripciones correspondientes a segmentos génicos. Estas «etiquetas» con secuencia de transcripción definida son marcadores para genes que se expresan en una célula, un tejido o un extracto, por ejemplo.

El SAGE está basado en varios principios. En primer lugar, una etiqueta formada por una secuencia nucleotídica corta (de 9 a 10 pb) contiene suficiente información como para identificar un transcrito en exclusiva, siempre que se haya extraído de una posición definida dentro del transcrito. Por ejemplo, una secuencia tan corta como una de 9 pb puede distinguir aproximadamente 262.144 transcritos suponiendo una distribución al azar de los nucleótidos en el

lugar de la etiqueta, mientras que los cálculos sugieren que el genoma humano codifica entre 80.000 y 200.000 transcritos (Fields, et al., *Nature Genetics*, 7:345 1994). El tamaño de una etiqueta puede ser más pequeño, por ejemplo, en eucariotas inferiores o procariotas, en los que la cifra de transcritos codificados por el genoma es menor. Por ejemplo, una etiqueta de sólo 6-7 pb puede ser suficiente para distinguir los transcritos en la levadura.

En segundo lugar, la dimerización aleatoria de etiquetas permite un procedimiento para reducir el sesgo (provocado por la amplificación y/o la clonación). En tercer lugar, la concatenación de estas etiquetas de secuencia corta permite el análisis eficaz de transcritos de manera seriada mediante la secuenciación de múltiples etiquetas dentro de un solo vector o clon. Al igual que sucede con la comunicación en serie entre ordenadores, mediante la cual la información es transmitida como una hilera continua de datos, el análisis en serie de las etiquetas secuenciales requiere un método para establecer el registro y los límites de cada una de ellas. El concepto de obtener una etiqueta definida de una secuencia de acuerdo con la presente invención es útil de cara a la comparación de etiquetas problema con una base de datos de secuencias. En un ejemplo para comparar una secuencia problema con secuencias conocidas se utiliza un método informático.

Las etiquetas utilizadas en la presente memoria únicamente identifican genes. Esto se debe a su longitud y a su localización específica (31) en un gen a partir del cual son obtenidas. Los genes enteros pueden identificarse comparando la etiqueta con un miembro de la base de datos de genes, o mediante la utilización de las secuencias de etiquetas a modo de sondas para aislar físicamente los genes no identificados previamente a partir de las bibliotecas de ADNc. Los métodos utilizados para aislar los genes de las bibliotecas utilizando sondas de ADN son bien conocidos en el sector. Ver, por ejemplo, Veculescu et al., *Science* 270: 484 (1995), y Sambrook et al. (1989), *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Una vez que se ha identificado un gen o un transcrito, ya sea por la coincidencia con una entrada de la base de datos o por la hibridación física con una molécula de ADNc, podrá determinarse la posición de la región de hibridación o de coincidencia en el transcrito. Si la secuencia de la etiqueta no se encuentra en el extremo 3', inmediatamente adyacente a la enzima de restricción empleada para generar las etiquetas SAGE, se tratará de un emparejamiento falso. La confirmación de la identidad de una etiqueta SAGE podrá llevarse a cabo comparando los niveles de transcripción de la etiqueta con respecto a los del gen identificado en determinados tipos de célula.

El análisis de la expresión génica no se limita al método anteriormente descrito, sino que puede incluir cualquier método conocido en la técnica. Todos estos principios se aplicarán de forma independiente, en combinación o en combinación con otros métodos conocidos de identificación de secuencias.

Los ejemplos de métodos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma y Vilo, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 17-24; Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, et al., *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación de enzimas de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiqueta de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57), huella sustractiva de ARN (SuRF) (Fuchs, et al., *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, et al., *Cytometry*, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic and Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., *J Cell Biochem. Suppl.*, 1998, 31, 286-96), técnicas FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Going y Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (revisados en [To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41]).

Las etiquetas de secuencias expresadas (EST) también pueden utilizarse para identificar moléculas de ácido nucleico que estén sobreexpresadas en una célula neuronal. Pueden identificarse EST en diversas bases de datos; las preferidas comprenden a título de ejemplo, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), GenBank, EMBL, PIR, SWISS-PROT y similares. La OMIM, que es una base de datos de mutaciones genéticas asociadas con enfermedades, se desarrolló en parte para el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). La OMIM es accesible a través del protocolo World Wide Web (www) de Internet, por ejemplo, en la dirección ncbi.nlm.nih.gov/Omim/. El CGAP es un programa interdisciplinar para establecer las herramientas de información y tecnológicas necesarias para descifrar la anatomía molecular de una célula cancerosa. CGAP es accesible a través del protocolo World Wide Web (www) de Internet, por ejemplo, en la dirección ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/. Algunas de estas bases de datos pueden contener secuencias de nucleótidos completas o parciales. Además, también pueden seleccionarse formas alternativas de transcritos a partir de bases de datos genéticas privadas. Como alternativa, pueden seleccionarse moléculas de ácidos nucleicos a partir de publicaciones disponibles.

mva

Pueden generarse formas de transcritos alternativas a partir de EST individuales que se encuentren en cada una de las bases de datos a través de un software informático que genere secuencias contiguas. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico se determina mediante el montaje de una serie de EST superpuestas. La base de datos de EST (dbEST), que es conocida y está disponible para los expertos en la materia, dispone aproximadamente de un millón de secuencias diferentes de ARNm humano, que constan de entre 500 y

1000 nucleótidos, y diversas cifras de EST forman parte de distintos organismos. Puede accederse a la dbEST a través del protocolo World Wide Web (www) de Internet, por ejemplo, en la dirección ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html. Estas secuencias son el resultado de una estrategia de clonación que utiliza clones de expresión de ADNc para secuenciar genomas. La EST tiene aplicaciones en el descubrimiento de nuevos genes, en el mapeo de genomas y en la identificación de regiones de codificación en las secuencias genómicas. Otra característica importante de la información correspondiente a la secuencia EST es que cada vez está disponible más rápidamente son los datos de expresión génica específicos de tejidos. Esta herramienta puede ser extremadamente útil a la hora de identificar genes que puedan ser objeto de una intervención terapéutica. Debido a que las secuencias EST son relativamente cortas, deben disponerse de tal forma que ofrezcan una secuencia completa. Como todos los clones disponibles se secuencian, en la base de datos se registra una serie de regiones solapadas. El resultado final consiste en formas de transcritos alternativas procedentes, por ejemplo, de células inmunitarias y células neuronales.

El montaje de las EST superpuestas extendidas a lo largo de las direcciones 5' y 3' da como resultado un «transcrito virtual» de longitud completa. El transcrito virtual resultante puede representar un ácido nucleico ya caracterizado, o puede ser un ácido nucleico nuevo sin una función biológica conocida. La base de datos Human Genome Index (HGI) del Instituto de Investigación Genómica (TIGR), que es conocida y está disponible para los expertos en la materia, contiene una lista de transcritos humanos. Al TIGR se puede acceder a través del protocolo World Wide Web (www) de Internet, por ejemplo en tigr.org. Los transcritos pueden generarse de esta manera utilizando TIGR-Assembler, un motor destinado a crear transcritos virtuales y que es conocido y está disponible para los expertos en la materia. TIGR-Assembler es una herramienta para disponer largas series de datos de secuenciación superpuestos como ESTs, BAC o pequeños genomas, y pueden utilizarse para disponer secuencias eucarióticas o procarióticas. TIGR-Assembler se describe, por ejemplo, en Sutton, et al., *Genome Science & Tech.*, 1995, 1, 9-19, y puede accederse a él a través del programa de transferencia de archivos de Internet, por ejemplo, en tigr.org/pub/software/TIGR.assembler. Además, GLAXO-MRC, que es conocido y está disponible para los expertos en la materia, es otro protocolo para construir transcritos virtuales. PHRAP se utiliza para la disposición de secuencias dentro de Find Neighbors y Assemble EST Blast. A PHRAP se puede acceder a través del protocolo World Wide Web (www) de Internet, por ejemplo en chimera.biotech.washington.edu/uwgc/tools/phrap.htm. La identificación de EST y la generación de EST contiguas para formar moléculas de ARN de longitud completa se describen en detalle en la solicitud US nº de serie 09/076.440.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las secuencias génicas de marcadores proteolíticos pueden utilizarse para aislar alelos mutantes de marcadores proteolíticos, preferentemente de un sujeto humano. Estos alelos mutantes pueden aislarse a partir de individuos que se sepa que tienen un genotipo que contribuye a los síntomas de un trastorno neuronal como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, o que sean propuestos como susceptibles de padecer dichos trastornos.

Un ADNc de una variante alélica mutante del gen del marcador proteolítico puede aislarse, por ejemplo, utilizando un proceso de PCR, una técnica que es bien conocida para los expertos en la materia. En este caso, la primera cadena de ADNc puede sintetizarse mediante la hibridación de un oligonucleótido oligo-dT con un ARNm aislado procedente de un tejido que se sepa o se sospeche que está expresado en un individuo que, supuestamente, tiene el alelo del marcador proteolítico mutante, y ampliando la nueva cadena con transcriptasa inversa. La segunda cadena de ADNc se sintetiza posteriormente utilizando un oligonucleótido que se hibride de forma específica con el extremo 5' del gen normal. Utilizando estos dos cebadores, el producto se amplifica posteriormente con la PCR, se clona en un vector adecuado y se somete al análisis de secuencia del ADN mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Comparando la secuencia de ADN del alelo del marcador proteolítico mutante con la del alelo del marcador proteolítico normal podrá determinarse la mutación (o mutaciones) responsable de la pérdida o la alteración de la función del producto génico del marcador proteolítico.

El ADN genómico aislado de los linfocitos o de otras células inmunitarias de individuos normales y afectados también puede utilizarse como plantilla para la PCR. Los productos de la PCR de los individuos normales y afectados se comparan mediante técnicas de detección de mutaciones de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) o por secuenciación.

Las secuencias anteriores de ácidos nucleicos que codifican marcadores proteolíticos pueden utilizarse para generar sondas de hibridación, útiles a la hora de mapear la secuencia genómica natural, así como para detectar en un individuo, o en un grupo de individuos, variantes alélicas de genes que están presentes en individuos que sufren defectos o enfermedades neurales, o son susceptibles de sufrirlos. Las secuencias pueden mapearse con respecto a un cromosoma concreto, a una región específica de un cromosoma o a construcciones cromosómicas artificiales, como por ejemplo cromosomas artificiales humanos (HAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales bacterianos (BAC), construcciones PI bacterianas o bibliotecas de ADNc de un solo cromosoma (ver, por ejemplo, Harrington et al., 1997, *Nat. Genet.* 15: 345-355; Price, 1993, *Blood Rev.* 7: 127-134; y Trask, 1991, *Trends Genet.* 7: 149-154).

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) puede correlacionarse con otras técnicas de mapeado físico de cromosomas y con datos del mapa genético (ver, por ejemplo, Heinz-Ulrich et al., 1995, en Meyers, anteriormente,

pp. 965-968). En la página web de Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) o en diferentes revistas científicas pueden encontrarse ejemplos de datos del mapa genético. Las secuencias de nucleótidos pueden utilizarse para detectar diferencias en las secuencias génicas entre variantes resistentes, susceptibles o alélicas en individuos.

5 La hibridación *in situ* de las preparaciones cromosómicas y las técnicas físicas de mapeado, como análisis de enlace mediante el uso de marcadores cromosómicos establecidos, pueden utilizarse para ampliar los mapas genéticos. Con frecuencia, la ubicación de un gen en el cromosoma de otra especie de mamífero, como el ratón, puede revelar marcadores asociados aunque el número o el brazo de un cromosoma humano concreto no se conozcan. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos mediante el mapeado físico, lo cual suministra una valiosa
10 información a los investigadores que buscan genes mediante la técnica de clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez que los genes han sido localizados de forma aproximada mediante el enlace genético con una región genómica concreta, por ejemplo la ataxia-telangiectasia con la secuencia 11q22-23, cualquier secuencia mapeada en esa área representará genes asociados o reguladores para investigaciones adicionales (ver, por ejemplo, Gatti et al., 1988, *Nature* 336:577-580). Otros ejemplos de regiones genómicas
15 concretas comprenden de manera no limitativa, el grupo de receptores de leucocitos vinculados a la secuencia 19q13.3-13.4. La secuencia de nucleótidos de la invención que nos ocupa también puede utilizarse para detectar diferencias en la ubicación cromosómica debido a translocación, inversión, etc., entre individuos normales o afectados.

20 Los genes identificados a partir de individuos son amplificados por PCR y secuenciados por métodos bien conocidos en la técnica. Posteriormente, estas secuencias de ácidos nucleicos son utilizadas en los ensayos descritos en los ejemplos, en los materiales y en los métodos para correlacionar la secuencia de los genes identificados, por ejemplo, con el porcentaje de individuos que sufren la enfermedad de Alzheimer en comparación con los individuos normales. A medida que se identifican más secuencias génicas y sus secuencias de aminoácidos, se permite una correlación
25 entre la expresión de marcadores proteolíticos en células del sistema nervioso, incluyendo el cerebro, y los individuos predispuestos a una enfermedad o defecto neural.

Pueden utilizarse variantes de las moléculas de ácidos nucleicos tal y como se hayan identificado en células inmunitarias de individuos de diferentes haplotipos y/o que sufran defectos neurales o sean susceptibles a sufrirlos
30 con el fin de detectar las variaciones alélicas de las moléculas inmunitarias relacionadas en las células nerviosas. Un «alelo» o una «variante» es una forma alternativa de gen. En la invención son de especial utilidad las variantes de los genes que codifican cualquier posible molécula inmunitaria en el sistema nervioso que haya sido identificada por los métodos de esta misma invención. Las variantes pueden proceder por lo menos de una mutación en la secuencia del ácido nucleico, y pueden desembocar en ARNm o en polipéptidos alterados, cuya estructura o funcionamiento podría verse o no alterada. Cualquier gen natural o recombinante puede tener una o muchas formas alélicas, o bien ninguna. Los cambios mutacionales comunes que provocan las variantes suelen atribuirse a
35 deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos cambios puede suceder solo, o bien combinado con los demás, una o más veces, en una secuencia temporal determinada.

40 Para identificar adicionalmente las variantes de moléculas de ácido nucleico que pueden detectar, por ejemplo, la primera fase del Alzheimer, estas moléculas de ácido nucleico pueden agruparse en conjuntos en función, por ejemplo, de la homología. Los miembros de una serie de moléculas de ácido nucleico se someten a un proceso de comparación. preferentemente, la serie de moléculas de ácido nucleico será un conjunto de formas de transcripción alternativas del ácido nucleico. También preferentemente, los miembros de una serie de transcritos alternativos
45 incluirán por lo menos un miembro asociado con una enfermedad o con una condición biológica, o bien que su proteína codificada esté asociada a uno de estos dos elementos. Por ejemplo, se compara una serie de moléculas de marcadores proteolíticos procedentes de células cerebrales y células neurales de un individuo enfermo y de otro sano. por lo menos uno de los miembros de la serie de transcritos alternativos de la molécula de ácido nucleico puede estar asociado, por ejemplo, con el Alzheimer o con cualquier otro defecto neural, tal y como se describe anteriormente. Así pues, la comparación de los miembros de la serie de moléculas de ácido nucleico desemboca en la identificación de por lo menos un transcrito alternativo de la molécula de ácido nucleico que está asociado con
50 una enfermedad o una condición biológica, o bien su proteína codificada está asociada a uno de estos dos elementos. Por ejemplo, los miembros de la serie de moléculas de ácido nucleico proceden de un gen común; por ejemplo, los miembros de la serie de moléculas de ácido nucleico proceden de una gran diversidad de genes o, por ejemplo, los miembros de la serie de moléculas de ácido nucleico proceden de especies taxonómicas diferentes. Las secuencias de nucleótidos de diversos ácidos nucleicos procedentes de especies taxonómicas distintas pueden identificarse llevando a cabo un análisis de la semejanza de la secuencia, una investigación ortológica o ambas; estas investigaciones con conocidas para los expertos en la materia.

60 Las búsquedas de semejanzas en las secuencias pueden llevarse a cabo manualmente o mediante el uso de varios programas informáticos disponibles, conocidos para los expertos en la materia. Preferentemente, pueden utilizarse los algoritmos de Blast, Smith-Waterman y similares, los cuales están disponibles y son conocidos para los expertos en la materia. Blast es una herramienta de búsqueda de semejanzas en secuencias del NCBI diseñada para dar soporte al análisis de bases de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas. Blast es accesible a través del
65 protocolo World Wide Web (www) de Internet, por ejemplo, en la dirección ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. El paquete GCG ofrece una versión local de Blast que puede utilizarse con bases de dominio público o con cualquier base de datos

con capacidad de búsqueda disponible a nivel local. El paquete GCG v9.0 es un paquete de software disponible a nivel comercial que consta de más de 100 programas de software relacionados entre sí, y permite el análisis de secuencias mediante su edición, mapeado, comparación y alineación. Otros programas incluidos en el paquete GCG son, por ejemplo, programas que facilitan las predicciones de la estructura secundaria del ARN, el ensamblaje de fragmentos de ácidos nucleicos y el análisis evolutivo. Además, las bases de datos genéticas más importantes (GenBank, EMBL, PIR y SWISS-PROT) se distribuyen junto con el paquete GCG, y son completamente accesibles con los programas de búsqueda y manipulación de la base de datos. A GCG se puede acceder a través de Internet, por ejemplo en la dirección www.gcg.com/. Fetch es una herramienta disponible en GCG que puede obtener registros GenBank glosados y basados en números de registro; es similar a Entrez. Con GeneWorld y GeneThesaurus, de Pangea, puede llevarse a cabo otra búsqueda de semejanzas en secuencias. GeneWorld 2.5 es una aplicación automatizada, flexible y de alto rendimiento para el análisis de secuencias de polinucleótidos y proteínas. GeneWorld permite el análisis automático y anotaciones de secuencias. Al igual que GCG, GeneWorld incorpora varias herramientas para la búsqueda de homologías, hallazgo de genes, alineación de secuencias múltiples, predicción de estructuras secundarias e identificación de motivos. GeneThesaurus 1.0™ es un servicio de suscripción de datos de anotación y secuencias que suministra información a partir de multitud de fuentes, y ofrece un modelo de datos relacionales para datos públicos y privados.

