

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 795**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2005 E 05763857 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1774023**

54 Título: **Marcadores de daño cerebral**

30 Prioridad:

25.06.2004 US 582998 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2013

73 Titular/es:

**WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF
MEDICINE (100.0%)
ONE BROOKINGS DRIVE
ST. LOUIS, MO 63130, US**

72 Inventor/es:

**LADENSON, JACK;
LANDT, YVONNE;
MODUR, VIJAY y
LATERZA, OMAR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 428 795 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

Marcadores de daño cerebral

Solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica el beneficio respecto de la solicitud provisional de EE.UU. 60/582.998, presentada el 25 de junio de 2004.

Campo de la técnica

10 La invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar daños cerebrales, tales como ictus o enfermedad de Alzheimer en seres humanos y las correspondientes afecciones en otros animales. Más específicamente, se refiere a procedimientos para identificar marcadores de daños cerebrales y a procedimientos para diagnosticar los daños cerebrales usando dichos marcadores y materiales para su detección.

Técnica anterior

15 Se ha realizado un esfuerzo considerable para identificar marcadores que serían útiles en la evaluación de los daños cerebrales, tales como los causados por ictus o la enfermedad de Alzheimer. El diagnóstico precoz de, por ejemplo, el ictus isquémico, se cree que es crucial para permitir una intervención adecuada, tal como la administración del activador de plasminógeno tisular recombinante, que se ha demostrado que es muy eficaz, si se administra pronto, en la reducción de la mortalidad y la morbilidad causadas por el ictus. Además, se desea evaluar otras formas de daño cerebral, tales como ictus hemorrágico, daños en lactantes a término asfixiados, daños cerebrales resultantes de cirugía cardíaca, trastornos neurodegenerativos por Alzheimer o diversos; aunque pueden ser necesarios procedimientos diagnósticos adicionales para distinguir entre estas varias posibilidades en algunos casos.

20 en general, se reconoce que el daño cerebral de varios tipos puede estar indicado por la presencia en fluidos tales como el líquido cefalorraquídeo (LCR) o, más convenientemente, en suero o plasma u orina, de proteínas u otras sustancias que son generalmente características del cerebro. También se ha reconocido ampliamente la deseabilidad de identificar los factores que puedan usarse para diagnósticos con el fin de identificar el tratamiento adecuado o simplemente para pronóstico. Véase, por ejemplo, Warlow, C., *Lancet* (2003) 362:1211-1224; Qureshi, A., et al., *New Eng J Med*, (2001) 344:1450-1460; Marler, J. R., et al., *Science* (2003) 301:157; Garca-Alix, A., et al., *Acta Paediatr* (2001) 90:1103-1105; Verbeek, M. M., et al., *Ann Clin Biochem.* (2003) 40:25-40.

30 Por esta comprensión, varios grupos han realizado estudios proteómicos del cerebro para identificar proteínas cerebrales características. Gauss, C., et al., *Electrophoresis* (1999) 20:575-600 publicaron un análisis de las proteínas cerebrales en ratones usando electroforesis 2-D y espectrometría de masas. El patrón mostró 8.767 manchas proteicas, 200 de las cuales se identificaron en el artículo. Se han aplicado electroforesis en gel bidimensional y espectroscopia de masas al LCR obtenido seis horas después de la muerte y se comparó con el LCR fresco. Se identificaron trece proteínas candidatas, algunas de las cuales se habían asociado previamente con enfermedades neurodegenerativas (Lescuyer, et al. *Proteomics* (2004) 4:2234-2241). Un análisis general de este enfoque se describe en Lubec, G., et al., *Progress in Neurobiol* (2003) 611:1-19. A news story by Abbott, A., in *Nature* (2003) 425:110 destaca que aunque el análisis de cerebros humanos tiene que realizarse en tejido de autopsia, los cerebros de ratón se pueden analizar a varias edades usando tejido fresco. Asimismo, por ejemplo, Kato, N., et al., *Atherosclerosis* (2002) 163:279-286, y Rosand, J., et al., *Stroke* (2003) 34:2512-2517 han realizado intentos de analizar las influencias genómicas sobre el ictus u otras afecciones asociadas con daños cerebrales.

40 Existe una serie de biomarcadores de lesión cerebral que se han notificado en la literatura científica. Entre estos se incluyen S-100B, enolasa específica de las neuronas (NSE), proteína asociada fibrilar glial (GFAP), proteína básica de la mielina (MBP) y otros. (Aurell, A., et al., *Stroke* (1991) 22:1254-1258; Barone, F. C., et al., *Brain Res* (1993) 623:77-82; Cunningham, R. T., et al., *Eur J Clin Invest* (1991) 21:497-500; Hardemark, H. G., et al., *J Neurosurg* (1989) 71:727-731; Hardemark, H. G., et al., *Stroke* (1988) 19:1140-1144; Hatfield, R. H., et al., *Brain Res* (1992) 577:249-252; Hay, E., et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1984) 47:724-729; Noppe, M., et al., *Clin Chim Acta* (1986) 155:143-150; Steinberg, R., et al., *J Neurochem* (1984) 43:19-24).

45 La S-100B es una proteína de unión al Ca²⁺ que modula las interacciones complejas neuronas-glía y se encuentra principalmente en las células gliales, los melanocitos, las células de Schwann, las células de Langerhans y las células de la hipófisis anterior, pero no en las neuronas. Niveles elevados de S-100B en suero se han asociado con ictus, lesión cerebral posterior a una parada cardíaca y lesión cerebral traumática. (Aurell, A., et al., *Stroke* (1991) 22:1254-1258; Hardemark, H. G., et al., *J Neurosurg* (1989) 71:727-731; Noppe, M., et al., *Clin Chim Acta* (1986) 155:143-150; Bottiger, B. W., et al., *Circulation* (2001) 103:2694-2698, Sellman, M., et al., *Scand J. Thor. Cardiovasc. Surg.* (1992) 26:39-45, Shaabam, A., et al., *Brit J Anesthesia* (2000) 85:287-298).

50 Leviton, A., et al., *Acta Paediatr* (2002) 91:9-13 también estudiaron el uso de S-100B, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y NSE como marcadores de daños cerebrales para el daño cerebral en niños con la vista de su capacidad diagnóstica para evaluar dicha lesión. Rotherl, R. D., et al., *Acta Neurochem* (2000) Suppl. 76:97-100 mostraron que los niveles séricos de S-100B también están elevados después de una lesión cerebral grave; Abraha, H. D., et

al., *Ann Clin Biochem.* (1997) 34:546-550 sugieren que la determinación de la proteína S-100 en suero es un marcador pronóstico útil del desenlace clínico en el ictus agudo. En Mussack, T., et al., *Shock* (2002) 18:395-400 y en un comentario en este artículo realizado por Vos, P. F. et al., *ibid.* 481-482 presentaron confirmación adicional de que S-100B y NSE son marcadores significativos de daños cerebrales. Cabe esperar que el incremento de las concentraciones de S-100B, GFAP y NSE en suero se asocien con varios trastornos agudos del sistema nervioso central.

Sin embargo, el S-100B no es específico de cerebro (Vaage, J., et al., *J Thorac Cardiovasc Surg* (2001) 122:853-855; Unden, J., *Scand J Infect Dis* (2004) 36:10-13) dado que también se expresa en células de tejido adiposo blanco y marrón, piel, músculo esquelético, de melanoma y de glioblastoma (Zimmer, D. B., et al., *Brain Res Bull* (1995) 37:417-429; Ilg, E. C., et al., *Int J Cancer* (1996) 68:325-332), así como en músculo, corazón y riñones (Baudier, J, et al., *J Biol Chem* (1986) 261:8192-8203; Missler, U., et al., *Eur J Clin Chem Clin Biochem* (1995) 33:743-748).

NSE representa el dímero gamma gamma de la proteína enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa), que es una enzima soluble de la vía glicolítica con un peso molecular total de aproximadamente 80 kDa (Schmechel, D., et al., *Science* (1978) 199:313-315). La NSE se expresa en el citoplasma y las dendritas de las neuronas y en las células de sistema de captación y descarboxilación de los precursores de amino (APUD). Se dispone de estudios clínicos tempranos que demuestran títulos séricos elevados de NSE en pacientes de ictus o de parada cardíaca (Persson, L., et al., *Stroke* (1987) 18:911-918; Dauberschmidt, R., et al., *Mol Chem Neuropathol* (1991) 14:237-245; Schaarschmidt, H, et al., *Stroke* (1994) 25:558-565. Además, las células tumorales en APUDomas, neuroblastomas, seminomas y carcinomas de células pequeñas del pulmón también expresan NSE. Por este motivo, la NSE se ha estudiado como marcador sérico diagnóstico y pronóstico en el tratamiento clínico de dichas neoplasias. No obstante, también se puede encontrar NSE en glóbulos rojos y plaquetas y no se puede considerar específica del cerebro (Johnsson, P. J., *Cardiothorac Vasc Anesth* (1996) 10:120-126).

Se han usado combinaciones de marcadores en un intento de obtener mejor sensibilidad y especificidad para el ictus. Un grupo ha usado la combinación de marcadores cerebrales, enolasa específica de neuronas, proteína básica de la mielina y S-100b (Kupchak, P., et al., *Clin Chem* (2005) 51(6): abstracts A119 y A120;). Otro grupo evaluó >50 biomarcadores proteicos y eligió el S-100B, el factor neurotrófico de tipo B, el factor de Von Willebrand, la matriz metaloproteinasa-9 y la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (Reynolds, M., *Clin Chem* (2003) 45(10):1733-1739). En otro estudio, se combinaron biomarcadores basados en daños cerebrales (S100B), inflamación (matriz-metaloproteinasa-9 y la molécula de adhesión celular vascular) y trombosis (factor de Von Willebrand) para identificar el ictus agudo (Lynch, et al., *Stroke* (2004) 35:57-63).

Biosite, Inc. ha presentado a la FDA una solicitud de un dispositivo diagnóstico de múltiples marcadores para el ictus agudo. Los marcadores son S-100B, la proteína natriurética cerebral, el dímero D y la matriz metaloproteinasa 9.

El documento WO 2004/053052 A divulga un procedimiento diagnóstico de la aparición de daños cerebrales, en el que se usa tejido cerebral fresco y se determina la expresión de marcadores específicos y en el que una sobreexpresión de estos marcadores indica la existencia de daño cerebral.