Otra búsqueda alternativa de semejanzas en secuencia puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante BlastParse. BlastParse es un script de PERL que se ejecuta en una plataforma UNIX que automatiza la estrategia descrita anteriormente. BlastParse toma una lista de números de registro objetivo en términos de interés y analiza todos los campos GenBank para convertirlos en texto «limitado por tabuladores» que, posteriormente, puede guardarse en un formato de «base de datos relacional» para simplificar la búsqueda y el análisis, lo cual otorga flexibilidad. El resultado final es una serie de registros GenBank completamente analizados que pueden clasificarse, filtrarse y sobre los que se pueden plantear preguntas fácilmente, al igual que ocurre con una base de datos relacional de anotaciones.

Preferentemente, la pluralidad de ácidos nucleicos procedentes de diferentes especies taxonómicas que presentan homología con respecto al ácido nucleico diana, tal y como se describe en la búsqueda de semejanzas en la secuencia, se definen adicionalmente para encontrar los ortólogos de los ácidos nucleicos diana contenidos en ellos. Un ortólogo es un término que se define en la clasificación genética para referirse a dos genes de organismos ampliamente divergentes que presentan semejanza secuencial, y llevan a cabo funciones similares dentro del contexto del organismo. Por el contrario, los parálogos son genes dentro de una especie que se producen como consecuencia de la duplicación genética, pero que han desarrollado nuevas funciones y también se les conoce como isotipos. Opcionalmente, también podrán llevarse a cabo búsquedas de parálogos. Al llevar a cabo una búsqueda de ortólogos, se obtiene una minuciosa lista de secuencias homólogas procedentes de los organismos más diversos posible. Posteriormente, estas secuencias se analizan para seleccionar la secuencia más representativa que se ajuste a los criterios para ser un ortólogo. La búsqueda de un ortólogo puede llevarse a cabo mediante programas disponibles para los expertos en la materia, como por ejemplo Compare. Preferentemente, la búsqueda de un ortólogo se llevará a cabo con acceso a las anotaciones GenBank completas y analizadas para cada una de las secuencias. Actualmente, los registros obtenidos de GenBank son «archivos planos», y no son los más indicados para un análisis automatizado. Preferentemente, la búsqueda de ortólogos se llevará a cabo utilizando el programa Q-Compare. Las etapas preferidas del protocolo Q-Compare se describen en el diagrama de flujo expuesto en la patente US nº 6.221.587.

Preferentemente, la comparación de secuencias entre especies se llevará a cabo utilizando Compare, que está disponible y es conocido para los expertos en la materia. Compare es una herramienta GCG que permite efectuar comparaciones apareadas de secuencias utilizando un criterio de ventana/restricción. Compare genera un archivo de resultados en el que figuran puntos donde se encuentran combinaciones de la calidad especificada. Éstos pueden representarse con otra herramienta GCG, DotPlot.

Los polinucleótidos pueden aislarse utilizando la técnica descrita en la sección experimental o replicarse mediante PCR. La tecnología PCR es la materia de las patentes de los EUA números 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, y se describe en *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al. eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) o MacPherson et al. (1991) y (1994), anteriormente, y referencias citadas en estas obras. Alternativamente, un experto en la materia puede utilizar las secuencias suministradas en la presente memoria y un sintetizador comercial de ADN para replicar el ADN. Por lo tanto, un proceso para obtener los polinucleótidos incluye suministrar la secuencia lineal del polinucleótido, los nucleótidos, los cebadores adecuados, sustancias químicas como enzimas e instrucciones para su duplicación, así como duplicar o enlazar químicamente los nucleótidos siguiendo la orientación correcta para obtener dichos polinucleótidos. Estos polinucleótidos pueden aislarse adicionalmente. De hecho, por ir más lejos, un experto puede introducir el polinucleótido en un vector de replicación adecuado e insertar el vector en una célula huésped adecuada (procariota o eucariota) para su replicación y amplificación. El ADN amplificado de esta forma puede aislarse de la célula mediante métodos bien conocidos para los expertos en la materia.

La presencia de una o más moléculas de ácido nucleico del marcador proteolítico, aisladas de una célula, puede estar correlacionada con una muestra de célula neuronal de un sujeto normal y de otro que sufra un trastorno neural

o sea propenso a sufrirlo. Preferentemente, la muestra se obtendrá de un mamífero del que se sospeche que padece un trastorno de células nerviosas o cerebrales. preferentemente, una molécula de ácido nucleico indicativa de una molécula de marcador proteolítico y detectada en una célula neural constará de una secuencia que presente por lo menos el 50% de identidad de la secuencia correspondiente a los números: 10, 67, 68; más preferentemente, una molécula de ácido nucleico indicativa de una molécula de marcador proteolítico y detectada en una célula neural constará de una secuencia que presente por lo menos el 70% de identidad de la secuencia correspondiente a los números: 10, 67, 68; más preferentemente, una molécula de ácido nucleico indicativa de una molécula de marcador proteolítico y detectada en una célula neural constará de una secuencia que presente por lo menos el 80% de identidad de la secuencia correspondiente a los números: 10, 67, 68; más preferentemente, una molécula de ácido nucleico indicativa de una molécula de marcador proteolítico y detectada en una célula neural constará de una secuencia que presente por lo menos 90%, 90%, 95%, 96%, 97%, 95%, 99% o 99,9% de identidad de la secuencia correspondiente a los números: 10, 67, 68.

La identidad y semejanza porcentuales entre dos secuencias (ácidos nucleicos o polipéptidos) puede determinarse utilizando un algoritmo matemático (ver, por ejemplo, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

Para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para facilitar una comparación óptima (por ejemplo, se introducen huecos en el primer o segundo, o en ambos, lugares de una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para facilitar la alineación óptima, y las secuencias no homólogas pueden ignorarse a efectos de comparación). La identidad porcentual entre las dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por ambas secuencias, tomando en consideración el número de huecos y la longitud de cada hueco que tiene que introducirse para conseguir una alineación óptima de las dos secuencias. Los residuos de aminoácidos o nucleótidos presentes en las correspondientes posiciones de aminoácidos o de nucleótidos, se compararán posteriormente. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, las moléculas serán idénticas en esa posición (tal y como se utiliza en la presente memoria, «identidad» de ácido nucleico o de aminoácido será equivalente a «homología» de ácido nucleico o de aminoácido).

Una «ventana de comparación» hace referencia a un segmento de cualquiera de los números de las posiciones contiguas, seleccionadas a partir del grupo que consta de entre unas 25 y unas 600, típicamente entre unas 50 y unas 200, y más frecuentemente entre unas 100 y unas 150, en las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones continuas cuando las dos secuencias están alineadas de forma óptima. Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, la identidad del porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos podrá determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453, 1970), que forma parte del programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com/), mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981), a través de los métodos de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988) y Altschul, et al. (*Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402, 1997), mediante el desarrollo informático de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y BLAST en el Wisconsin Genetics Software Package (disponible a través de Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis., EUA), o a través de una alineación manual y una inspección visual (ver, por ejemplo, Asubel et. al., anteriormente). Los parámetros de los huecos pueden modificarse para ajustarse a las necesidades de un usuario. Por ejemplo, al utilizar el paquete de software de GCG, puede utilizarse una matriz NWSgapdna.CMP, un peso del hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. A título de ejemplo, algunos pesos de huecos que se obtienen utilizando una matriz Blossom 62 o PAM250 son 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4, mientras que algunos ejemplos de pesos de longitudes son 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El paquete de software GCG puede utilizarse para determinar la identidad porcentual entre las secuencias de ácidos nucleicos. La identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Myers y W. Miller (CABIOS 4: 11-17, 1989), que ha sido incluido en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por la longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas pueden utilizarse además como secuencias pregunta para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos de secuencias, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Estas búsquedas pueden efectuarse utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (*J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990). Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, con ejemplos de puntuaciones = 100 y longitudes de series de letras = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas con las moléculas de ácido de nucleico de la invención o con una identidad de porcentaje suficiente con respecto a éstas. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, con ejemplos de puntuaciones = 50 y longitudes de series de letras = 3 para obtener secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas con las proteínas de la invención o con una identidad

porcentual suficiente con respecto a éstas. Para obtener alineaciones con huecos a efectos de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos (gapped), tal y como se describe en Altschul et al. (*Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402, 1997). Al utilizar los programas BLAST y BLAST con huecos, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La invención comprende asimismo polipéptidos, en células neurales, que corresponden a un producto de una molécula de ácido nucleico que consta de sustituciones conservadoras fenotípicamente silenciosas. Estas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido determinado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Los datos sobre los cambios de los aminoácidos que presentan posibilidades de ser fenotípicamente silenciosos pueden encontrarse en Bowie et al., *Science* 247: 1306-1310, 1990, por ejemplo. Las tablas de sustitución conservadora que ofrecen aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919, 1992) y aparecen en la tabla a continuación.

Sustituciones conservadoras de aminoácidos	
Aromáticos	Fenilalanina Triptófano Tirosina
Hidrófobos	Leucina Isoleucina Valina
Polares	Glutamina Asparagina
Básicos	Arginina Lisina Histidina
Ácidos	Ácido aspártico Ácido glutámico
Pequeños	Alanina Serina Treonina Metionina Glicina

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante enmarcadas dentro de la especialización. Estas técnicas se explican íntegramente en la bibliografía especializada. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (en adelante, «Sambrook et al., 1989»); *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «fragmento o segmento», aplicado a una secuencia de ácido nucleico, gen o polipéptido, estará compuesto de por lo menos aproximadamente 5 bases de ácido nucleico contiguas (para secuencias de ácidos nucleicos o genes) o aminoácidos (para los polipéptidos), normalmente de por lo menos bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, más habitualmente de por lo menos aproximadamente 20 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, normalmente de por lo menos aproximadamente 30 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, preferentemente de por lo menos aproximadamente 40 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 50 bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos y aún más preferentemente de por lo menos entre aproximadamente 60 y 80 o más bases de ácido nucleico contiguas o aminoácidos en términos de longitud. «Fragmentos solapados», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a fragmentos contiguos de ácido nucleico o péptido que comiencen en el extremo amino-terminal de un ácido nucleico o proteína y terminen en el extremo carboxilo-terminal del ácido nucleico o la proteína. Cada fragmento de ácido nucleico o de péptido presenta por lo menos aproximadamente una posición contigua de ácido nucleico o de aminoácido en común con el siguiente fragmento de ácido nucleico o péptido, más preferentemente por lo menos aproximadamente tres posiciones contiguas de bases de ácido nucleico o aminoácido en común y más preferentemente por lo menos aproximadamente diez posiciones contiguas de bases de ácido nucleico o de aminoácido en común.

Un «fragmento» significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente de por lo menos 20 nucleótidos, más generalmente de por lo menos 23 nucleótidos, normalmente de por lo menos 26 nucleótidos, más normalmente de por lo menos 29 nucleótidos,

frecuentemente de por lo menos 32 nucleótidos, más frecuentemente de por lo menos 35 nucleótidos, normalmente de por lo menos 38 nucleótidos, más normalmente de por lo menos 41 nucleótidos, habitualmente de por lo menos 44 nucleótidos, más habitualmente de por lo menos 47 nucleótidos, preferentemente de por lo menos 50 nucleótidos, más preferentemente de por lo menos 53 nucleótidos y, en las formas de realización especialmente preferidas, será de por lo menos 56 o más nucleótidos. Otros ejemplos incluirán longitudes mayores que esas cifras, por ejemplo, 63, 72, 87, 96, 105, 117, etc. Dichos fragmentos podrán tener extremos en cualquier par de localizaciones, pero especialmente en límites entre dominios estructurales, por ejemplo, los dominios de membrana.

Las secuencias homólogas de ácidos nucleicos, cuando se comparan, muestran una importante identidad o similitud de secuencia. Las normas relativas a la homología en ácidos nucleicos son medidas de la homología que suelen utilizarse en la técnica mediante la comparación de secuencias o bien están basadas en las condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se describen a continuación con mayor detalle.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «homología sustancial» en el contexto de comparación de las secuencias de ácido nucleico significará que los segmentos, o sus cadenas complementarias, al compararse, son idénticos si se alinean de forma óptima, con las inserciones o deleciones correspondientes de nucleótidos por lo menos en aproximadamente 50% de los nucleótidos; generalmente por lo menos en un 56%; más generalmente por lo menos en un 59%; normalmente por lo menos en un 62%; más normalmente por lo menos en un 65%; en ocasiones por lo menos en un 68%; en más ocasiones por lo menos en un 71%; habitualmente por lo menos en un 74%; más habitualmente por lo menos en un 77%; frecuentemente por lo menos en un 80%; más frecuentemente por lo menos en aproximadamente 85%; preferentemente por lo menos en aproximadamente 90%; más preferentemente por lo menos aproximadamente 95-98% o más y, en ejemplos concretos, en hasta el 99% o más de los nucleótidos. De forma alternativa, la homología sustancial existe cuando los segmentos hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas, según una cadena o a su complemento, normalmente utilizando un fragmento derivado, por ejemplo, de células nerviosas o celulares. Por regla general, la hibridación selectiva se producirá cuando exista por lo menos aproximadamente 55% de homología en una cadena de por lo menos 14 nucleótidos, preferentemente aproximadamente a por lo menos un 65%, más preferentemente aproximadamente a por lo menos un 75% y todavía más preferentemente aproximadamente a por lo menos un 90%. Consulte Kanehisa (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:203-213. La longitud de la comparación de la homología, tal y como se describe, puede producirse sobre cadenas más largas, y en determinados ejemplos se llevará a cabo sobre una cadena por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos; frecuentemente por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos; más frecuentemente por lo menos aproximadamente 24 nucleótidos; normalmente por lo menos aproximadamente 28 nucleótidos, más normalmente por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos, preferentemente por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos y más preferentemente por lo menos de 75 a 100 o más nucleótidos. Los extremos de los segmentos podrán situarse en diferentes combinaciones de pares. La sintenia cromosómica puede utilizarse para distinguir aún más entre genes homólogos cuando exista una conservación evolutiva suficiente entre los genomas que estén comparándose, por ejemplo, entre especies de mamíferos. Un «homólogo sinténico» posee tanto la identidad de la secuencia con respecto al gen de referencia y conserva la localización cromosómica correspondiente en relación con los genes estrechamente vinculados. Los homólogos sinténicos tienen muchas probabilidades de compartir una localización espacial y temporal de la expresión génica, así como de codificar proteínas con funciones biológicas equivalentes.

Las condiciones de restricción, en lo que se refiere a la homología en el contexto de la hibridación, serán condiciones de restricción combinadas en términos de sales, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, normalmente los controlados en las reacciones de hibridación. Normalmente, las condiciones de restricción en términos de temperatura incluirán temperaturas superiores a aproximadamente 30 °C, más frecuentemente superiores a aproximadamente 37 °C, normalmente superiores a aproximadamente 45 °C, más normalmente superiores a aproximadamente 55 °C, preferentemente superiores a aproximadamente 65 °C, y más preferentemente superiores a aproximadamente 70 °C. Habitualmente, las condiciones de restricción en términos de sal corresponderán a menos de 1.000 mM, frecuentemente a menos de aproximadamente 500 mM, más frecuentemente a menos de aproximadamente 400 mM, normalmente a menos de aproximadamente 300 mM, preferentemente a menos de aproximadamente 200 mM y más preferentemente a menos de aproximadamente 150 mM. No obstante, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medición de uno solo. ver, por ejemplo, Wetmur y Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370.

Diagnóstico de lesiones neurales

En otro aspecto, la invención ofrece métodos para ayudar al diagnóstico de lesiones neurales en humanos y/o al diagnóstico de trastornos neurales utilizando uno o más marcadores. Por ejemplo, los biomarcadores de enzimas proteolíticas con una actividad específica entre alrededor de 1 µg hasta alrededor de 500 µg por 1 mg de proteína sustrato que vaya a proteolizarse en órganos lesionados o estresados (*in vivo*) con arreglo a un período que va de minutos a días, o bien la utilización *in vitro* de una mezcla de proteasa purificada-proteína sustrato/proteína con una proporción de 1/10.000 a 1/20 en un período que oscila entre los minutos y las horas para las proteínas identificadas en la Tabla 1, péptidos, fragmentos o derivados de éstos y/o aquellos utilizados por los números de secuencia: 10, 67, 68. Estos marcadores pueden utilizarse por separado o en combinación con otros marcadores de enzimas proteolíticas, o bien una combinación de biomarcadores de enzimas proteolíticas y péptidos neurales. Los

5 marcadores están presentes de modo diferencial en muestras de un paciente humano, como por ejemplo un paciente con TC, y un sujeto normal en el que es indetectable una lesión neural; por ejemplo, algunos de los marcadores se expresan en un nivel elevado y/o están presentes con una mayor frecuencia en pacientes humanos con lesiones neurales y/o trastornos neuronales que en sujetos normales. Por ende, la detección de uno o más de estos marcadores en una persona suministraría una información útil sobre las probabilidades que tiene esa persona de padecer una lesión neural y/o un trastorno neuronal.