Bernstein et al. (Bernstein H.G., *Journal of Neurocytology* (1999) 28: 655 - 662) divulga la determinación de la expresión y diferentes inmunorreactividades de la visinina de tipo 1, en el que se usan anticuerpos.

En la actualidad existe la necesidad de marcadores de daño celular adicionales y más fiables que los disponibles en la actualidad, incluso si se combinan con marcadores de otros fenómenos distintos a la lesión celular. Como se ha indicado antes, los marcadores de daño celular usados no son lo bastante específicos.

Divulgación de la invención

La descripción proporciona procedimientos para identificar marcadores de daño celular y procedimientos para predecir la presencia y la progresión del daño celular usando estos marcadores. Normalmente, los marcadores son proteínas o sus ARNm codificantes que demuestran expresión potenciada del gen relevante en el cerebro. Cuando estos marcadores se detectan en fluidos corporales, por ejemplo en líquido cefalorraquídeo, sangre o en orina se asocian con el daño tisular característico del daño cerebral.

Una forma particularmente importante de daño cerebral es el ictus, que afecta a un gran número de individuos y, si se identifica correctamente lo bastante pronto, permite un tratamiento eficaz. Se ha estimado que muchas víctimas de ictus mueren o exhiben una calidad de vida muy disminuida debido a la incapacidad de los enfoques usados actualmente para diagnosticar correctamente y tratar la afección en el tiempo suficiente. Otras indicaciones en las que el daño cerebral es significativo incluyen, entre otros, traumatismos, daños por asfixia, daños asociados con la cirugía invasiva y enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer

Por tanto, la invención está dirigida a un procedimiento de identificación de la visinina de tipo 1 (VLP-1) útil en el diagnóstico del daño cerebral, comprendiendo dicho procedimiento evaluar tejido cerebral fresco o fresco congelado para la expresión génica y comparar los niveles de expresión génica en dicho tejido cerebral fresco o fresco congelado con niveles de expresión de los mismos genes en otros tejidos frescos o frescos-congelados, tales como

músculo o hígado. La VLP-1 con niveles de expresión en el cerebro fresco mayores que en tejidos alternativos se identifica como generadora de ARNm o marcadores proteicos para daño cerebral. En el presente documento también se describe que otros criterios que se pueden usar para identificar marcadores son 1) genes que muestran niveles de expresión de ARNm al menos 10.000 veces el nivel básico en el tejido cerebral; 2) genes que codifican proteínas de un peso molecular <70 kD y 3) casos en los que la proteína codificada por el gen se puede detectar en el cerebro usando transferencia de tipo Western u otras técnicas convencionales. La expresión de niveles altos por encima del básico garantiza una abundancia suficiente en el cerebro para que los marcadores de expresión sean útiles como dianas de detección.

Como se describe adicionalmente más adelante, es particularmente importante que el procedimiento use tejido cerebral fresco o frasco-congelado como se puede obtener de animales de laboratorio tales como ratones, ratas o conejos, ya que los niveles de ARNm y de proteína en cerebro (u otros tejidos) se pueden alterar cuando el tejido se almacena inadecuadamente o, en el caso, del análisis directo en cerebros humanos, cuando el cerebro está en un estado natural como necesariamente sería el caso en tejido de autopsia. No existe ningún perjuicio del uso de esta especie sustituta, ya que se pueden identificar fácilmente análogos humanos de los marcadores determinados en tejido animal fresco. Además, se preparan anticuerpos, incluidos anticuerpos monoclonales, con reacciones cruzadas con los marcadores identificados en animales de laboratorio y sus homólogos humanos.

También se divulga un procedimiento para diagnosticar la aparición de, o una probabilidad elevada de la posterior aparición de, daño cerebral en un sujeto, en el que el procedimiento comprende analizar fluidos biológicos de dicho sujeto para detectar la presencia de LP-1 y de uno o más marcadores identificados como se ha descrito anteriormente. En concreto, estos marcadores incluyen, entre otros, los productos de genes localizados en el gen N° ID 7447 (VSNL1) que codifican la visinina de tipo 1 (VLP-1), el gene N° ID 6616 (SNAP25) que codifica la proteína asociada al sinaptosoma, 25kDa, el gen N° ID2571 (GAD1) que codifica la glutamato descarboxilasa 1 (cerebro, 67 kDa (GAD67), el gen N° ID4336 (MOBP) que codifica la proteína básica de oligodendrocitos asociada con la mielina, el gen N° ID6857 (SYT1) que codifica la sinaptotagmina I, el gen N° ID10382 (TUBB4) que codifica la tubulina, beta 4, el gen N° ID9638 (FEZ1) que codifica la proteína de la fasciculación y elongación zeta 1 (zigina I), el gen N° ID2743 (GLRB) que codifica el receptor de la glicina, beta, el gen N° ID140767 (VMP) que codifica la proteína de membrana vesicular p24, el gen N° ID10439 (OLFM1) que codifica la olfatomedina 1, el gen N° ID7545 (ZIC1) que codifica el miembro 1 de la familia Zic (homólogo de apareamiento extraño, Drosophila), el gen N° ID29993 (PACSIN1) que codifica la proteína quinasa C y el sustrato de la caseína quinasa en las neuronas 1, el gen N° ID5354 (PLP1) que codifica la proteína proteolípida 1 (enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, paraplejía espástica 2), el gen N° ID9118 (INA) que codifica la proteína de filamentos intermedios neuronales internexina, alfa, el gen N° ID140679 (SLC32A1) que codifica la familia de transportadores de solutos 32 (transportador vesicular GABA), miembro 1, el gen N° ID5274 (SERPIN1) que codifica el inhibidor de la serina (o cisteína) proteinasa, clado I (neuroserpina), miembro 1, el gen N° ID4826 (NNAT) que codifica la Neuronatina, el gen N° ID2566 (GABRG2) que codifica el receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA), gamma 2, el gen N° ID6844 (VAMP2) que codifica la proteína 2 de membrana asociada a vesículas 2 (sinaptobrevina 2), o el gen N° ID4900 (NRGN) que codifica la neurogranina (sustrato de la proteína quinasa C, RC3).

Lo anterior se ha identificado como se expresa a niveles suficientemente altos, específicamente en cerebro fresco, usando el procedimiento descrito, que se caracteriza por el uso de tejido cerebral fresco, como se ilustra usando sujetos murinos.

Además, en el presente documento se describen composiciones útiles en la determinación de la presencia o de niveles de los marcadores de la invención en fluidos biológicos de sujetos a diagnosticar. Dichas composiciones o reactivos incluyen anticuerpos específicamente inmunorreactivos con las proteínas codificadas por los genes relevantes, sondas oligonucleotídicas que hibridan específicamente en condiciones rigurosas con el ARNm transcrito a partir de estos genes y cebadores oligonucleotídicos adecuados para amplificar dicho ARNm.

En el presente documento también se describen kits para diagnóstico que contienen anticuerpos, sondas y/o cebadores de oligonucleótidos y otros reactivos para identificar la asociación de estos reactivos con dianas en las muestras de fluido biológico.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A y 1B muestran los niveles de ARNm comparativos de 20 marcadores de daño cerebral en cerebro y otros tejidos.

La Figura 2 muestra los resultados de la transferencia de tipo Western de homogeneizado de tejido cerebral que demuestra la presencia de los productos de expresión proteica de los genes VSNL-1, FEZ1, SERPIN11 y GAD1.

La Figura 3 muestra transferencias de tipo Western que demuestran la presencia de los productos de expresión proteica de los genes INA, SNAP25 y MOBP. PLP-1 no mostró expresión detectable de proteínas mediante este procedimiento.

Las Figuras 4A y 4B muestran curvas estándar para el ensato de tipo sándwich de VLP-1.

Las Figuras 5A-5E muestran los resultados de la determinación de la proteína VL—1 en plasma de muestras de sangre obtenidas de pacientes con diagnóstico de ictus isquémico.

La Figura 6 muestra los resultados de ensayos de suero de rata en un modelo de ictus de rata en el que se ha analizado la presencia de VLP-1.

- 5 Las Figuras 7A-7C muestran curvas estándar para ensayos de tipo sándwich desarrollados para neuroserpina, GAD67 y zigina, respectivamente.

Modos de llevar a cabo la invención

Usando tejido cerebral fresco, frente a cerebros conservados o cerebros de autopsia, los solicitantes han tenido éxito en la identificación de una serie de genes que se expresan a niveles mucho más altos en el tejido cerebral fresco que en tejidos no cerebrales, tales como pulmón, intestino, músculo esquelético, páncreas, corazón, hígado, bazo o riñón. El tejido cerebral fresco se puede obtener de animales de laboratorio de experimentación, tales como conejos, ratas, ratones, cobayas y similares. (Como se usa en el presente documento "fresco" incluye congelado). Una fuente preferible es el tejido cerebral fresco de ratones. El tejido no cerebral usado para comparar es, preferentemente, también fresco y obtenido del mismo sujeto. En los ejemplos siguientes, la expresión se detecta usando micromatrices génicas; también se pueden aplicar otros procedimientos de evaluación de la expresión, incluidos RT-PCR cuantitativa, inmunoensayos para proteínas y similares. Los procedimientos para evaluar la expresión génica son bien conocidos en la técnica y muchos de estos procedimientos están disponibles comercialmente.

20 Como se ha establecido anteriormente, se han identificado numerosos loci genómicos que se expresan mucho en cerebro, pero a niveles mucho más bajos, o incluso ausentes, en otros tejidos y órganos. Se ha comprobado que el tránsito de los productos de expresión de estos loci desde el propio cerebro a los fluidos biológicos está asociado con daños cerebrales o con la probabilidad de, por ejemplo, inicio de ictus. Además, se han preparado anticuerpos específicamente inmunorreactivos con algunas de las proteínas identificadas. Estos anticuerpos, además de otras parejas de unión específicas, son útiles en procedimientos para diagnosticar ictus a través de la detección de proteínas en fluidos biológicos.