10 Las enfermedades del sistema nervioso, trastornos neuronales y/o condiciones que puedan tratarse, evitarse y/o diagnosticarse con los compuestos de la invención (por ejemplo, polipéptidos) comprenden de manera no limitativa, lesiones, enfermedades, trastornos y/o afecciones del sistema nervioso que desemboquen en una desconexión de los axones, una disminución o degeneración de neuronas o una desmielinización de éstas. Las lesiones del sistema nervioso que pueden ser tratadas, evitadas y/o diagnosticadas en un paciente (incluyendo pacientes humanos y mamíferos no humanos) con arreglo a la invención incluyen, entre otras, las siguientes lesiones de los sistemas nerviosos central (incluyendo la médula espinal y el cerebro) o periférico: (1) lesiones isquémicas, en las que una falta de oxígeno en una parte del sistema nervioso central provoca lesiones o muerte neuronal, incluyendo infarto o isquemia cerebral, o bien infarto o isquemia de la médula espinal; (2) lesiones traumáticas, incluyendo lesiones provocadas por daños físicos o asociadas con la cirugía, por ejemplo, lesiones que seccionan una parte del sistema nervioso o lesiones por compresión; (3) lesiones cancerosas en las que se destruye o se lesiona una parte del sistema nervioso como consecuencia de un tejido tumoral que puede corresponder a un tumor maligno asociado al sistema nervioso o a un tumor maligno derivado de un tejido de un sistema no nervioso; (4) lesiones infecciosas en las que se destruye o se daña una parte del sistema nervioso como consecuencia de una infección, por ejemplo, provocada por un absceso o asociada con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, el del herpes zóster o el del herpes simple, o bien relacionada con la enfermedad de Lyme, la tuberculosis o la sífilis; (5) lesiones degenerativas en las que se destruye o se lesiona una parte del sistema nervioso como resultado de un proceso degenerativo, que comprenden de manera no limitativa, la degeneración asociada con la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o esclerosis lateral amiotrófica (ELA); (6) lesiones asociadas con enfermedades, trastornos y/o carencias nutricionales, en los que se destruye o se lesiona una parte del sistema nervioso como consecuencia de un trastorno nutricional o un trastorno del metabolismo, que comprenden de manera no limitativa deficiencia de la vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, enfermedad de Wernicke, ambliopía tabacoalcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso) y degeneración cerebelosa alcohólica; (7) lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas, que comprenden de manera no limitativa, diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus eritematoso sistémico, carcinoma o sarcoidosis; (8) lesiones provocadas por sustancias tóxicas, entre las que se incluye el alcohol, el plomo o neurotoxinas concretas; y (9) lesiones de desmielinización en las que se destruye o se lesiona una parte del sistema nervioso como consecuencia de una enfermedad desmielinizante, que comprenden de manera no limitativa, esclerosis múltiple, mielopatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa de diversas etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva y mielínolisis central pontina.

40 En consecuencia, las formas de realización de la invención incluyen métodos para ayudar en las lesiones neurales humanas y/o en los trastornos neuronales. El método consta de los siguientes procesos: (a) detección de por lo menos un biomarcador de enzima proteolítica en una muestra, y (b) correlación de la detección del marcador o marcadores con un diagnóstico probable de lesiones neurales y/o trastornos neuronales o lesiones en los órganos del paciente. La correlación puede tomar en consideración la cantidad del marcador o marcadores en la muestra en comparación con la cantidad de control del marcador o marcadores (regulación al alza o a la baja del marcador o marcadores) (por ejemplo, en sujetos normales en los que es indetectable una lesión neural humana). La correlación puede tomar en consideración la presencia o la ausencia de los marcadores en una muestra problema, así como la frecuencia de detección de los mismos marcadores en un control. La correlación puede tomar en consideración (o no) ambos factores mencionados, para así facilitar la determinación de si un sujeto padece una lesión neural, del grado de gravedad de dicha lesión neural y de la localización subcelular de la lesión.

50 A partir de un sujeto puede obtenerse cualquier muestra adecuada para detectar marcadores. Preferentemente, la muestra será del líquido cefalorraquídeo del sujeto. Si así se deseara, la muestra puede prepararse tal y como se describe anteriormente, para así mejorar la detectabilidad de los marcadores. Por ejemplo, para incrementar la detectabilidad de los marcadores es preferible fraccionar una muestra de suero sanguíneo del sujeto, por ejemplo, mediante cromatografía de agarosa-azul de Cibacrón, cromatografía de afinidad de ADN monocatenario, cromatografía de intercambio de aniones de fragmentos y derivados de éstos. Las preparaciones de muestras, como los protocolos de fraccionamiento previo, son opcionales, y pueden no ser necesarias para mejorar la detectabilidad de los marcadores, dependiendo de los métodos de detección utilizados; por ejemplo, la preparación de la muestra puede ser innecesaria si se utilizan anticuerpos que se unen específicamente a los marcadores para detectar la presencia de los mismos en la muestra.

65 Puede utilizarse cualquier método adecuado para detectar un marcador o marcadores en una muestra. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo fluorogénico o una espectrometría de iones en fase gaseosa, tal y como se ha descrito anteriormente. Mediante la utilización de estos métodos podrá detectarse uno o más marcadores. preferentemente, una muestra se comprobará para determinar la presencia de varios marcadores; la detección de la presencia de varios marcadores en vez de uno solo ofrecería más información al evaluador. Específicamente, la detección de

varios marcadores en una muestra aumentaría el porcentaje de diagnósticos positivos reales y negativos reales, y disminuiría el porcentaje de falsos positivos o falsos negativos.

5 La detección del marcador o marcadores se correlaciona posteriormente con un diagnóstico probable de lesiones neurales y/o trastornos neuronales. En algunas formas de realización, la detección de la mera presencia o ausencia de un marcador, sin cuantificar la cantidad de éste, resulta útil, y puede correlacionarse con un diagnóstico probable de lesión neural y/o trastornos neuronales.

10 En otras formas de realización, la detección de marcadores puede implicar la cuantificación de los marcadores para correlacionar la detección de dichos marcadores con un diagnóstico probable de lesión neural, nivel de gravedad de la lesión neural, diagnóstico de fragmentos de trastornos neurales y derivados de éstos. Así pues, si la cantidad de los marcadores detectados en un sujeto que se está comprobando es superior en comparación con una cantidad de control, dicho sujeto tendrá una mayor probabilidad de sufrir dichas lesiones y/o trastornos neurales.

15 De forma similar, en otra forma de realización, la detección de marcadores puede implicar además la cuantificación de los marcadores para correlacionar la detección de éstos con un diagnóstico probable de lesiones neurales, nivel de gravedad de la lesión neural o diagnóstico de trastornos neurales, donde los marcadores están presentes en menores cantidades en las muestras de LCR o suero sanguíneo de pacientes con respecto a las muestras de suero sanguíneo de sujetos normales. Así pues, si la cantidad de los marcadores detectados en un sujeto que se está comprobando es superior en comparación con una cantidad de control, dicho sujeto tendrá una mayor probabilidad de sufrir lesiones neurales, lesiones orgánicas y/o trastornos neurales.

25 Cuando los marcadores se cuantifican, pueden compararse con un control. Un control puede ser, por ejemplo, la cantidad media o mediana de un marcador presente en muestras comparables de muestras de sujetos normales en los que una lesión y/o trastorno neurales son indetectables. La cantidad de control se mide en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para medir la cantidad problema, o en condiciones muy similares. Por ejemplo, si una muestra problema se obtiene a partir del líquido cefalorraquídeo y/o suero sanguíneo de un sujeto y se detecta un marcador utilizando una sonda concreta, la cantidad de control del marcador se determinará preferentemente a partir de una muestra de suero de un paciente utilizando la misma sonda. Se prefiere que la cantidad de control del marcador se determine a partir de un número importante de muestras obtenidas de sujetos normales que no padezcan lesiones neurales y/o trastornos neuronales, de tal forma que puedan reflejarse las variaciones en las cantidades de los marcadores en esa población.

35 Los datos generados por espectrometría de masas podrán ser después analizados por el software de un ordenador. El software puede contener un código que convierta la señal del espectrómetro de masas en un formato legible en el ordenador. El software también puede incluir un código que aplique un algoritmo al análisis de la señal, para así determinar si dicha señal representa un «pico» en la señal correspondiente a un marcador de esta invención o a otros marcadores útiles. El software también puede incluir un código que ejecute un algoritmo que compare la señal de una muestra problema con una señal habitual característica de lesiones neurales «normales» y humanas, y determine el grado de coincidencia entre las dos señales. El software también puede incluir un código que indique a qué valor se acerca más la muestra problema, ofreciendo así un diagnóstico probable.

45 En una forma de realización preferida, los biomarcadores se detectan en un amplio abanico de especies, como por ejemplo mamíferos, aves, peces o reptiles. Por ejemplo, la sinaptotagmina-1 se encuentra en muchas especies, y presenta un alto índice de conservación; a continuación se recoge un ejemplo de los datos taxonómicos de la sinaptotagmina-1.

Informe Tax BLAST
Consulta gi|35086 Sinaptotagmina-1 (sinaptotagmina I)

Informe taxonómico

- 5 Bilateria 200 resultados 23 orgs [raíz; organismo celular; eucariota; hongos/grupo Meta2oa; metazoos; eumetazoos]
 Coelomata 195 resultados 22 orgs
 Chordata 170 resultados 18 orgs [Deuterostomia]
 Gnathostomata 163 resultados 14 orgs [Craniata; Vertebrata]
 Euteleostomi 163 resultados 13 orgs [Teleostomi]
 10 Tetrapoda 142 resultados 11 orgs [Sarcopterygii]
 Amniota 141 resultados 10 orgs
 Estherio 134 resultados 3 orgs [Mammalia; Theria]
 Laurasiatheria 24 resultados 2 orgs
 Bos taurus 11 resultados 1 orgs [Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos]
 Canis familiaris 13 resultados 1 orgs [Carnivora; Fissopedia; Canidae; Canis]
 15 Euarchontoglires 110 resultados 7 orgs
 Catarrhini 33 resultados 4 orgs [Primates; Simiiformes]
 Hominidae 36 resultados 3 orgs [Hominoidea]
 Pongo pygmeus 4 resultados 1 orgs [Pongo]
 Homo/Pan/Gorilla grupo 30 resultados 2 orgs
 20 Homo sapiens 20 resultados 1 orgs [Homo]
 Pan troglodytes 10 resultados 1 orgs [Pan]
 Macaca fascicularis 7 resultados 1 orgs [Cercopithecoidea; Cercopithecidae; Cercopitheoinae; Macaca]
 Murinae 71 resultados 3 orgs [Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muridae]
 Rattus 43 resultados 2 orgs
 25 Rattus rattus 31 resultados 1 orgs
 Rattus norvegicus 40 resultados 1 orgs
 Mus musculus 26 resultados 1 orgs [Mus]
 Gallus gallus 7 resultados 1 orgs [Sauropsida; Sauria; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliforme; Phasianidae;
 Phasianinae;
 30 Gaullus]
 Xenopus laevis 1 resultados 1 orgs [Amphibia; Batrachia; Anura; Mesobatrachia; Pipoidea; Pipidae; Xenopodinae;
 Xenopus;
 Xenopus]
 Clupeocephala 23 resultados 2 orgs [Actinopterygii; Actinopteri; Neopierygii; Teleostei; Elopocephala]
 35 Danio rerio 11 resultados 1 orgs [Otocephala; Ostariophysi; Otophysi; Cypriniformes; Cyprinidae;
 Cyprinidae;
 Rasborinae; Danio]
 Tetraodon nigroviridis 12 resultados 1 orgs [Euteleostei; Neognathi; Neoteleostei; Eurypterygii; Ctenosquamata;
 Acanthomorpha;
 40 Euacanthomorpha; Holacanthopt]
 Discopyge ommata 4 resultados 1 orgs [Chondrichthyes; Elasmobranchii; Neoselachii; Squalia; Hypnosqualia;
 Pristiorajae;
 Batoidea; Torpediniformes]
 Halocynthia roretzi 1 resultados 1 orgs [Urochordata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae; Halocynthia]
 45 Protostomia 18 resultados 7 orgs
 Mollusca 3 resultados 3 orgs
 Gastropoda 3 resultados 2 orgs
 Lymnaca stagnalis 1 resultados 1 orgs [Pulmonata; Basommatophora; Lymnaeoidea; Lymnaeidae; Lymnaea]
 Aplysia californica 2 resultados 1 orgs [Orthogastropoda; Apogastropoda; Heterobranchia; Euthyneura;
 50 Opisthobranchia;
 Anaspidea; Aplysioidea; Aplysiidae]
 Loligo pealei 2 resultados 1 orgs [Cephalopoda; Coleoidea; Neocoleoidea; Decapodiformes; Loliginidae; Loligo]
 Endopterygota 13 resultados 4 orgs [Panarthropoda; Arthropoda; Mandibulata; Pancrustacea; Hexapoda; Insecta;
 Dicondylia;
 55 Pterygota]
 Apis mellifera 2 resultados 1 orgs [Hymenoptera; Aculeata; Apoidea; Apidae; Apinae; Apini; Apis]
 Manduca sexta 2 resultados 1 orgs [Amphiesmenoptera; Lepidoptera; Glossata; Neolepidoptera; Heteroneura;
 Ditrysia;
 Obtectomera; Bombycoidea; Sphin]
 60 Sophophora 3 resultados 2 orgs [Diptera; Brachycera; Muscomorpha; Schizophora; Acalypterae; Ephydroidea;
 Drosophilidae;
 Droso]
 Drosophila melanogaster 2 resultados 1 orgs [melanogaster group; melanogaster subgroup]
 Drosophila pseudoobscura 1 resultados 1 orgs [obscura group; pseudoobscura subgroup]
 65 Dugesia japonica 1 resultados 1 orgs [Acoclomata; Platyhelminthes; Turbellaria; Seriata; Tricladida; Paludicola;
 Dugesidae;

Dugesia]

Caenorhabditis 11 resultados 2 orgs [Pseudocoelomata; Nematoda; Chromadorea; Rhabditida; Rhabditoidea; Rhabditidae; Peloderinae]

5 Caenorhabditis elegans 7 resultados 1 orgs

Caenorhabditis briggsae 4 resultados 1 orgs

<http://ncbi.nlm.nih.gov/sutils/iqtax.cgi>

10 *Producción de anticuerpos para detectar productos de escisión*

Los productos de escisión, como consecuencia de la actividad enzimática de los biomarcadores de enzimas proteolíticas de sus sustratos, también pueden detectarse. Los productos de escisión obtenidos a partir de muestras de pacientes que sufren una serie de lesiones neurales, niveles de gravedad de la lesión, fragmentos de trastornos neuronales y derivados de éstos pueden elaborarse tal y como se describe anteriormente. Además, los productos de escisión pueden estar sujetos a una digestión enzimática para obtener fragmentos o péptidos de los biomarcadores de cara a la producción de anticuerpos ante diferentes epítomos antigénicos que pueden estar presentes en un péptido frente a la proteína íntegra. Los epítomos antigénicos son útiles, por ejemplo, para generar anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unan al epítomo de forma específica. Los epítomos antigénicos pueden utilizarse como las moléculas diana en inmunoensayos (ver, por ejemplo, Wilson et al., *Cell* 37:767-778 (1984); Sutcliffe et al., *Science* 219:660-666 (1983)).

En una forma de realización preferida, los anticuerpos se une específicamente a biomarcadores identificados por los números de secuencia: 67, 68. Los anticuerpos dirigidos a los números de secuencia: 67, 68 también pueden incluir epítomos dirigidos a las regiones de los extremos N- y C-terminal de los biomarcadores identificados por los números de secuencia: 67, 68. Las proteínas de longitud completa y/o los fragmentos más largos que aquellos identificados por los números de secuencia: 67, 68 se disponen en la Tabla 1, incluyendo números de registro, para la producción de anticuerpos destinados a fragmentos más largos. Los anticuerpos pueden ir dirigidos a fragmentos más largos de los extremos N- y/o C-terminal, tal y como se identifican mediante los números de secuencia: 67, 68, y/o epítomos que expanden los lugares de segmentación identificados (consulte la Tabla 2), y pueden tener una longitud de sólo tres aminoácidos o de hasta 500 aminoácidos. Ver, por ejemplo, la Tabla 1 para comprobar la identidad de las proteínas de longitud completa. Los ejemplos comprenden de manera no limitativa: acromopeptidasa, aminopeptidasa, enzima convertidora de la angiotensina, bromelaína, calpaína, calpaína I, calpaína II, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa G, carboxipeptidasa P, carboxipeptidasa W, carboxipeptidasa Y, caspasa, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, caspasa 13, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina G, catepsina H, catepsina L, quimopapaína, quimasa, quimotripsina, α -clostripaína, colagenasa, complemento C1r, complemento C1s, factor del complemento D, factor del complemento I, cucumisina, dipeptidilpeptidasa IV, elastasa leucocítica, elastasa pancreática, endoproteinasa Arg-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, enteroquinasa, factor Xa, ficina, furina, granzima A, granzima B, proteasa del VIH, Igasa, caliceína de tejido, quinasa, leucina aminopeptidasas microsómicas, metaloproteasa de matriz, metionina aminopeptidasa, neutrasa, papaína, pepsina, plasmina, prolidasa, pronasa E, antígeno específico de la próstata, proteasa, proteasa S, proteinasa, proteinasa 3, proteinasa A, proteinasa K, proteína C, piroglutamato aminopeptidasa, trombina, activador tisular del plasminógeno, troponinas, tripsina, triptasa, uroquinasa.