25 Un criterio esencial para identificar un gen como generador de un ARNm o proteína marcador de daño cerebral es la especificidad de la expresión en el cerebro. En particular, se escogieron genes cuyos niveles de expresión de ARNm en cerebro eran al menos 10 veces mayores que los niveles de expresión en otros diversos tejidos, incluidos el pulmón, el intestino, el músculo esquelético, el páncreas, el corazón, el hígado, el bazo y los riñones. Criterios adicionales también son útiles. Es útil garantizar un nivel de expresión en el cerebro que proporcione suficiente diana para la detección en el ensayo. Este criterio se denomina el nivel de expresión en comparación con el basal. Cuando como criterio se emplean niveles de ARNm, el basal se define como las señales obtenidas de oligonucleótidos mal apareados en un formato de matriz GeneChip®. Es decir, los valores medios de la diferencia para el ARNm generado por el gen en cuestión son la diferencia entre la intensidad de la señal del ARN adecuado (generada cuando se produce un apareamiento perfecto) y la señal creada cuando se usan oligonucleótidos mal apareados. Los detalles de este criterio se exponen en el Ejemplo 1. Los genes que dan niveles de expresión de ARNm superiores a 10.000 veces dicho basal se consideran suficientemente abundantes en el cerebro como para proporcionar una base para la detección.

40 Además, si se van a realizar ensayos a nivel proteico, es deseable asegurar la presencia de niveles adecuados de proteínas analizando homogeneizados de tejido cerebral usando transferencia de tipo western. La mayoría de los genes identificados como marcadores en la presente solicitud proporcionan niveles detectables de proteínas de homogeneizados de cerebro en la transferencia de tipo western. Además, si se usan ensayos a nivel de proteínas, es deseable seleccionar genes que codifican proteínas de <70 kDa para garantizar la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

45 Los primeros dos criterios (niveles de expresión 10 veces mayores en el cerebro en comparación con otros tejidos) y un nivel de expresión 10.000 veces mayor que el basal son particularmente significativos cuando se usa ARNm como marcador y la aparición de la proteína en la transferencia de tipo western y la selección de proteínas <70 kDa son particularmente importantes cuando se usa la proteína como marcador.

50 Los fluidos biológicos útiles como muestras para los procedimientos de detección de la invención incluyen sangre y fracciones de la misma, tales como plasma o suero, líquido cefalorraquídeo, orina y fluidos linfáticos. El suero o plasma u orina son los más convenientes. Los sujetos pueden ser pacientes humanos o pueden ser animales tales como animales de compañía domesticados, animales de granja, animales de laboratorio de experimentación o cualquier sistema vertebrado sujeto a daño cerebral. Por tanto, los sujetos pueden ser seres humanos, vacas, caballos, cerdos, gatos, perros, ratas, ratones, pollos y otras aves, o caballos. De mayor interés es la detección de estos marcadores en fluidos biológicos de seres humanos.

55 Se dispone de una amplia variedad de procedimientos de detección de expresión génica en fluidos biológicos. Una muy breve lista de ejemplos incluiría la detección de niveles de ARNm usando PCR cuantitativa con cebadores oligonucleotídicos como reactivos, transferencia de tipo Northern u otros formatos usando sondas oligonucleotídicas que hibridan específicamente con el ARNm transcrito de los loci como reactivos, inmunoensayos usando anticuerpos

para detectar los niveles de la proteína codificada y una multiplicidad de otros procedimientos dependientes de, por ejemplo, otros indicadores de los niveles de proteínas o de ARNm, tales como los patrones de los espectros de masas y procedimientos cromatográficos. El experto en la técnica conocerá estos y muchos otros procedimientos para detectar niveles de expresión.

- 5 Con más detalle con respecto a un procedimiento de ejemplo de la invención, los inmunoensayos son una realización conveniente. Para uso en dichos ensayos, los anticuerpos inmunorreactivos específicamente con la proteína marcadora se pueden preparar mediante procedimientos conocidos que implican la inmunización de sujetos adecuados, tales como ratones, conejos o cabras, y la preparación de suero policlonal o, preferentemente, la preparación de formas monoclonales de los anticuerpos usando bazo u otras fuentes de linfocitos B y técnicas de fusión convencionales. Además, los genes que codifican anticuerpos monoclonales se pueden aislar y usar para producir formas recombinantes, incluidas formas modificadas tales como anticuerpos monocatenarios Fv. Los fragmentos de anticuerpos que son ellos mismos inmunorreactivos con las proteínas diana también se pueden usar en los ensayos. Como los anticuerpos se usan en diagnóstico *in vivo*, puede que no haya una razón para modificar después, por ejemplo, anticuerpos murinos para preparar quimeras humanas/murinas o humanizarlos para diagnóstico humano. No obstante, no se excluye el uso de estas formas modificadas.

10 Como se usa en el presente documento, "anticuerpos" incluye varias formas de inmunoglobulinas y fragmentos inmunorreactivos de estas proteínas. Por ejemplo, "anticuerpos" incluye, entre otros, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios (Fv), anticuerpos quiméricos, anticuerpos producidos de forma recombinante o anticuerpos producidos a partir de hibridomas, y similares. También se incluyen anticuerpos humanizados, aunque su uso en diagnóstico *in vitro* no se requiere.

15 A continuación en el presente documento se divulgan anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales útiles en la detección de algunas de las proteínas marcadoras de la presente invención. Estos anticuerpos reconocen epítopos específicos de la proteína unida específicamente por ellos. La invención también está dirigida a estos anticuerpos y a anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que estos ejemplos de anticuerpos. Indicando que un anticuerpo es "inmunorreactivo" con una proteína concreta se quiere decir que el anticuerpo (o fragmento inmunorreactivo) se une a dicha proteína de un modo que permita su detección en un ambiente complejo. Se entiende que muchos anticuerpos tienen reactividad cruzada con otras proteínas, pero, en general, a niveles muy inferiores a aquéllos con los cuales son específicamente inmunorreactivos.

20 Los inmunoensayos se pueden realizar en muchos formatos, incluidos ensayos de tipo sándwich competitivos, ensayos que usan marcadores radioactivos como reactivos de detección, detección de fluorescencia, detección quimioluminiscente, detección mediante complejos con enzimas (ensayos ELISA) o varias formas de citometría de flujo. El experto conocerá bien dichos enfoques. Una realización concreta de ejemplo en el presente documento usa anticuerpos monoclonales en un ensayo de tipo sándwich y detección con anticuerpos de terminación marcados. El anticuerpo de terminación marcado descrito es un anticuerpo policlonal de conejo purificado, pero podría ser un anticuerpo mono o policlonal de varias fuentes. También se podrían usar otros diversos protocolos, tales como ensayos de flujo lateral, ensayos de flujo centrífugo, tiras de ensayo, ensayos homogéneos y similares.

25 En el presente documento también se describen kits útiles para realizar un diagnóstico. Si el ensayo es un inmunoensayo, el kit incluirá al menos un anticuerpo o fragmento o forma modificada del mismo que es inmunorreactivo con el marcador designado. También puede incluir anticuerpos adicionales para detectar el complejo resultante u otros reactivos para dicha detección. El kit de ensayo también puede incluir un soporte sólido para capturar y marcar el analito.

30 Los kits que dependen de la detección de ARNm incluirán cebadores específicos diseñados para amplificar el ARNm que codifica el marcador o una sonda oligonucleotídica que hibridará con el mismo. También se incluyen reactivos de detección adecuados.

35 En cualquiera de los casos se puede usar cualquier pareja de unión específica para el producto de expresión del analito, por ejemplo se puede usar un ligando para la proteína receptora y al contrario, o reactivos diseñados específicamente para dirigirse al ARN o al ADN generados a partir de ellos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplo 1

50 Identificación de genes que se sobreexpresan en cerebro

Mediante disección cuidadosa se obtuvieron cerebro, hígado, bazo, riñón, músculo esquelético, pulmón, páncreas, corazón e intestino delgado de tres (dos machos y una hembra) ratones C57BL/6 (Jackson labs) de edades comprendidas entre las 4 y las 6 semanas. Las muestras de órgano se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se procesaron para aislar el ARN. La calidad del ARN se confirmó mediante: 1) espectrofotometría del ARN con una proporción de la absorbancia 260nm/A280nm >1,9; 2) la proporción 28S/18S del ARN extraído fue >1,4 de lo observado mediante RNA LabChip (Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 LabChip kit).

A partir del ARN total se generaron sondas de ARNc biotiniladas, se fragmentaron y se aplicaron a las matrices

MU74A (Versión 1) GeneChip® arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). La intensidad de fluorescencia global en cada chip se aumentó a 1.500 con el software de análisis Affymetrix, Microarray Suite. Los datos se transfirieron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel. Un criterio de selección fue la expresión génica con valores medios de la diferencia > 10.000 en el cerebro (es decir, la intensidad de la señal del ARNm computada mediante el software Affymetrix que calcula la diferencia entre los oligonucleótidos de apareamiento perfecto y mal apareados que son parte de la matriz génica). Los valores medios de diferencia como se ha descrito anteriormente reflejan un nivel de expresión por encima del "basal" y demuestran abundancia suficiente de los productos de expresión como para proporcionar un marcador adecuado. Se eligió un valor medio de diferencia de 10.000 porque sugiere un elevado grado de abundancia de los transcritos en el cerebro. El segundo criterio fue la expresión en el cerebro diez veces superior a la del bazo, el riñón, el músculo esquelético, el pulmón, el páncreas, el corazón y el intestino delgado. Veintinueve genes cumplieron estos criterios y se seleccionaron.

Los homólogos humanos de esta lista de genes se ha analizado detenidamente en las bases de datos de bioinformática Entrez Gene que se encuentra en el ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene; OMIM que se encuentra en el ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM; y Unigene que se encuentra en el ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene.

Mediante este análisis, los inventores encontraron que 26 de los 29 homólogos humanos que se confirmó que estaban enriquecidos en el cerebro de seres humanos mediante la abundancia de los Marcadores de Secuencia Expresados (EST) derivaban de una fuente en Unigene

Dos de los productos génicos, la proteína básica de la mieloma y la enolasa específica de neuronas se han analizado previamente como marcadores de lesión cerebral y se excluyeron de esta lista.

De los 24 productos génicos restantes en la lista, solo 20 de los homólogos humanos tienen una longitud de cadena de la secuencia proteica prevista inferior a 70 kDa.

Estos productos génicos con una longitud de cadena de la secuencia proteica prevista inferior a 70 kDa se designaron como marcadores candidatos de lesión cerebral. El corte de 70 kDa se seleccionó porque se sabe que la albúmina, una proteína abundante en el plasma, entra en el cerebro después de una lesión por daños en la barrera hematoencefálica (Cornford, E. M, et al., *Adv Drug Deliv Rev* (1999) 5;36(2-3):145-163; Hampel, H, et al., *Alzheimer Dis Assoc Disord* (1997) 11 (2):78-87; Gingrich, M. B, et al., *Trends Neurosci* (2000) 23(9):399-407, lo que sugiere que este valor de corte para la salida de las proteínas del cerebro sería también similar.