Los productos de escisión pueden utilizarse, por ejemplo, para generar anticuerpos mediante métodos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sutcliffe et al., anteriormente; Wilson et al., anteriormente; Chow et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:910-914; y Bittle et al., *J. Gen. Virol.* 66:2347-2354 (1985)). Los polipéptidos neurales hidrolizados que contienen uno o varios epítomos inmunógenos pueden presentarse para desencadenar una respuesta de anticuerpos junto con una proteína transportadora, como una albúmina, en un sistema animal (como un conejo o un ratón) o, si el polipéptido tiene una longitud suficiente (al menos, aproximadamente 25 aminoácidos), dicho polipéptido puede presentarse sin un transportador. No obstante, se ha demostrado que los epítomos inmunógenos que constan tan solo de entre 8 y 10 aminoácidos son suficientes para generar anticuerpos capaces de unirse, como mínimo, a epítomos lineales en un polipéptido desnaturalizado (por ejemplo, en la prueba de transferencia Western).

Los polipéptidos portadores de epítomos de la presente invención pueden utilizarse para generar anticuerpos mediante métodos bien conocidos en la técnica, que comprenden de manera no limitativa, inmunización *in vivo*, inmunización *in vitro* y métodos de expresión en fagos. Ver, por ejemplo, Sutcliffe et al., anteriormente; Wilson et al., anteriormente, y Bittle et al., *J. Gen. Virol.*, 66:2347-2354 (1985). Si se utiliza la inmunización *in vivo*, los animales puede quedar inmunizados con péptidos libres; no obstante, puede aumentar el título de anticuerpos antipeptídicos por la unión del péptido a un transportador macromolecular, como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el toxoide tetánico; por ejemplo, los péptidos que contienen residuos de cisteína pueden unirse a un transportador utilizando un conector como el éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden unirse a transportadores utilizando un agente de unión más general, como por ejemplo el glutaraldehído. Los animales como conejos, ratas y ratones se inmunizan con péptidos libres o acoplados a un transportador, por

ejemplo, mediante inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contengan alrededor de 100 µg de péptidos o de proteína transportadora y adyuvante de Freund, o cualquier otro adyuvante conocido por estimular una respuesta inmunitaria. Pueden ser necesarias varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de alrededor de dos semanas, para así ofrecer un título útil de anticuerpos anti-peptídicos, que puede detectarse, por ejemplo, mediante el ensayo ELISA, utilizando péptidos libres adsorbidos sobre una superficie sólida. El título de anticuerpos anti-peptídicos en el suero de un animal inmunizado se puede aumentar mediante la selección de anticuerpos anti-peptídicos, por ejemplo, a través de la adsorción al péptido sobre un soporte sólido y una elución de los anticuerpos seleccionados mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Los epítomos de productos de escisión de los ácidos nucleicos también pueden recombinarse con un gen de interés como etiqueta del epítomo (por ejemplo, la etiqueta o etiqueta FLAG de la hemaglutinina «HA») para ayudar en la detección y purificación del polipéptido expresado. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al. permite la purificación rápida de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas de células humanas (Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia, de tal forma que el marco de lectura abierto del gen se fusiona translacionalmente con una etiqueta del extremo amino-terminal que consta de seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con el virus vaccinia recombinante se cargan en una columna de agarosa-ácido nitriloacético-Ni²⁺, y las proteínas etiquetadas con histidina pueden eluirse de forma selectiva con amortiguadores que contengan imidazol.

Los anticuerpos de la presente invención podrán generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica; los anticuerpos de esta invención podrán constar de anticuerpos policlonales. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia (Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. (1988), que se incorpora en su totalidad a la presente memoria como referencia). Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede administrarse a varios animales huésped, que comprenden de manera no limitativa, conejos, ratones, ratas, etc., para así provocar la producción de sueros que contengan anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración de los polipéptidos de la presente invención podrá suponer una o más inyecciones de un agente inmunizador y, si se desea, de un adyuvante. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, y que comprenden de manera no limitativa, el de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Estos adyuvantes también son bien conocidos por los expertos en la materia. En el contexto de la invención, «agente inmunizador» puede definirse como un polipéptido de la invención, incluyendo fragmentos, variantes y/o derivados de éstos, además de las fusiones con polipéptidos heterólogos y otras formas de polipéptidos que se describen en la presente memoria.

Típicamente, el agente inmunizador y/o adyuvante se inyectará en el animal mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, aunque también pueden aplicarse por vía intramuscular y/o intravenosa (i.v.). El agente inmunizador puede incluir polipéptidos de la presente invención, una proteína de fusión o variantes de ésta. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, porcentaje de hidrofobia, porcentaje de hidrofilia, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el agente inmunizador con respecto a una proteína que se sepa que es inmunógena en el mamífero que esté siendo inmunizado. Esta conjugación incluye una conjugación química mediante la derivación de grupos funcionales químicamente activos tanto hacia el polipéptido de la presente invención como hacia la proteína inmunógena, de tal manera que se forme un enlace covalente, o a través de una metodología basada en proteínas de fusión, o bien mediante otros métodos conocidos por el experto. Algunos ejemplos de estas proteínas inmunógenas son a título de ejemplo: hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de la soja. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, y que comprenden de manera no limitativa, el de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Otros ejemplos de adyuvantes que pueden utilizarse son el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización podrá ser seleccionado por parte de un experto en la materia sin una excesiva experimentación.

Los anticuerpos de la presente invención pueden asimismo comprender anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) y en la patente US nº 4.376.110, por parte de Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. (1988), por Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., (1981)), o mediante otros métodos conocidos en la técnica. Otros ejemplos de métodos que pueden utilizarse para generar anticuerpos monoclonales comprenden de manera no limitativa, la técnica del hibridoma con linfocito B humano (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030), y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subcategoría de éstas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales (mAb) de

esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de altos títulos de mAb *in vivo* hace que este sea el método preferido de producción en la actualidad.

5 En un método de hibridoma, un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunitario humano, un hámster u otro animal huésped adecuado suele ser inmunizado mediante un agente inmunizador, para así generar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica al agente inmunizador. Como alternativa, los linfocitos podrán ser inmunizados *in vitro*.

10 El agente inmunizador, por regla general, incluirá polipéptidos neurales, fragmentos o una proteína de fusión de éstos. Generalmente, si se desean células de origen humano, se utilizarán linfocitos de sangre periférica («PBL»), o bien, en el caso de que se deseen fuentes de mamíferos no humanos, se utilizarán células del bazo o de los ganglios linfáticos. Posteriormente, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada, utilizando un agente de fusión adecuado, como el polietilenglicol, para formar un hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas suelen ser células de mamífero transformadas, concretamente células de mieloma de origen roedor, bovino o humano. Típicamente, se utilizan líneas celulares de mieloma de ratas o ratones. Los hibridomas pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que, preferentemente, contendrá una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGRT o HPRT), al medio de cultivo de los hibridomas se añadirán hipoxantina, aminopterin y timidina («medio HAT»), sustancias que impiden el crecimiento de las células que carecen de HGPRT.

25 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan un alto nivel estable de expresión del anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como un medio HAT. Otras líneas celulares inmortalizadas preferidas son las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EUA, o en la American Type Culture Collection, Manassas, Va, EUA. Tal y como puede inferirse a través de la especificación, las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano también han sido descritas como métodos para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pp. 51-63).

35 El medio de cultivo en el que se cultivan los hibridomas puede analizarse después para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos neurales de la presente invención. preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas se determinará por inmunoprecipitación, o bien mediante un ensayo de unión *in vitro*, como un radioinmunoensayo (RIA) o mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Estas técnicas son conocidas en el sector y son asimismo conocidas por los expertos en la materia. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollart, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

40 Después de identificar los hibridomas deseados, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y cultivándolos con métodos estándar (Goding, anteriormente). Los medios de cultivo para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado de Dulbecco y el RPMI-1640. Como alternativa, los hibridomas pueden desarrollarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

45 Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del líquido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo cromatografía con proteína A-sefarosa, cromatografía con hidroxapatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

50 El experto en la materia sabe que existen varios métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, así, la invención no estará limitada a su producción exclusiva en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante, como los que se describen en la patente US nº 4.816.567. En este contexto, el término «anticuerpo monoclonal» hace referencia a un anticuerpo derivado de un solo clon eucariótico, fágico o procariótico. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos o a cadenas de origen humano, humanizado o de otro tipo). Los hibridomas de la invención sirven como origen preferido de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que posteriormente se transforman en células huésped como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de lo contrario, no producen inmunoglobulinas, para conseguir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

65 Los métodos para producir y buscar anticuerpos específicos mediante la tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, los ratones pueden ser inmunizados con un polipéptido de un biomarcador o una célula que exprese dicho péptido. Una vez detectada la respuesta inmunitaria, como por ejemplo

la detección de anticuerpos específicos del antígeno en el suero del ratón, el bazo del ratón se extrae y se aíslan los esplenocitos. Posteriormente, estos esplenocitos se fusionan mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, como por ejemplo células de la línea celular SP20 disponibles a través de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitada. Los clones de hibridoma son analizados posteriormente mediante métodos conocidos en el sector en busca de células que segreguen anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. El líquido ascítico, que suele contener altos niveles de anticuerpos, puede ser generado mediante la inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

En consecuencia, la presente invención ofrece métodos para generar anticuerpos monoclonales, así como anticuerpos producidos mediante el método que consiste en el cultivo de un hibridoma que segregue un anticuerpo de la invención, en el cual, preferentemente, el hibridoma se genera mediante la fusión de esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma, y posteriormente se analizan los hibridomas resultantes de la fusión en busca de clones de hibridoma que segreguen un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Los anticuerpos que detecten productos de escisión, péptidos y derivados de éstos pueden utilizarse en inmunoensayos y en otros métodos para identificar nuevos productos de escisión, así como de cara al uso en el diagnóstico de lesiones neurales, del nivel de gravedad de las lesiones y/o de trastornos neurológicos.

También pueden utilizarse otros métodos para la producción a gran escala de anticuerpos específicos para productos de hidrólisis. Por ejemplo, los anticuerpos también pueden generarse utilizando varios métodos de expresión en fago conocidos en el sector; en estos métodos de expresión en fago, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de partículas de fago que transportan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una forma de realización concreta, ese fago puede utilizarse para expresar dominios de unión del antígeno expresados a partir de un abanico o de una biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a un antígeno que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, utilizando uno etiquetado o uno unido o capturado por una superficie sólida o una esfera. Los fagos utilizados en esos métodos suelen ser fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro, fusionados de forma recombinante a la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Entre los ejemplos de métodos de expresión en fago que se pueden utilizar para elaborar los anticuerpos de la presente invención se incluyen los revelados en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); solicitud PCT nº PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes US nº 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos de la presente invención tienen diversas utilidades. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden utilizarse en ensayos diagnósticos para detectar la presencia o cuantificar los polipéptidos de la invención en una muestra. Este ensayo diagnóstico puede constar por lo menos de dos fases: una primera en la que se somete la muestra con el anticuerpo, donde dicha muestra es un tejido (por ejemplo, humano, animal, etc.), un líquido biológico (por ejemplo, sangre, orina, esputo, semen, líquido amniótico, saliva, etc.), un extracto biológico (por ejemplo, tejido u homogenado celular, etc.), un microchip de proteína (por ejemplo, consulte Arenkov P, et al., *Anal Biochem.*, 278(2):123-131 (2000)) o una columna de cromatografía, etc.; y una segunda fase que implica la cuantificación del anticuerpo unido al sustrato. Como alternativa, el método puede implicar además una primera fase para unir el anticuerpo, ya sea de forma covalente, electrostática o reversible, a un soporte sólido, y una segunda fase en la que el anticuerpo unido se expone a la muestra, tal y como se define anteriormente y a lo largo de la presente memoria.

En la disciplina se conocen diversas técnicas de ensayo diagnóstico, como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich indirectos o directos y ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo en fases heterogéneas u homogéneas (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., (1987), pp. 147-158). Los anticuerpos utilizados en los ensayos diagnósticos pueden etiquetarse con una región detectable. La región detectable debería ser capaz de producir, ya sea de forma directa o indirecta, una señal detectable. Por ejemplo, la región detectable puede ser un radioisótopo, como ^2H , ^{14}C , ^{32}P , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina o la luciferina, o una enzima, como la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa, la proteína fluorescente verde o la peroxidasa de rábano picante. Puede emplearse cualquier método conocido en la disciplina para conjugar el anticuerpo con la región detectable, incluyendo los métodos descritos por Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochem.*, 13:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40:219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407 (1982).

Kits

En otro aspecto más, la invención proporciona kits para ayudar en el diagnóstico de las lesiones neurales, nivel de gravedad de la lesión, localización subcelular y/o trastornos neuronales, donde los equipos pueden utilizarse para detectar los marcadores de la presente invención. Por ejemplo, dichos equipos pueden utilizarse para detectar uno o más de los marcadores descritos en la presente memoria, los cuales estarán presentes en niveles diferentes en

muestras de un paciente y de sujetos normales. Los equipos de la invención pueden tener muchas aplicaciones. Por ejemplo, los equipos pueden utilizarse para diferenciar si un sujeto tiene un diagnóstico negativo, ayudando así en el diagnóstico de las lesiones neuronales. En otro ejemplo, los equipos pueden utilizarse para identificar compuestos que modulen la expresión de uno o más de los marcadores en modelos animales *in vitro* o *in vivo*, para así determinar los efectos del tratamiento.

En una forma de realización, el kit comprende (a) una composición o panel de biomarcadores; (b) una proteína sustrato; y (c) un reactivo de detección. Estos equipos pueden prepararse con los materiales descritos anteriormente, y los comentarios anteriores sobre tales materiales (por ejemplo, anticuerpos, reactivos de detección, soportes inmovilizados, etc.) son plenamente aplicables a este apartado, por lo que no se repetirán. Opcionalmente el kit puede contar además con columnas de centrifugado de fraccionamiento previo. En algunas formas de realización, el kit puede contar además con instrucciones sobre los parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o un prospecto aparte.

En una forma de realización preferida, la composición o el panel de biomarcadores incluirá por lo menos un biomarcador seleccionado de cualquiera de los identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68. preferentemente, el panel de biomarcadores incluirá por lo menos dos biomarcadores seleccionados a partir de los números de secuencia: 10, 67, 68, y hasta 3 biomarcadores seleccionados a partir de los números de secuencia: 10, 67, 68.

En una forma de realización adicional, la invención incluye un kit de diagnóstico destinado a su utilización en el análisis del suero que contiene antígenos del polipéptido de la invención. El kit de diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado que es específicamente inmunorreactivo con antígenos del polipéptido, y es un medio para detectar la unión del antígeno del polipéptido al anticuerpo. En una forma de realización, el anticuerpo está unido a un soporte sólido. En una forma de realización específica, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El medio de detección del kit puede incluir un segundo anticuerpo monoclonal marcado. Como alternativa, o como adición, el medio de detección puede incluir un antígeno competitivo marcado.

En una configuración de diagnóstico, el suero problema reacciona con un reactivo en fase sólida que posee un antígeno unido a su superficie, obtenido mediante los métodos de la presente invención. Después de la unión del anticuerpo al antígeno específico del reactivo y de eliminar los componentes del suero no unidos mediante lavado, el reactivo reacciona con un anticuerpo antihumano marcado con indicador que une el indicador al reactivo en proporción a los anticuerpos antiantígeno que están unidos al soporte sólido. De nuevo, se lava el reactivo para eliminar los anticuerpos marcados no unidos, y se determina la cantidad de indicador asociada con el reactivo. Típicamente, el indicador es una enzima que se detecta mediante la incubación de la fase sólida en presencia de un sustrato fluorométrico, luminiscente o colorimétrico adecuado (Sigma, St. Louis, Mo., EUA).

El reactivo de la superficie sólida del ensayo anterior se prepara mediante técnicas conocidas para unir material proteico a material de soporte sólido, como esferas poliméricas, tiras reactivas, placas de 96 pocillos o material de filtración. Estos métodos de unión suelen incluir la adsorción inespecífica de la proteína al soporte o la fijación con enlace covalente de ésta, típicamente a través de un grupo amino libre, a un grupo químicamente reactivo situado en el soporte sólido, como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activado. Como alternativa, pueden utilizarse placas recubiertas de estreptavidina conjuntamente con antígenos biotinilados.

Opcionalmente, el kit puede contener además un estándar o información de control, de tal forma que la muestra problema pueda compararse con el estándar de información de control para así determinar si la cantidad de prueba de un marcador detectado en una muestra es una cantidad diagnóstica que concuerda con un diagnóstico de lesión neural, nivel de gravedad de la lesión, localización subcelular, trastorno neuronal y/o efecto del tratamiento en el paciente.

En otra forma de realización, un kit comprende: (a) un sustrato que cuenta con un adsorbente sobre él que es adecuado para unirse a un marcador, (b) cualquier biomarcador (hasta 3) seleccionados a partir de los biomarcadores identificados por los números de secuencia: 10, 67, 68, y (c) instrucciones para detectar el marcador o marcadores, poniendo una muestra en contacto con el adsorbente y detectando el marcador o marcadores retenidos por éste. En algunas formas de realización, el kit puede constar de un eluyente (como alternativa o en combinación con instrucciones) o de instrucciones para elaborar un eluyente, donde la combinación del adsorbente y el eluyente permita la detección de los marcadores utilizando la espectrometría de iones en fase gaseosa. Estos equipos pueden prepararse a partir de los materiales descritos anteriormente, y los comentarios sobre tales materiales (por ejemplo, sustratos de sonda, adsorbentes, soluciones de lavado, etc.) son plenamente aplicables a este apartado, por lo que no se repetirán.