Por tanto, a partir de este análisis se seleccionaron 20 candidatos específicos de cerebro. Los homólogos humanos de estos genes candidatos se muestran mediante sus identificadores génicos en la Tabla 1 en el orden de la expresión de su ARNm en cerebro de ratón.

Tabla 1

Genes humanos identificados como marcadores específicos de cerebro			
Símbolo del gen	Nombre del producto génico	ID en Entrez Gene	Clúster en Unigene
VSNL1	Tipo visinina 1 (VLP-1)	7447	Hs.444212
SNAP25	Proteína asociada con el sinaptosoma, 25 kDa	6616	Hs.167317
GAD1	glutamato descarboxilasa 1 (cerebro, 67 kDa)	2571	Hs.420036
MOBP	Proteína básica de oligodendrocitos asociada con la mielina	4336	Hs.121333
SYT1	sinaptotagmina I	6857	Hs.310545
TUBB4	tubulina, beta 4	10382	Hs.110837
FEZ1	Proteína zeta 1 de fasciculación y elongación (Zilina 1)	9638	Hs.224008
GLRB	Receptor beta de la glicina	2743	Hs.32973
VMP	Proteína de la membrana vesicular p24	140767	Hs.49230
OLFM1	olfatomedina 1	10439	Hs.522484

ZIC1	Miembro 1 de la familia Zic (homólogo mal apareado, <i>Drosophila</i>)	7545	Hs.41154
PACSIN1	Sustrato de la proteína quinasa C y de la caseína quinasa en neuronas 1	2993	Hs.520087
PLP1	Proteína proteolipídica 1 (enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, paraplejía espástica 2)	5354	Hs.1787
INA	Proteína intermedia neuronal internexina, alfa	9118	Hs.500916
SLC32A1	Familia de transportadores de soluto 32 (transportador vesicular de GABA), Miembro 1	140679	Hs.179080
SERPINI1	Inhibidor de la serina (o cisteína) proteinasa, clado I (neuroserpina), miembro 1	5274	Hs.478153
NNAT	Neuronatina	4826	Hs.504703
GABRG2	Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA), gamma 2	2566	Hs.7195
VAMP2	Proteína 2 de membrana asociada con vesícula (sinaptobrevina 2)	6844	Hs.25348
NRGN	neurogranina (sustrato de la proteína quinasa C, RC3)	4900	Hs.524116

Por tanto, se predice que los productos de ARNm/proteína de los genes anteriores están presentes en el líquido cefalorraquídeo, la sangre o la orina después de una lesión cerebral o, más generalmente, como indicador de daño cerebral.

- 5 En las Figuras 1A y 1B se muestra una representación gráfica de los niveles de expresión comparativos de ARNm en cerebro fresco de ratón en comparación con otros tejidos, para los genes candidatos finales mostrados en la Tabla 1.

Ejemplo 2

Preparación de anticuerpos

- 10 Proteínas recombinantes (antígenos)

En los vectores pGEX o pET se insertaron secuencias de nucleótidos que codifican proteínas marcadoras para la producción de proteína en *E. coli*. Las proteínas de los vectores pET se purificaron usando Qiagen Ni-NTA siguiendo el protocolo del fabricante (The Qiaexpressionist 06/2003; Qiagen, Valencia, CA). Los del vector pGEX se purificaron usando glutatión inmovilizado de Pierce (Rockford, IL) siguiendo el protocolo del fabricante. En algunos casos, los plásmidos se enviaron a GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA) para la producción a gran escala de la proteína de *E. coli*. Estos incluyeron: pET 100 GAD 67, pET 102 GAD 67, pET 28 Zigma y Zigma I. El control de calidad incluyó el análisis en SDS-PAGE, secuenciación de Edman en N-terminal y espectrometría de masas según sea adecuado (Li, A., et al., (2003) *Protein Expr Purif*, 31(2):197-206). La concentración de proteínas se estimó mediante la absorbancia a 280 nm usando los coeficientes de extinción calculados a partir de la secuencia de proteínas más el constructor obtenido en el sitio web de Swiss-Prot y acordado con la inspección visual de las bandas teñidas de la proteína en SDS-PAGE.

Inmunización del animal y caracterización del anticuerpo

Los inmunógenos antipeptídicos se prepararon como en Li, A., et al., 2003 (ant.). Los conejos fueron inmunizados en Harland Bioproducts for Science, Inc. (Madison, WI). El suero de conejo se inmunopurificó sobre una columna de afinidad que contiene el péptido o antígeno proteico conocido. Se inmunizó a los ratones con 25 ug/inmunógeno de ratón en adyuvante MPL-TDM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), seguidos de al menos 2 refuerzos en adyuvante y un tercero en PBS 3 días antes de la fusión. Se inmunizó a hámsters sirios con 100 ug/hámster en adyuvante complejo de Freund, seguidos de refuerzos en adyuvante incompleto de Freund y un refuerzo final en PBS. Todas las fusiones se realizaron en la Washington University School of Medicine Hybridoma Center. Los anticuerpos