En otra forma de realización, el kit puede disponer de un primer sustrato que cuente con un adsorbente sobre él (por ejemplo, una partícula funcionalizada con un adsorbente) y un segundo sustrato sobre el cual puede colocarse el primer sustrato para formar una sonda extraíble e insertable en un espectrómetro de iones en fase gaseosa. En otras formas de realización, el kit puede constar de un solo sustrato en forma de una sonda extraíble e insertable, con adsorbentes sobre el sustrato. En otra forma más de realización, el kit puede constar, además, de una columna

de centrifugado de fraccionamiento previo (por ejemplo, columna de agarosa-azul de Cibacrón, columna de agarosa anti-HSA, columna de exclusión por tamaño, columna Q de centrifugado de intercambio de aniones, columna de ADN monocatenario, columna de lectina, etc.).

5 Opcionalmente, el kit puede comprender además instrucciones para los parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o de un prospecto aparte. Por ejemplo, el kit puede presentar instrucciones estándares en las que se informe a un consumidor sobre cómo lavar la sonda después de que una muestra haya entrado en contacto con ella. En otro ejemplo, el kit puede tener las instrucciones para efectuar el fraccionamiento previo de una muestra para reducir la complejidad de las proteínas presentes en ésta. En otro ejemplo, el kit puede disponer de instrucciones para automatizar el fraccionamiento u otros procesos.

10 Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo. Aunque se han proporcionado ejemplos específicos, la descripción adicional es ilustrativa, y no restrictiva. Una o más de las características de las formas de realización previamente descritas puede combinarse de cualquier manera con una o más características de cualquiera de las demás formas de realización de la presente invención. Además, muchas variaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción. Por tanto, el alcance de la invención no debería determinarse en referencia a la descripción anterior, sino que debería establecerse a partir de las reivindicaciones adjuntas junto con su alcance completo de equivalencias.

15 Mediante la cita de diversas referencias en la presente memoria los solicitantes no admiten ninguna referencia particular como «técnica anterior» con respecto a su invención.

Ejemplos

25 *Materiales y métodos*

Modelo in vivo del modelo de lesiones cerebrales

30 En ratas, se utiliza un dispositivo de impacto cortical controlado (CCI) para modelar las LCT y generar muestras de tejido cerebral y de LCR. Las ratas macho adultas (280-300 g) Sprague-Dawley (Harlan: Indianápolis, Ind., EUA) son anestesiadas con un 4% de isoflurano en un gas portador de 1:1 O₂/N₂O (4 min.), seguido por una anestesia de mantenimiento del 2,5% de isoflurano en el mismo gas portador. La temperatura interna corporal está controlada constantemente mediante una sonda termistor rectal, y se mantiene a 37±1° C colocando una almohadilla térmica de temperatura ajustable bajo las ratas. Los animales están montados en un marco estereotáctico en posición boca abajo, asegurados mediante barras auriculares y de incisivos. Se practica una incisión craneal en la línea media, se apartan las partes blandas y se efectúa una craneotomía unilateral (ipsilateral al lugar del impacto) de 7 mm de diámetro junto a la sutura central, a medio camino entre bregma y lambda. La duramadre se mantiene intacta sobre la corteza. El traumatismo cerebral se produce por impacto sobre la corteza derecha (corteza ipsilateral) con una punta de impacto de aluminio de 5 mm de diámetro (insertada en un cilindro neumático) a una velocidad de 3,5 m/s, con una compresión de 1,6 mm y un tiempo de permanencia de 150 ms (duración de la compresión). Estas lesiones están asociadas con diferentes magnitudes de contusión cortical local y daños axonales más difusos. La velocidad se controla ajustando la presión (N₂ comprimido) suministrada al cilindro neumático. La velocidad y el tiempo de permanencia se miden mediante un transductor de desplazamiento de la velocidad lineal (modelo 500 HR de Lucas Shaevitz™; Detroit, Mich., EUA), que produce una señal analógica registrada por un osciloscopio de almacenamiento de la trayectoria (BK Precision, modelo 2522B; Placentia, Calif., EUA). Los animales de control con lesiones simuladas son sometidos a procedimientos quirúrgicos idénticos, pero no sufren una lesión provocada por un impacto. Para garantizar el cumplimiento de las directrices establecidas por el Comité Institucional para el Cuidado y el Uso de los Animales de la Universidad de Florida y por los Institutos Nacionales de Salud que se detallan en la guía para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio, se mantiene un cuidado adecuado tanto antes como después de la lesión. Tal y como se describe a continuación, se obtienen muestras de tejido cerebral de diferentes regiones, así como de LCR y de suero, en un máximo de 7 puntos de tiempo (6, 12 y 24 horas, y 2, 3, 7 y 14 días) después del CCI.

50 De forma similar, las lesiones multiorgánicas pueden inducirse mediante sepsis en ratas utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Recogida y preparación de tejido cerebral

60 En los momentos adecuados (6, 12, 24, 48 y 72 h, 5 y 7 días) tras la lesión, los animales son anestesiados y sacrificados inmediatamente por decapitación. El tejido orgánico se retira inmediatamente, se enjuaga con PBS enfriado en hielo y se divide por la mitad. Rápidamente se procede a diseccionar diferentes regiones (si así se desea), a enjuagarlas con PBS enfriado en hielo y a congelarlas inmediatamente en nitrógeno líquido, y se mantienen congeladas a -80° C hasta que se utilizan. En el caso del análisis de transferencia Western, las muestras cerebrales se pulverizan con un pequeño mortero sobre hielo seco, para convertir las en un polvo fino. El polvo del tejido cerebral pulverizado es posteriormente lisado durante 90 minutos a 4 °C con Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, Tritón X-100 1% (v/v), DTT 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas 1x (Roche Biochemicals). Los lisados

cerebrales se centrifugan después a 8.000 g durante 5 min a 4° C para limpiar y eliminar los restos insolubles; a continuación, estos lisados se congelan inmediatamente y se almacenan a -85° C hasta que se utilizan.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y electrotransferencia

Las concentraciones de proteínas de los lisados tisulares y del LCR se determinan con ensayos de microproteínas en ácido bicineónico (Pierce Inc., Rockford, Ill., EUA) con estándares de albúmina. Las muestras con equilibrio de proteínas se preparan para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en un amortiguador de carga doble que contiene: Tris 0,25 M (pH 6,8), DTT 0,2 M, SDS 8%, azul de bromofenol 0,02% y glicerol 20% en H₂O destilada. Veinte microgramos (20 µg) de proteína por línea se hacen correr en la SDS-PAGE sobre geles de Tris 6,5%/glicina durante 2 h a 200 V. Tras la electroforesis, las proteínas separadas se transfieren lateralmente a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en un amortiguador de transferencia que contiene glicina 0,500 M y Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3) con metanol al 10% y aplicando un voltaje constante de 20 V durante 2 h a 4° C en una unidad de transferencia semiseca (Bio-Rad).

ELISA de sándwich

Los anticuerpos monoclonales y el anticuerpo policlonal de conejo específicos frente a biomarcadores se producen en el laboratorio. Para determinar la reactividad y la especificidad de los anticuerpos, un panel tisular es sondado mediante la prueba de transferencia Western. Un ELISA indirecto se utiliza con la proteína recombinante del biomarcador unida a la placa ELISA para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos utilizados en el ensayo. Este ensayo determina una concentración sólida de anticuerpos antibiomarcadores para utilizar en el ensayo. Los pocillos de la microplaca de 96 pocillos están recubiertos con 50 ng/pocillo, y los anticuerpos antibiomarcadores de conejo y ratón se diluyen en serie, comenzando con una dilución de 1:250 hasta llegar a 1:10.000 para determinar la concentración óptima que debe utilizarse para el ensayo. Para evaluar los resultados, se utiliza un anticuerpo secundario de detección marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anticonejo (o antirratón) y Ultra-TMB como sustrato de detección.

Una vez que se determina la concentración de anticuerpos correspondiente a la señal máxima, se establece el límite máximo de detección del ELISA indirecto para cada anticuerpo. Las microplacas de 96 pocillos están recubiertas con una concentración desde los 50 ng/pocillo, y se diluyen en serie hasta <1 pg/pocillo. A efectos de detección, los anticuerpos se diluyen hasta la concentración determinada anteriormente. Esto ofrece un intervalo de sensibilidad para los ensayos de biomarcadores ELISA, y determina qué anticuerpo elegir como anticuerpo de captura y de detección.

Optimización y mejora de la señal en el ELISA de sándwich: el anticuerpo de detección está directamente marcado con HRP para evitar cualquier reactividad cruzada, y así poder mejorar la señal con el sistema de amplificación, que es muy sensible. Este formato se utiliza en la detección de todos los biomarcadores. Los pocillos de la placa de 96 pocillos están recubiertos con concentraciones saturadas de anticuerpo purificado (~ 250 ng/pocillo); la concentración del antígeno del biomarcador oscila entre los 50 ng y <1 pg/pocillo, mientras que el anticuerpo de detección está en la concentración determinada anteriormente. Inicialmente, el complejo se detecta con un anticuerpo secundario marcado con HRP para confirmar el formato de ELISA en sándwich, y el sistema de detección es sustituido por el anticuerpo de detección marcado con HRP.

Se utilizan curvas estándares de biomarcadores y muestras de animales de control y con lesiones. Esto también determina el paralelismo entre las muestras de suero y la curva estándar. Las muestras de suero se inoculan con una dilución en serie de cada biomarcador, de forma similar a la curva estándar; los resultados paralelos equivalen a un 80-100% de recuperación. Si una concentración elevada de suero presentara sustancias interferentes, se determinará la dilución mínima requerida para suprimir dicha interferencia. El ensayo se utiliza para evaluar los niveles de biomarcador en suero procedente de animales con lesiones de diferentes magnitudes, seguidas a lo largo del tiempo.

Análisis de inmunotransferencia

Después de la electrotransferencia, las membranas de transferencia se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente en leche desnatada al 5% en TBS y con Tween-2 al 0,05% (TBST); posteriormente, se incuban con anticuerpos primarios monoclonales o policlonales en TBST con el 5% de leche (consulte la lista que aparece a continuación, con una dilución de 1/1000 a 1/3000, tal y como recomienda el fabricante) a 4° C por la noche, proceso al que le siguen cuatro lavados con TBST y una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (quimioluminiscencia mejorada, método [ELC]) o con un anticuerpo secundario biotinilado (Amersham), seguido de una incubación de 30 minutos con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (método colorimétrico). Los reactivos ECL (Amersham) se utilizan para visualizar el inmunoetiquetado con una radiografía. Como alternativa, se lleva a cabo un desarrollo colorimétrico con un reactivo BCIP de una fase (Sigma). El peso molecular de las proteínas intactas y de sus posibles productos de degradación (BDP) se evalúa mediante la aplicación de patrones de peso molecular con los colores del arcoiris (Amersham). La evaluación semicuantitativa de los niveles de proteínas y de BDP se lleva a cabo mediante un análisis

(b) Desarrollo y utilización del sistema ELISA específico de fragmento

Para ilustrar el método de preparación del inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) específico de un fragmento, se utiliza tau-BDP-26 kDa a título de ejemplo: la primera prueba de transferencia Western se utiliza para confirmar la inmunorreactividad de los anticuerpos monoclonales comerciales que reconocen la proteína tau de rata y sus BDP (Cedarlane, clon de tau-1), así como los anticuerpos policlonales antitau-BDP-26 kDa. Se utilizan 10 µg/ml del anticuerpo policlonal antitau-BDP-26 kDa como anticuerpo de captura para recubrir los pocillos de la microplaca ELISA de 96 pocillos con amortiguador de carbonato-bicarbonato 0,1 M y pH 9,8 durante la noche. Después de enjuagar tres veces cada pocillo con 200 µl de PBS con Tween 20 al 0,05%, las localizaciones no específicas se bloquean con un amortiguador de bloqueo (BSA 0,1%, Tween 20 0,05% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. El lisado de tejido cerebral (1-25 µg) o las muestras de LCR (2,5-10 µl) de animales de control y LCT se diluyen con un amortiguador de bloqueo hasta los 100 µl, y se añaden a cada pocillo. La placa se incuba en un agitador a 150 rpm, a 26 °C entre 30 minutos y 2 horas. Después de enjuagar tres veces cada pocillo con 200 µl de PBS con Tween al 0,05%, los pocillos serán sondados con anticuerpos monoclonales comerciales de detección que reconocen la proteína tau de rata y su anticuerpo específico de fragmento de los BDP a 1 µg/ml con amortiguador de bloqueo (100 µl) y se incuban a 150 rpm, a 26 °C durante 30-60 minutos. Las fases de lavado se repiten, y la placa se expone a los anticuerpos secundarios acoplados a la HRP (1/20.000) (Pierce) lavada de nuevo antes de desarrollarse con 100 µl de solución de sustrato TMB (reactivo de peroxidasa ABC ultrasensible, Pierce) (prod. de Pierce nº 34028), con incubación a 150 rpm, a 26 °C durante 5-30 minutos. Tras la adición de 50 µl de solución de parada (1 NH₂SO₄) a cada pocillo (5 min), la placa se leerá a OD₄₅₀ nm con un espectrofotómetro. Este formato de ELISA de sándwich detecta de forma selectiva la proteína tau-BDP-26 kDa, pero no la tau intacta u otros productos BDP presentes en las muestras biológicas.

Ejemplo comparativo 1: detección de proteínas neurales sometidas a un ataque proteolítico 48 horas después de una lesión cerebral traumática (LCT) en ratas

La LCT fue provocada en roedores tal y como se ha descrito anteriormente. Tras 48 h después de la LCT, de la operación simulada o en ratas sin tratamiento previo, se tomaron muestras de LCR que se analizaron para detectar la presencia de cinco nuevos marcadores de proteínas neurales (NF-H (A), NF-L (B), tau (C), APP (D) y βII-espectrina (E) (FIG. 2), y fueron identificadas como vulnerables ante un ataque proteolítico endógeno, generando productos mayores de degradación (BDP) en el hipocampo ipsilateral. También se analizaron muestras de la corteza ipsilateral, que mostraron unos patrones de proteólisis muy similares. Estos BDP únicos, cuando se acumulan en los líquidos biológicos como LCR y sangre, pueden ser fácilmente detectables mediante técnicas inmunológicas, como transferencia Western o ELISA y, por ende, son excelentes marcadores de diagnóstico de lesiones o estrés de órganos específicos (cerebro, médula espinal o nervio periférico) (FIG. 1).

Ejemplo comparativo 2: detección de proteínas de mielina sujetas a un ataque proteolítico 48 horas después de una lesión cerebral traumática (LCT) en ratas

La LCT fue provocada en roedores tal y como se ha descrito anteriormente. Tras 48 h posteriores a la LCT o de la operación simulada o en ratas no expuestas, se tomaron muestras de LCR que se analizaron para detectar la presencia de dos nuevos marcadores de proteínas de vainas de mielina (MBP y MOSP) (FIG. 3), y fueron identificadas como vulnerables ante un ataque proteolítico endógeno, generando productos mayores de descomposición (BDP) en el hipocampo ipsilateral. También se analizaron muestras de la corteza ipsilateral, que mostraron unos patrones de proteólisis muy similares. A partir del único lugar de escisión hallado en la MBP (DENP_{VVHFF}₁₁₄^{AK}₁₁₅NIVTPP), se han generado anticuerpos policlonales y monoclonales que detectan específicamente el nuevo extremo N-terminal (NH₂-KNIVTPP) de los MBP-BDP de 12 kDa y 10 kDa (FIG. 4). Estos BDP únicos, cuando se acumulan en líquidos biológicos como el LCR o la sangre, son excelentes marcadores de diagnóstico para lesiones o estrés específicos de órganos (cerebro, médula espinal o nervio periférico), y pueden detectarse mediante técnicas que utilizan herramientas de anticuerpos específicos de fragmentos, como las que se describen en la FIG. 4, a través de la prueba de transferencia Western o ELISA.

Ejemplo comparativo 3: Detección de proteínas sinápticas (sinaptotagmina y sinaptojanina-1) degradadas en la corteza y/o el hipocampo de rata 48 horas después del LCT en ratas

La LCT fue provocada en roedores tal y como se ha descrito anteriormente. 48 h después de la LCT, de la operación simulada o en ratas no expuestas, se tomaron muestras de LCR que se analizaron para detectar la presencia de cinco nuevos marcadores de proteínas sinápticas. La sinaptotagmina y (parte superior) y la sinaptojanina-1 (parte inferior) (FIG. 5), fueron identificadas como vulnerables ante un ataque proteolítico endógeno, generando productos mayores de degradación (BDP) en el hipocampo ipsilateral. También se analizaron muestras de la corteza ipsilateral, que mostraron unos patrones de proteólisis muy similares. Estos BDP únicos, cuando se acumulan en los líquidos biológicos como LCR y sangre, son detectados mediante técnicas inmunológicas, como transferencia Western o ELISA y, por ende, son excelentes marcadores de diagnóstico para lesiones o estrés de órganos específicos (cerebro, médula espinal o nervio periférico) (FIG. 1).

Ejemplo comparativo 4: Detección de la escisión de las proteínas cardíacas troponina-T2 y troponina-I32 por las proteasas calpaína-2 y calpaína-3, que da lugar a productos de degradación únicos

5 El estrés cardiovascular, la insuficiencia cardíaca o la isquemia cardíaca provocan la sobreactivación de proteasas como la calpaína y la caspasa-3. En la presente memoria se utilizan isoformas cardíacas humanas purificadas de troponina T2 y troponina I3, sujetas a la incubación *in vitro* con calpaína y/o caspasa-3. Hallamos que ambas troponinas son vulnerables ante ataques proteolíticos (FIG. 6), generando productos mayores de degradación (BDP) en el proceso. Cabe esperar que se produzcan los mismos BDP tanto en animales como en seres humanos con lesiones o estrés de tipo cardíaco. Estos BDP únicos, cuando se acumulan en los líquidos biológicos como LCR y sangre, pueden ser fácilmente detectables mediante técnicas inmunológicas, como transferencia Western o ELISA y, por ende, son excelentes marcadores de diagnóstico para lesiones o estrés específicos de órgano (corazón) (FIG. 1).

15 *Ejemplo 5: Detección de lugares no evidentes y únicos de escisión de las principales proteínas orgánicas o tisulares en animales estresados o con lesiones, o durante la incubación in vitro con proteasa*

20 Utilizando los métodos descritos anteriormente y similares a los establecidos en los ejemplos 1-3, se han identificado por lo menos 43 lugares no evidentes y únicos de escisión de las principales proteínas orgánicas o tisulares (Tabla 2; números de secuencia: 1 -148). Los lugares de escisión exactos permiten la síntesis de péptidos que imitan al nuevo epítipo del extremo C-terminal o del extremo N-terminal, y éstos pueden utilizarse posteriormente para generar anticuerpos específicos de fragmento u otros agentes de captura o detección. Estos BDP únicos, cuando se acumulan en los líquidos biológicos como LCR y sangre, pueden ser fácilmente detectables mediante los métodos descritos en la presente memoria, como por ejemplo técnicas inmunológicas, como transferencia Western o ELISA y, por ende, son excelentes marcadores de diagnóstico para lesiones o estrés específicos de órgano (corazón) (FIG. 1).

25 Otras formas de realización

30 Debe apreciarse que, aunque la invención se ha descrito conjuntamente con su descripción detallada, la descripción anterior está destinada a ilustrar dicha invención y no limitar su alcance, que es definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están comprendidos en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

TABLA 2. Ejemplos de lugares de escisión no evidentes y únicos de proteínas tisulares producida por el ataque de la proteasa

Proteína	Peso molecular Proteína	Nº ac.	Especie BDP	Peso molecular BDP	Lugar de escisión identificado	Ejemplo de nuevos epítopos específicos de fragmento de extremo C y N	anticuerpos
Alfa II-espectrina	260 kDa	hipotética	Perro	SBDP150-150 kDa short	WRSLLQLAEERSEVY 1173 *G 1174 MMPRDDTDSKTASP SEC ID nº: 1	WRSLLQLAEERS EVY-COOH ; SEC ID nº: 49 NH2- GMMPRDDTDSKTASP SEC ID nº: 50	
Musculo esquelético rápido Troponina-T3	33 kDa	NP_006748	Humano	TnT3BDP 22 kDa	AEEDAEEEEKPRPKLT 44 *A 45 PKI PEGEKVDFFDDIQ SEC ID nº: 2	AEEDAEEEEKPRPKLT-COOH ; SEC ID nº: 51 NH2 APIPEGEKVDFFDDIQ SEC ID nº: 52	
Musculo esquelético rápido Troponina I-2 (1)	22 kDa	NP_003273	Humano	TnI2BDP <10 kDa	PPLRRVRMSADAMLK 124 *A 125 L LGSKHKVCMDLRAN SEC ID nº: 3	PPLRRVRMSADAMLK-COOH; SEC ID nº: 53 NH2 ALLGSKHKVCMDLRAN SEC ID nº: 54	
Musculo esquelético rápido Troponina I-2 (2)	22 kDa	NP_003273	Humano	TnI2BDP <10 kDa	GSKHKVCMDLRANLK 142 *Q 143 V KKEDTEKERDLRDV SEC ID nº: 4	GSKHKVCMDLRANLK-COOH; SEC ID nº: 55 NH2 QVKKEDTEKERDLRDV SEC ID nº: 56	
Musculo esquelético rápido Troponina I-2 (3)	22 kDa	NP_003273	Humano	TnI2BDP <10 kDa	EEEEKYDMEVRVQKTS 90 *K 91 ELE DMNQKLFDLRGK SEC ID nº: 5	EEEEKYDMEVRVQKTS-COOH; SEC ID nº: 57 NH2 KELEDMNQKLFDLRGK SEC ID nº: 58	
Musculo esquelético lento Troponina-T1	33 kDa	NP_003274	Humano	TnT1BDP 12 kDa	VLSNMGAFHGGYLVK 167 *A 168 EQKRGKRQTGREMKV SEC ID nº: 6	VLSNMGAFHGGYLVK-COOH; SEC ID nº: 59 NH2 AEQKRGKRQTGREMKV; SEC ID nº: 60	
Musculo esquelético rápido/lento Troponina I1 y I2	22 kDa	NP_006748	Humano	TnT3BDP <10 kDa	TREIKDLKLVMDLR 115 *G 116 KFKRPPLRRVRVSA SEC ID nº: 7	TREIKDLKLVMDLR-COOH; SEC ID nº: 61 NH2 GKFKRPPLRRVRVSA SEC ID nº: 62	
Musculo esquelético rápido Troponina-I1	22 kDa	NP_003273	Humano	TnI1BDP	KELEDMNQKLFDLRG ¹⁰⁶ ↓K ¹⁰⁷ FKRPPLRRVRMSAD SEC ID nº: 8	KELEDMNQKLFDLRG-COOH ; SEC ID nº: 63 NH2- KFKRPPLRRVRMSAD SEC ID nº: 64	
Musculo esquelético rápido Troponina-T3	33 kDa	NP_006748	Humano	TnT3BDP	PKLTAPKIPEGEKVD55 ↓F 56 DDIQKKRQNKDLME SEC ID nº: 9	PKLTAPKIPEGEKVD -COOH ; SEC ID nº: 65 NH2- FDDIQKKRQNKDLME SEC ID nº: 66	
MAP 2A/B/C/D	300 kDa	CAA37535	Rata	Y 90 kDa	ADRETAEEVSARIVQ 96 *V 97 VTA EAVAVLKGEQE SEC ID nº: 10	ADRETAEEVSARIVQ -COOH ; SEC ID nº: 67 NH2- VVTA EAVAVLKGEQE SEC ID nº: 68	
MBP	18-21 kDa*	CAA10805	Rata	M-BDP-10-	KSQRTQDENPVVHFF ¹¹⁴ *K ₁₁₅ NIVTPRTPPPSQG	KSQRTQDENPVVHFF-COOH; SEC ID nº: 69 NH2- K115NIVTPRTPPPSQG-COOH	

NF-L	68 kDa	AAH39237	Humano NFL-BDP	30 kDa	12 kDa	SEC ID n°: 11	SEC ID n°: 70
						KSRFTVLTESAANKND297	KSRFTVLTESAANKND-COOH ; SEC ID n°: 71
						A298VRAAKDEVSESRRL	NH2- AVRAAKDEVSESRRL SEC ID n°: 72
						SEC ID n°: 12	
NF-L	68 kDa	AAH39237	Humano NFL-BDP	31 kDa		NAEEWFKSRFTVLTE 290*S291	NAEEWFKSRFTVLTE -COOH ; SEC ID n°: 73
						AAKNTDAVRAAKDE	NH2- SAAKNTDAVRAAKDE SEC ID n°: 74
						SEC ID n°: 13	
NF-M	150 kDa	NP_005373	Humano NFM-BDP	80 kDa		QAEWFKCRYAKLTE300*A	QAEWFKCRYAKLTE -COOH ; SEC ID n°: 75
						301AEQNKEAIRSAKEE	NH2- AAEQNKEAIRSAKEE ; SEC ID n°: 76
						SEC ID n°: 14	
NF-M	150 kDa	NP_005373	Humano NFL-BDP	32 kDa		ALKEIRSQLESHSDQ283*N284	ALKEIRSQLESHSDQ-COOH ; SEC ID n°: 77
						MHQAEWFKCRYAK	NH2- NMHQAEWFKCRYAK SEC ID n°: 78
						SEC ID n°: 15	
Proteína priónica	28 kDa	AAX42952	Humano PrBDP			AAGALVGLGGYMLG 131 *S 132	AAGALVGLGGYMLG -COOH ; SEC ID n°: 79
						AMSRPIIHFGSDYE	NH2 SAMSRPIIHFGSDYE SEC ID n°: 80
						SEC ID n°: 16	
Músculo	22 kDa	NP_003273	Humano Trl2BDP			REIKDLKLVMDLRG 107 jK 108	REIKDLKLVMDLRG -COOH ; SEC ID n°: 81
esquelético lento						FKRPPLRRVRSAD	NH2- FKRPPLRRVRSAD SEC ID n°: 82
Troponina-I2						SEC ID n°: 17	
Músculo	33 kDa	NP_003274	Humano TnT1BDP			PPLIPKPIEGERVVD 50 jF 51	PPLIPKPIEGERVVD -COOH ; SEC ID n°: 83
esquelético lento						DDIHRKRMEKDLLE	NH2- FDDIHRKRMEKDLLE SEC ID n°: 84
Troponina-T1						SEC ID n°: 18	
Tau 441-	50 kDa	NP_058908	Rata TBDP	26 kDa		QAAGHVTQARVAGVS 121 (circumflex over	QAAGHVTQARVAGVS -COOH ; SEC ID n°: 85
isoforma						j)K 122	NH2- KDRRTGNDEKKAKGADG SEC ID n°: 86
						DRTGNDEKKAKGADG	
						SEC ID n°: 19	
Tau 441-	50 kDa	AAC04279	Humano TBP	23 kDa		EDEAAGHVTQARMVS 130 *K 131	EDEAAGHVTQARMVS -COOH ; SEC ID n°: 87
isoforma						SKDGTGSDDDKKAKG	NH2- KSKDGTGSDDDKKAKG SEC ID n°: 88
						SEC ID n°: 20	
Tau 441-	50 kDa	AAC04279	Humano TBP			AKGADGKTKIATPRG 157*A158	AKGADGKTKIATPRG -COOH ; SEC ID n°: 89
isoforma						APPGKGGQANATRIP	NH2- APPGKGGQANATRIP SEC ID n°: 90
						SEC ID n°: 21	
Tau 441-	50 kDa	AAC04279	Humano TBP			GGNKKIETHKLTFR380*E 381	GGNKKIETHKLTFR -COOH ; SEC ID n°: 91
isoforma						NAKAKTDHGAEIVH	NH2- ENAKAKTDHGAEIVH SEC ID n°: 92
						SEC ID n°: 22	
Calpaína-1	80 kDa	AAV41878	Humano BDP	76 kDa		GVSAQVQKQRARELG27*L 28	GVSAQVQKQRARELG -COOH ; SEC ID n°: 93
activada						GRHENAICYLGGQDY	NH2- LGRHENAICYLGGQDY SEC ID n°: 94
						SEC ID n°: 23	
Calpaína-2	80 kDa	CIHUH2	Humano BDP	41 kDa		RGSTAGGCRNYPNTF381 *W 382	RGSTAGGCRNYPNTF -COOH ; SEC ID n°: 95
activada						MNPQYLKLEEEEE	NH2- WMNPQYLKLEEEEE SEC ID n°: 96
						SEC ID n°: 24	
Alfa II-	260 kDa	Q13813	Ratón SBDP150-150 kDa			LMAEEVQAVQQQEVY1176 *G 1177	LMAEEVQAVQQQEVY -COOH ; SEC ID n°: 97
espectrina			short			AMPRDETDSKTASP	NH2- GAMPRDETDSKTASP SEC ID n°: 98
						SEC ID n°: 25	

Alfa II- Espectrina	260 kDa	Q13813	Humano SBDP150-150 kDa short	LMAEEVQAVQQQEVY1176 *G 1177 MMPRDETDTSKTASP SEC ID n°: 26	LMAEEVQAV_QQQEVY-COOH ; SEC ID n°: 99 NH2- GMMPRDETDTSKTASP SEC ID n°: 100
Alfa II- Espectrina	260 kDa	Q13813	Humano SBDP145 145 kDa (Calpaína)	RSLQQLAEERSQLL1230 *S 1231 AHEVQRFHRADET SEC ID n°: 27	RSLQQLAE_ERSQLL-COOH ; SEC ID n°: 101 NH2- SAHEVQRFHRADET SEC ID n°: 102
Alfa II- espectrina	260 kDa	Q13813	Humano SBDP149 149 kDa (Caspasa)	QQQEVYGMMPRDET1185 *S 1186 KTASPWKSARLMVH SEC ID n°: 28	QQQEVYGM_MPRDET-COOH ; SEC ID n°: 103 NH2- SKTASPWKSARLMVH SEC ID n°: 104
Alfa II- espectrina	260 kDa	Q13813	Humano SBDP120 120 kDa (Caspasa)	REAFLNTEKGDSDL1478 *S 1479 VEALIKKHEDFDKA SEC ID n°: 29	REAFLNTE_DKGDSDL-COOH ; SEC ID n°: 105 NH2- SVEALIKKHEDFDKA SEC ID n°: 106
BAX	21 kDa	NP_620119	Humano	SSEQIMKTGALLQG29 ↓F 30 IQDRAGRMGGEAPE SEC ID n°: 30	SSEQIMKTGALLQG-COOH ; SEC ID n°: 107 NH2- FIQDRAGRMGGEAPE SEC ID n°: 108
Beta II- espectrina	240 kDa*	NP_003119	Humano β IISBDP 110 kDa	ENQMEVRKKEIEELQ1440 S 1441 QAQALSQEGKSTED SEC ID n°: 31	ENQMEVRKKEIEELQ-COOH ; SEC ID n°: 109 NH2- SQAQALSQEGKSTED SEC ID n°: 110
Beta II- espectrina	240 kDa*	NP_003119	Humano β IISBDP 108 kDa	AQALSQEGKSTDEVD1457 *S 1458 KRLTVQTKFMELLE SEC ID n°: 32	AQALSQEGKSTDEVD-COOH ; SEC ID n°: 111 NH2- SKRLTVQTKFMELLE SEC ID n°: 112
Beta II- espectrina	240 kDa*	NP_003119	Humano β IISBDP 24 kDa	LPAEQGSPRMAETVD2146 *T 2147 SEMVNGATEQRTSS SEC ID n°: 33	LPAEQGSPRMAETVD-COOH ; SEC ID n°: 113 NH2- T2147SEMVNGATEQRTSS SEC ID n°: 114
Beta II- espectrina	240 kDa*	NP_003119	Humano β IISBDP 109 kDa	KKEIEELQSQQAALS1448 *Q 1449 EGKSTDEVDKRLT SEC ID n°: 34	KKEIEELQSQQAALS-COOH ; SEC ID n°: 115 NH2- QEGKSTDEVDKRLT SEC ID n°: 116
Beta II- espectrina	240 kDa*	NP_003119	Humano β IISBDP 107 kDa	TDEVDSKRLTVQTKF1467 *M 1468 ELLEPLNERKHNLL SEC ID n°: 35	TDEVDSKRLTVQTKF-COOH ; SEC ID n°: 117 NH2- MEL LEPL NERKHNLL SEC ID n°: 118
Beta II- espectrina	240 kDa*	NP_003119	Humano β IISBDP 105 kDa	MELLEPLNERKHNLL1482 *A 1483 SKEIHQFNRDVEDE SEC ID n°: 36	MELLEPLNERKHNLL-COOH ; SEC ID n°: 119 NH2- ASKEIHQFNRDVEDE SEC ID n°: 120
Calcineurina (A alfa)	61 kDa	Q08209	Humano BDP 45 kDa	ICSDDELGSEEDGFD385 *G 386 ATAAARKEVIRNKI SEC ID n°: 37	ICSDDELGSEEDGFD-COOH ; SEC ID n°: 121 NH2- GATAAARKEVIRNKI SEC ID n°: 122
CaMPK-IV	55 kDa	NP_033923	Ratón BDP 33 kDa	VTASTENLVPDYWID30 *G 31 SNRDPGLGDFEVES SEC ID n°: 38	VTASTENLVPDYWID-COOH ; SEC ID n°: 123 NH2- GSNRDPGLGDFEVES SEC ID n°: 124
CaMPK-IV	55 kDa	NP_033923	Ratón BDP 34 kDa	CPSSPCSSVTASTEN23 *L 24 VPDYWIDGGSNRDPL SEC ID n°: 39	CPSSPCSSVTASTEN-COOH ; SEC ID n°: 125 NH2- LVPDYWIDGGSNRDPL SEC ID n°: 126
CaMPK-IV	55 kDa	NP_033923	Ratón BDP 38 kDa	KPELLYATPAPDAP176 *L 177 KIADFGLSKIVEHQ	KPELLYATPAPDAP-COOH ; SEC ID n°: 127 NH2- LKIADFGLSKIVEHQ SEC ID n°: 128

CaMPK-IV	55 kDa	NP_033923	Ratón	BDP	40 kDa	SKIVEHQVLMKTVCG 201 *T 202 PGYCAPEILRGAY SEC ID n°: 41	SKIVEHQVLMKTVCH -COOH ; SEC ID n°: 129 NH2- TPGYCAPEILRGAY SEC ID n°: 130
Troponina cardíaca- I3	24 kDa	P19429	Humano	BDP	10 kDa	TEAIDLTKQIFDLRG 138 ↓K 139 FKRPTLRRVRISAD SEC ID n°: 42	TEAIDLTKQIFDLRG -COOH ; SEC ID n°: 131 NH2- KFKRPTLRRVRISAD SEC ID n°: 132
Troponina cardíaca- T2	35 kDa	NP_00355	Humano	BDP	24 kDa	MEESKPKPRSFMPNL 85 ↓V 86 PPKIPDGERVDFDD SEC ID n°: 43	MEESKPKPRSFMPNL -COOH ; SEC ID n°: 133 NH2- V86PPKIPDGERVDFDD SEC ID n°: 134
Troponina cardíaca- T2	35 kDa	NP_00355	Humano	BDP	13 kDa	PNLVPPKIPDGERVD 97 ↓F 198 DDIHRKRMEKDLNE SEC ID n°: 44	PNLVPPKIPDGERVD -COOH ; SEC ID n°: 135 NH2- F98DDIHRKRMEKDLNE SEC ID n°: 136
NF-M	145 kDa	AY421963	Bovina	NF-M BDP	112	KVEDEK 467 *S 468 SEMEEAL SEC ID n°: 45	KVEDEK 467 * SEC ID n°: 137 S 468 SEMEEAL SEC ID n°: 138
NF-M	145 kDa	AY421963	Bovina	NF-M BDP	110	KKSPVK 516 *A 517 TAPELK SEC ID n°: 46	KKSPVK 516 SEC ID n°: 139 A 517 TAPELK SEC ID n°: 140
Tau 441- isoforma	50 kDa	AAC04279	Humano	TBP	38 kDa	HLSNVSTGSIDMVD 333 *S 334 PQLATLADEVASL SEC ID n°: 47	HLSNVSTGSIDMVD -COOH ; SEC ID n°: 141 NH2- SPQLATLADEVASL SEC ID n°: 142
Tau 441- isoforma	50 kDa	AAC04279	Humano	TBP	40 kDa	MEDHAGTYGLGDRKD 26 *Q 27 GGYTMHQDGEGDTD SEC ID n°: 48	MEDHAGTYGLGDRKD -COOH ; SEC ID n°: 143 NH2- QGGYTMHQDGEGDTD SEC ID n°: 144

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WANG, KA-WANG KEVIN
 HAYES, RONALD
 5 LIU, MING CHEN
 OLI, MONIKA

<120> MARCADORES PROTEOLÍTICOS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO PARA EL CÁNCER, LAS
 LESIONES ORGÁNICAS Y LA REHABILITACIÓN MUSCULAR/SOBREENTRENAMIENTO DE EJERCICIO
 10

<130> 502-12

<140> 05779948.8
 <141> 2005-04-15
 15

<150> US 60/562,819
 <151> 2004-04-15

<160> 149
 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 30
 <212> PRT
 25 <213> Canis familiaris

<400> 1

Trp Arg Ser Leu Gln Gln Leu Ala Glu Glu Arg Ser Glu Val Tyr Gly
 1 5 10 15

Met Met Pro Arg Asp Asp Thr Asp Ser Lys Thr Ala Ser Pro
 20 25 30

<210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Glu Glu Asp Ala Glu Glu Glu Lys Pro Arg Pro Lys Leu Thr Ala
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Asp Phe Asp Asp Ile Gln
 20 25 30

<210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Met Ser Ala Asp Ala Met Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Lys His Lys Val Cys Met Asp Leu Arg Ala Asn
 20 25 30

<210> 4
 <211> 31

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Ser Lys His Lys Val Cys Met Asp Leu Arg Ala Asn Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Arg Asp Leu Arg Asp Val
 20 25 30

<210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Glu Glu Lys Tyr Asp Met Glu Val Arg Val Gln Lys Thr Ser Lys
 1 5 10 15

Glu Leu Glu Asp Met Asn Gln Lys Leu Phe Asp Leu Arg Gly Lys
 20 25 30

<210> 6
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Ser Asn Met Gly Ala His Phe Gly Gly Tyr Leu Val Lys Ala
 1 5 10 15

Glu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Gln Thr Gly Arg Glu Met Lys Val
 20 25 30

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Arg Glu Ile Lys Asp Leu Lys Leu Lys Val Met Asp Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Arg Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Val Ser Ala
 20 25 30

<210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Glu Leu Glu Asp Met Asn Gln Lys Leu Phe Asp Leu Arg Gly Lys
 1 5 10 15

Phe Lys Arg Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Met Ser Ala Asp
 20 25 30

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

Asp Asp Ile Gln Lys Lys Arg Gln Asn Lys Asp Leu Met Glu
 20 25 30

<210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 10

Ala Asp Arg Glu Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln Val
 1 5 10 15

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

<210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 11

Lys Ser Gln Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys
 1 5 10 15

Asn Ile Val Thr Pro Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly
 20 25 30

<210> 12
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr Glu Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp
 1 5 10 15

Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu
 20 25 30

<210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Asn Ala Glu Glu Trp Phe Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr Glu Ser
1 5 10 15

Ala Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu
20 25 30

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Ala Glu Glu Trp Phe Lys Cys Arg Tyr Ala Lys Leu Thr Glu Ala
1 5 10 15

Ala Glu Gln Asn Lys Glu Ala Ile Arg Ser Ala Lys Glu Glu
20 25 30

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Leu Lys Glu Ile Arg Ser Gln Leu Glu Ser His Ser Asp Gln Asn
1 5 10 15

Met His Gln Ala Glu Glu Trp Phe Lys Cys Arg Tyr Ala Lys
20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Ala Gly Ala Leu Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser
1 5 10 15

Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
20 25 30

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Glu Ile Lys Asp Leu Lys Leu Lys Val Met Asp Leu Arg Gly Lys
1 5 10 15

Phe Lys Arg Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Val Ser Ala Asp
20 25 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Pro Leu Ile Pro Pro Lys Ile Pro Glu Gly Glu Arg Val Asp Phe
 1 5 10 15

Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Leu Glu
 20 25 30

<210> 19
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 19

Gln Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Val Ala Gly Val Ser Lys
 1 5 10 15

Asp Arg Thr Gly Asn Asp Glu Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly
 20 25 30

<210> 20
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 20 25 30

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro
 20 25 30

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Ser Leu Gln Gln Leu Ala Glu Glu Arg Ser Gln Leu Leu Gly Ser
 1 5 10 15

Ala His Glu Val Gln Arg Phe His Arg Asp Ala Asp Glu Thr
 20 25 30

<210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Gln Glu Val Tyr Gly Met Met Pro Arg Asp Glu Thr Asp Ser
 1 5 10 15

Lys Thr Ala Ser Pro Trp Lys Ser Ala Arg Leu Met Val His
 20 25 30

<210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Glu Ala Phe Leu Asn Thr Glu Asp Lys Gly Asp Ser Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Val Glu Ala Leu Ile Lys Lys His Glu Asp Phe Asp Lys Ala
 20 25 30

<210> 30
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Ser Glu Gln Ile Met Lys Thr Gly Ala Leu Leu Leu Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Ile Gln Asp Arg Ala Gly Arg Met Gly Gly Glu Ala Pro Glu
 20 25 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Asn Gln Met Glu Val Arg Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Gln Ser
 1 5 10 15

<400> 36

Met Glu Leu Leu Glu Pro Leu Asn Glu Arg Lys His Asn Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Lys Glu Ile His Gln Phe Asn Arg Asp Val Glu Asp Glu
 20 25 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Gly Ser Glu Glu Asp Gly Phe Asp Gly
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile
 20 25 30

<210> 38
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

Val Thr Ala Ser Thr Glu Asn Leu Val Pro Asp Tyr Trp Ile Asp Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Arg Asp Pro Leu Gly Asp Phe Phe Glu Val Glu Ser
 20 25 30

<210> 39
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 39

Cys Pro Ser Ser Pro Cys Ser Ser Val Thr Ala Ser Thr Glu Asn Leu
 1 5 10 15

Val Pro Asp Tyr Trp Ile Asp Gly Ser Asn Arg Asp Pro Leu
 20 25 30

<210> 40
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Ala Thr Pro Ala Pro Asp Ala Pro Leu
 1 5 10 15

Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Ile Val Glu His Gln
 20 25 30

<210> 41
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 41

Ser Lys Ile Val Glu His Gln Val Leu Met Lys Thr Val Cys Gly Thr
 1 5 10 15

Pro Gly Tyr Cys Ala Pro Glu Ile Leu Arg Gly Cys Ala Tyr
 20 25 30

<210> 42
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Thr Glu Ile Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys
 1 5 10 15

Phe Lys Arg Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp
 20 25 30

<210> 43
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Met Glu Glu Ser Lys Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met Pro Asn Leu Val
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe Asp Asp
 20 25 30

<210> 44
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe
 1 5 10 15

Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Asn Glu
 20 25 30

<210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 45

Lys Val Glu Asp Glu Lys Ser Ser Glu Met Glu Glu Ala Leu

<213> Homo sapiens

<400> 51

Ala Glu Glu Asp Ala Glu Glu Glu Lys Pro Arg Pro Lys Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Pro Lys Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Asp Phe Asp Asp Ile Gln
 1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Met Ser Ala Asp Ala Met Leu Lys
 1 5 10 15

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Leu Leu Gly Ser Lys His Lys Val Cys Met Asp Leu Arg Ala Asn
 1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Ser Lys His Lys Val Cys Met Asp Leu Arg Ala Asn Leu Lys
 1 5 10 15

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Arg Asp Leu Arg Asp Val
 1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Glu Glu Glu Lys Tyr Asp Met Glu Val Arg Val Gln Lys Thr Ser
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Lys Glu Leu Glu Asp Met Asn Gln Lys Leu Phe Asp Leu Arg Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Val Leu Ser Asn Met Gly Ala His Phe Gly Gly Tyr Leu Val Lys
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Glu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Gln Thr Gly Arg Glu Met Lys Val
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Thr Arg Glu Ile Lys Asp Leu Lys Leu Lys Val Met Asp Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Lys Phe Lys Arg Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Val Ser Ala
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Lys Glu Leu Glu Asp Met Asn Gln Lys Leu Phe Asp Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Lys Phe Lys Arg Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Met Ser Ala Asp
 1 5 10 15

<210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

Phe Asp Asp Ile Gln Lys Lys Arg Gln Asn Lys Asp Leu Met Glu
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 67

Ala Asp Arg Glu Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln
 1 5 10 15

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 68

Val Val Thr Ala Glu Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Glu Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 69

Lys Ser Gln Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe
 1 5 10 15

<210> 70

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 70

Lys Asn Ile Val Thr Pro Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Lys Ser Arg Phe Thr Val Thr Glu Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Asn Ala Glu Glu Trp Phe Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr Glu
 1 5 10 15

<210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu
 1 5 10 15

<210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Ala Glu Glu Trp Phe Lys Cys Arg Tyr Ala Lys Leu Thr Glu
 1 5 10 15

<210> 76
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Glu Gln Asn Lys Glu Ala Ile Arg Ser Ala Lys Glu Glu
 1 5 10

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Leu Lys Glu Ile Arg Ser Gln Leu Glu Ser His Ser Asp Gln
 1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Asn Met His Gln Ala Glu Glu Trp Phe Lys Cys Arg Tyr Ala Lys
 1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Ala Gly Ala Leu Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
 1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Arg Glu Ile Lys Asp Leu Lys Leu Lys Val Met Asp Leu Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Lys Phe Lys Arg Pro Pro Leu Arg Arg Val Arg Val Ser Ala Asp
 1 5 10 15

<210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Pro Pro Leu Ile Pro Pro Lys Ile Pro Glu Gly Glu Arg Val Asp
 1 5 10 15

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Phe Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 85

Gln Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Val Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15

<210> 86
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 86

Lys Asp Arg Thr Gly Asn Asp Glu Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly
 1 5 10 15

<210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser
 1 5 10 15

<210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro
 1 5 10 15

<210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 1 5 10 15

<210> 92
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val His
 1 5 10 15

<210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

Gly val ser Ala Gln val Gln Lys Gln Arg Ala Arg Glu Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Leu Gly Arg His Glu Asn Ala Ile Lys Tyr Leu Gly Gln Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 95
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95

Arg Gly Ser Thr Ala Gly Gly Cys Arg Asn Tyr Pro Asn Thr Phe
 1 5 10 15

<210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96

Trp Met Asn Pro Gln Tyr Leu Ile Lys Leu Glu Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

<210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 97

Leu Met Ala Glu Glu Val Gln Ala Val Gln Gln Gln Glu Val Tyr
 1 5 10 15

<210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 98

Gly Ala Met Pro Arg Asp Glu Thr Asp Ser Lys Thr Ala Ser Pro
 1 5 10 15

<210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99

Leu Met Ala Glu Glu Val Gln Ala Val Gln Gln Gln Glu Val Tyr
 1 5 10 15

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100

Gly Met Met Pro Arg Asp Glu Thr Asp Ser Lys Thr Ala Ser Pro
 1 5 10 15

<210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101

Arg Ser Leu Gln Gln Leu Ala Glu Glu Arg Ser Gln Leu Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Ser Ala His Glu Val Gln Arg Phe His Arg Asp Ala Asp Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Gln Gln Gln Glu Val Tyr Gly Met Met Pro Arg Asp Glu Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Ser Lys Thr Ala Ser Pro Trp Lys Ser Ala Arg Leu Met Val His
 1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Arg Glu Ala Phe Leu Asn Thr Glu Asp Lys Gly Asp Ser Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Ser Val Glu Ala Leu Ile Lys Lys His Glu Asp Phe Asp Lys Ala
 1 5 10 15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Ser Glu Gln Ile Met Lys Thr Gly Ala Leu Leu Leu Gln Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 108
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 108
 Phe Ile Gln Asp Arg Ala Gly Arg Met Gly Gly Glu Ala Pro Glu
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 109
 Glu Asn Gln Met Glu Val Arg Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Gln
 1 5 10 15

<210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 Ser Gln Ala Gln Ala Leu Ser Gln Glu Gly Lys Ser Thr Glu Asp
 1 5 10 15

<210> 111
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 Ala Gln Ala Leu Ser Gln Glu Gly Lys Ser Thr Asp Glu Val Asp
 1 5 10 15

<210> 112
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 Ser Lys Arg Leu Thr Val Gln Thr Lys Phe Met Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 Leu Pro Ala Glu Gln Gly Ser Pro Arg Met Ala Glu Thr Val Asp
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 114

Thr Ser Glu Met Val Asn Gly Ala Thr Glu Gln Arg Thr Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115

Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Gln Ser Gln Ala Gln Ala Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116

Gln Glu Gly Lys Ser Thr Asp Glu Val Asp Ser Lys Arg Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 117

Thr Asp Glu Val Asp Ser Lys Arg Leu Thr Val Gln Thr Lys Phe
 1 5 10 15

<210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118

Met Glu Leu Leu Glu Pro Leu Asn Glu Arg Lys His Asn Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Met Glu Leu Leu Glu Pro Leu Asn Glu Arg Lys His Asn Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 120
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Ala Ser Lys Glu Ile His Gln Phe Asn Arg Asp Val Glu Asp Glu
 1 5 10 15

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Gly Ser Glu Glu Asp Gly Phe Asp
 1 5 10 15

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile
 1 5 10 15

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 123

Val Thr Ala Ser Thr Glu Asn Leu Val Pro Asp Tyr Trp Ile Asp
 1 5 10 15

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 124

Gly Ser Asn Arg Asp Pro Leu Gly Asp Phe Phe Glu Val Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

Cys Pro Ser Ser Pro Cys Ser Ser Val Thr Ala Ser Thr Glu Asn
 1 5 10 15

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 126

Leu Val Pro Asp Tyr Trp Ile Asp Gly Ser Asn Arg Asp Pro Leu
 1 5 10 15

<210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 127

Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Ala Thr Pro Ala Pro Asp Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 128

Leu Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Ile Val Glu His Gln
 1 5 10 15

<210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 129

Ser Lys Ile Val Glu His Gln Val Leu Met Lys Thr Val Cys Gly
 1 5 10 15

<210> 130
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 130

Thr Pro Gly Tyr Cys Ala Pro Glu Ile Leu Arg Gly Cys Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 131

Thr Glu Ile Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 132

Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp
 1 5 10 15

<210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 133

Met Glu Glu Ser Lys Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met Pro Asn Leu
 1 5 10 15

<210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 134

Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe Asp Asp
 1 5 10 15

<210> 135
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 135

Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro Asp Gly Glu Arg Val Asp
 1 5 10 15

<210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 136

Phe Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu Lys Asp Leu Asn Glu
 1 5 10 15

<210> 137
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 137

Lys Val Glu Asp Glu Lys
 1 5

<210> 138
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 138

Ser Ser Glu Met Glu Glu Ala Leu
 1 5

<210> 139

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 139

Lys Lys Ser Pro Val Lys
 1 5

<210> 140
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 140

Ala Thr Ala Pro Glu Leu Lys
 1 5

<210> 141
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 141

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
 1 5 10 15

<210> 142
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 142

Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15

<210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 143

Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144

Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gly Glu Gly Asp Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 145
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 145

Ala Arg Val Ala Gly Val Ser Lys Asp Arg Thr Gly Asn
 1 5 10

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Ala Arg Val Ala Gly Val Ser
 1 5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Lys Asp Arg Thr Gly Asn Asp Glu
 1 5

<210> 148

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 148

Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 149

Lys Asn Ile Val Thr Pro Pro
 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para determinar la presencia de una lesión neural en un sujeto, que comprende detectar por lo menos uno o más productos de degradación proteolítica de una proteína asociada a microtúbulos (MAP) MAP-2A, MAP-2B, MAP2C o MAP-2D en una muestra de tejido o líquido en contacto con tejido neural lesionado, en el que una cantidad detectable de dichos por lo menos uno o más productos de degradación de MAP es indicativa de una lesión neural en dicho sujeto cuando dicha cantidad es superior a la de los sujetos normales sin lesión neural.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el producto de degradación es un producto de escisión de SEC ID n°: 10.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el producto de degradación puede obtenerse mediante la escisión con calpaína o caspasa.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, en el que la lesión neural es una lesión cerebral traumática (LCT).
5. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de líquido es líquido cefalorraquídeo (LCR) o sangre.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra tisular es tejido cortical del hipocampo.
7. Método según la reivindicación 1, en el que los productos de degradación de la MAP son detectados utilizando un inmunoensayo.
- 25 8. Método según la reivindicación 7, en el que el inmunoensayo es un ensayo ELISA.
9. Método según la reivindicación 1, en el que los productos de degradación de la MAP son detectados utilizando una matriz de biochip.
- 30 10. Método según la reivindicación 9, en el que la matriz de biochip es una matriz de chip de proteína.
11. Método según la reivindicación 9, en el que la matriz de biochip es una matriz de ácido nucleico.
- 35 12. Método según la reivindicación 9, en el que los productos de degradación de la MAP se inmovilizan sobre la matriz de biochip.
13. Método según la reivindicación 12, en el que los productos de degradación inmovilizados son sometidos a una ionización por láser para detectar el peso molecular de los productos de degradación.
- 40 14. Método según la reivindicación 13, en el que el peso molecular de dichos uno o más productos de degradación se analiza frente a una intensidad umbral que se normaliza con respecto a la corriente iónica total.
15. Método según la reivindicación 14, en el que la transformación logarítmica es utilizada para reducir los intervalos de intensidad máxima para limitar el número de productos de degradación detectados.

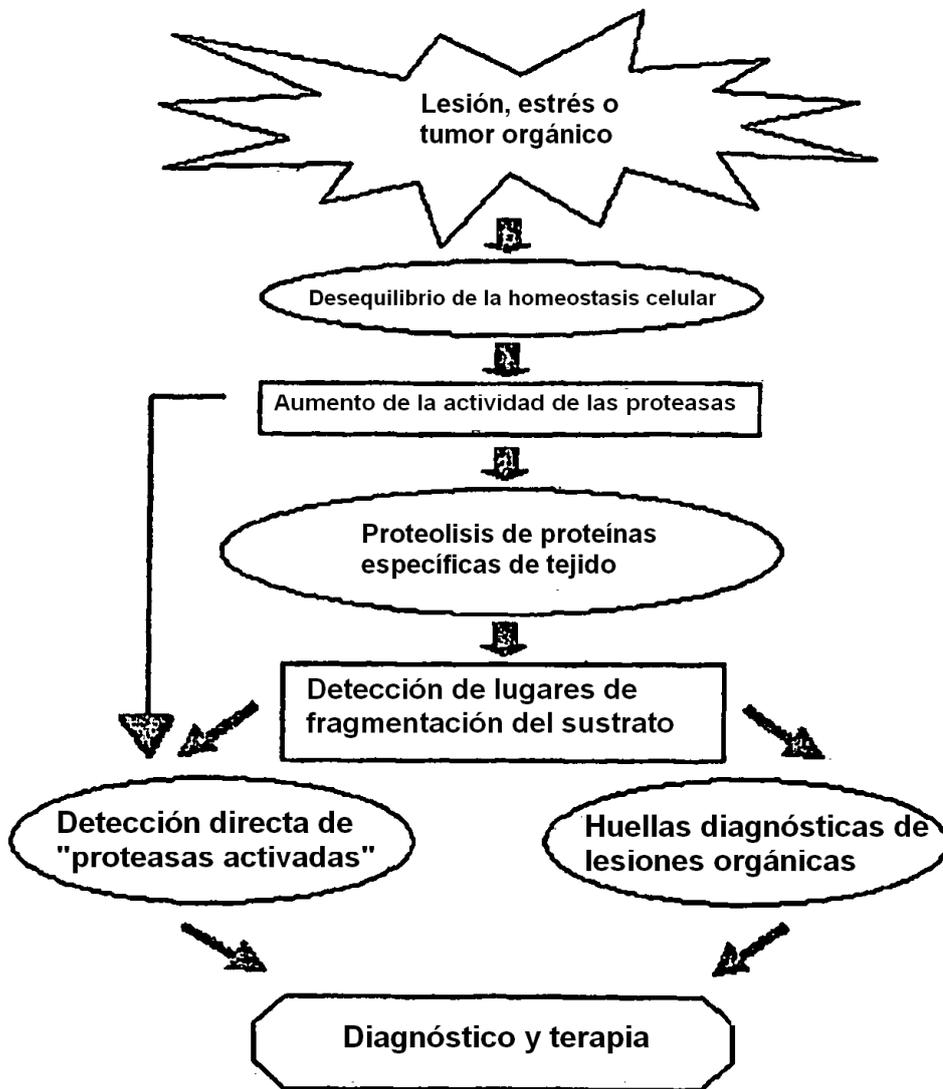


FIGURA 1

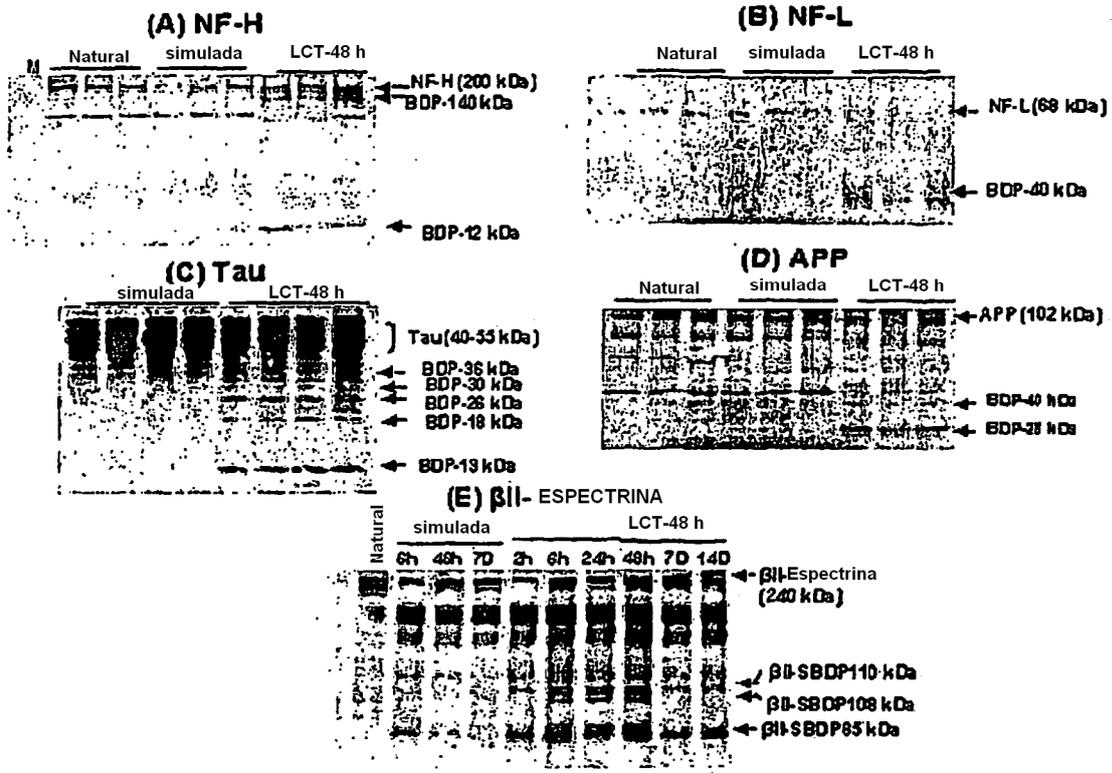


FIGURA 2A-2E

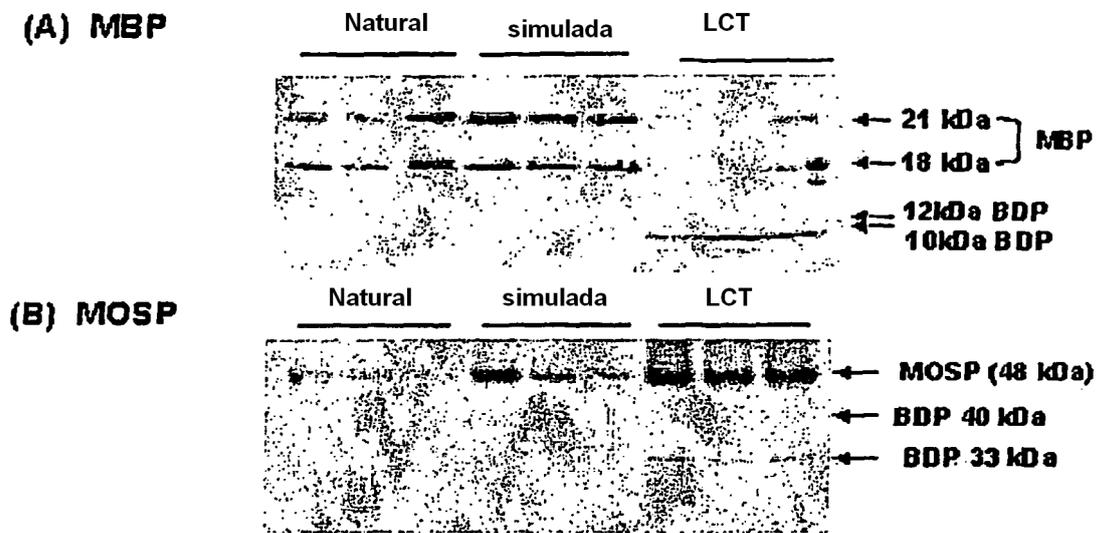


FIGURA 3A-3B

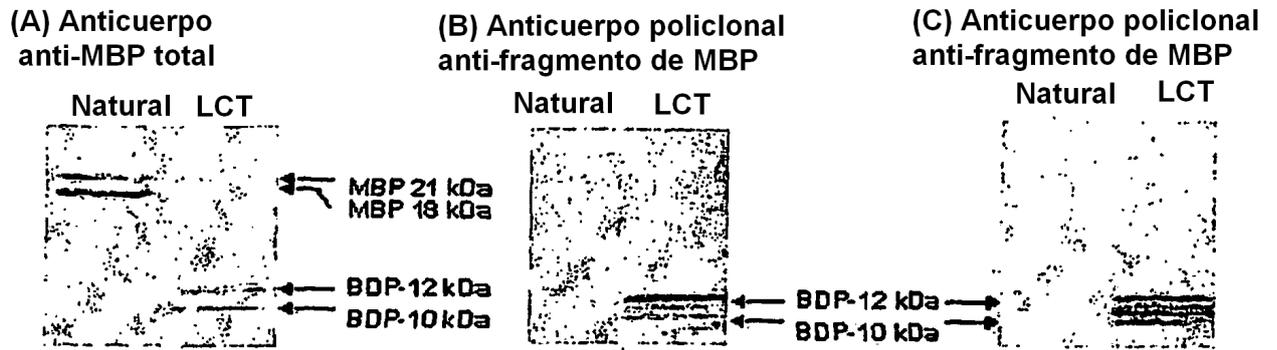


FIGURA 4A-4C

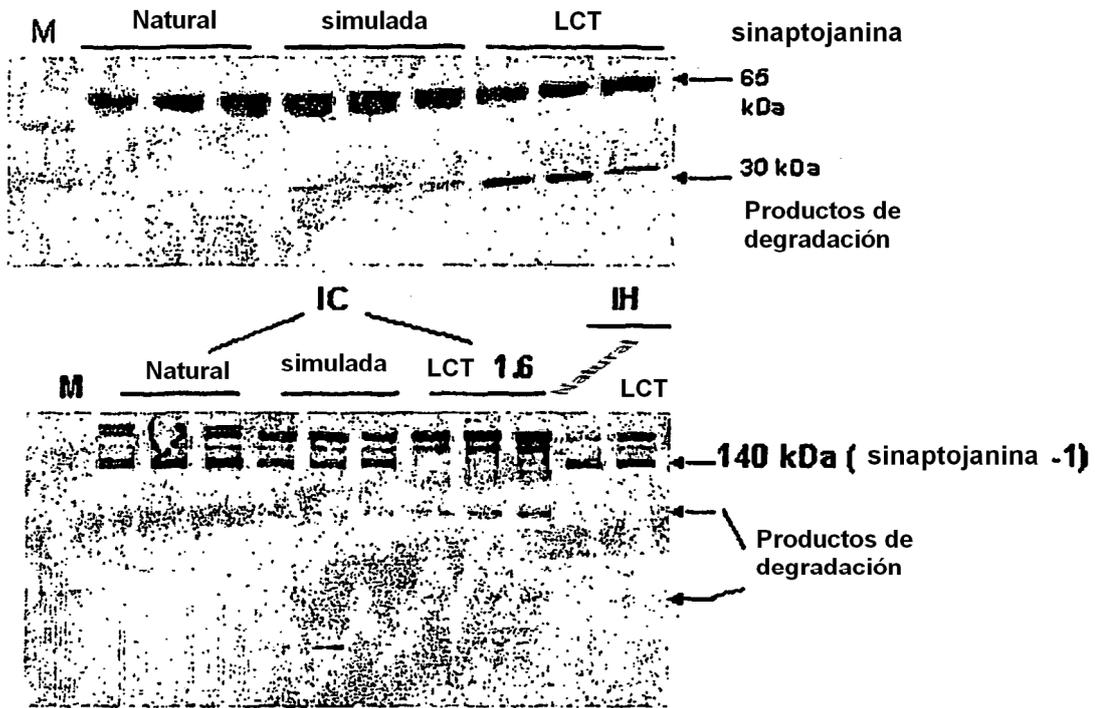


FIGURA 5

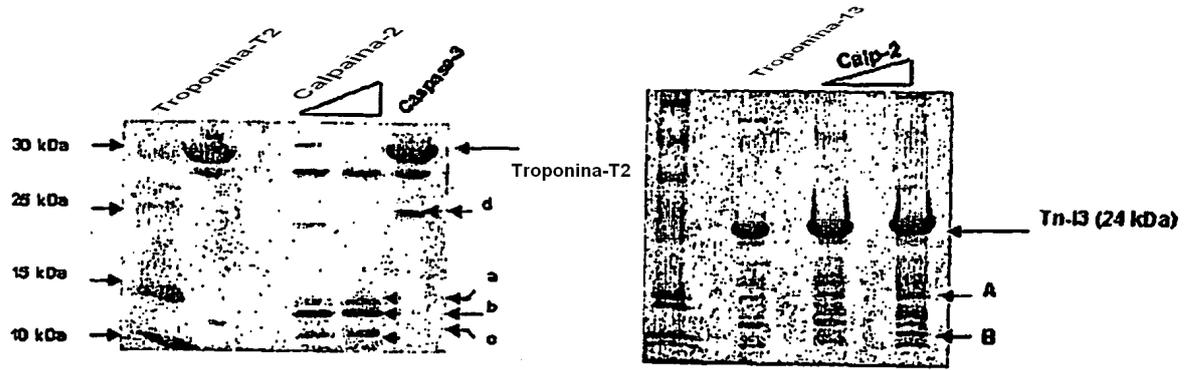
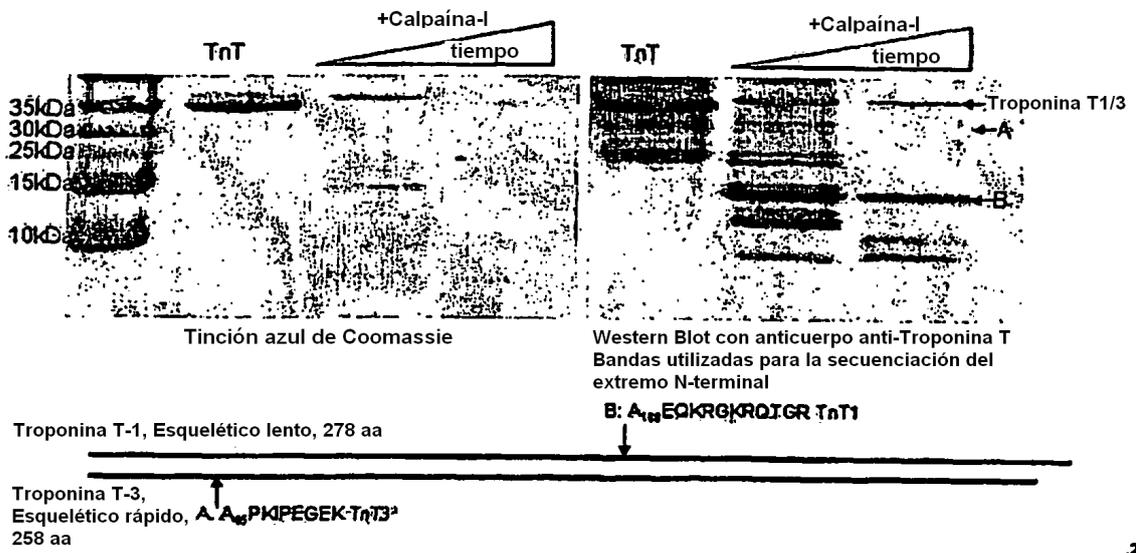


FIGURA 6



2

FIGURA 7