- 5 monoclonales se purificaron a partir del medio de cultivo en proteína A-agarosa o IgG de cabra anti-ratón-agarosa o se produjeron en ascitis en Maine Biotechnology (Portland, ME). Todos los Ac purificados se dializaron frente a PBS/azida a pH 7,2 y la concentración de proteínas se estimó a partir de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,4 (litros/gramos-cm). La determinación por subclase de los Ac monoclonales usó el kit IsoStrip de Roche (Indianapolis, IN). La asignación mínima de epítipo se basó en inmunotinción de las matrices peptídicas puntual ABIMED preparada en el MIT Biopolymers Facility (Cambridge, MA). Cada punto comprendía un péptido de 10 unidades y dependiendo del número de residuos en el antígeno de interés, se usó un desplazamiento de uno, dos o tres residuos para cubrir toda la secuencia antigénica. Por ejemplo, para un desplazamiento de residuo, el punto 1 contiene la secuencia 1-10, el punto 2 la secuencia 2-11, el punto 3 la secuencia 3-12 etc.
- 10 Desarrollo de anticuerpos frente a visinina -1 (VLP-1)
- Se produjeron anticuerpos monoclonales contra VLP-1 usando una combinación de inyecciones de ADN y proteínas. El vector VR1012 (Vical Inc.) y ciertas secuencias de CTLA4Ig se usaron para las inyecciones de ADN. VR1012 se ha optimizado para la expresión de proteínas en músculo esquelético de ratón, mientras que las secuencias contenidas en CTLA4Ig se había mostrado anteriormente que aumentan considerablemente la respuesta de anticuerpos en ratones (Boyle, et al., Nature (1998) 392:408-411).
- 15 Se siguieron los procedimientos estándar usados en el Hybridoma Center at Washington University in St. Louis para la creación y mantenimiento de las fusiones.

Tabla 2

Anticuerpos frente a proteínas marcadoras				
Designación del Ac	Especie	Isotipo	Inmunógeno	Epítipo(s)
R3471	Conejo	IgG	ADN de VLP-1 y	Principal: aa 3-11, 16-23, 139-155
4399 3A8.1	Ratón	IgG1K	Proteína de GST-VLP-1	No establecido
4403 2B9.3	Ratón	IgG2aK	refuerzo	No establecido
4421 2G10.2	Ratón	IgG1K	ADN de neuroserpina	aa 145-154
4421 5B5.1	Ratón	IgG1K	y GST-Neuroserpina	aa 370-379
4421 7D6.3	Ratón	IgG2aK	Refuerzo de proteína	No establecido
4505 2F1.1	Ratón	IgG1K	“ “	aa 193-202
4554 1G4.4	Ratón	IgG1K	pET28-Zigina	aa 23-28
4563 4G3.1	Hámster	IgG1	pET28-Zigina	aa 7-12
R4726	Conejo	IgG	pET28-Zigina	No determinado
R4727	Conejo	IgG	pET28-Zigina	No determinado
R4610	Conejo	IgG	GAD 67	Múltiples epítipos
R4609	Conejo	IgG	GAD 67	Múltiples epítipos
R4043	Conejo	IgG	Péptido GAD 67 (61-79)	supuestos, aa 61-79
R4044	Conejo	IgG	Péptido GAD 67 (79-97)	supuestos, aa 79-97

Chemicon MAB 5406 (adquirido)	Ratón	IgG2aK	r-rata GAD 67	aa 13-25
SC-7571	Cabra	IgG	internexina	Extremo N
SC-7570	Cabra	IgG	internexina	Extremo C
SC-7538	Cabra	IgG	Proteína asociada con el sinaptosoma-25kD	Extremo N
SC-7539	Cabra	IgG	Proteína asociada con el sinaptosoma-25kD	Extremo C
SC-20038	Ratón	IgG1K	Extracto cerebral bruto	No determinado
SC-23570	Cabra	IgG	Proteína proteolípica 1	Extremo N
SC-18529	Cabra	IgG	Proteína proteolípica 1	Péptido interno
SC-14250	Cabra	IgG	Proteína básica de los oligodendrocitos asociada con la mielina	Péptido interno
SC-25666	Conejo	IgG		No conocido
<p>SC- Anticuerpos obtenidos comercialmente de Santa Cruz Los anticuerpos de ratón y de hámster son monoclonales, mientras que los anticuerpos de conejo son policlonales e inmunopurificados. GAD67 = glutamato descarboxilasa 1 (cerebro, 67 kDa) Internexina= Proteína intermedia neuronal internexina, alfa</p>				

Ejemplo 3

Evaluación de las proteínas expresadas por los genes candidatos para identificar lesión cerebral

5 De algunas de las proteínas expresadas por los genes candidatas se analizó su presencia en cerebro humano mediante transferencia de tipo western. El homogeneizado cerebral humano normal (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO) se cargó a 75 mg, se sometió a electroforesis en SDS-PAGE 4-20% y se electrotransfirió a PVDF. Los patrones de peso molecular también se pasaron para establecer la región prevista de la proteína cerebral en evaluación. Las concentraciones de los Ac primarios a 2 mg/ml durante 2 horas, anticuerpo secundario acoplado a la fosfatasa alcalina a 1/1000 durante 1 hora, con varios tiempos de desarrollo del sustrato. La Figura 2 muestra una

10 transferencia de tipo western compuesta que muestra la presencia de proteínas codificadas por los genes para VSNL1, FEZ1, SERPINI1 y GAD1. Se indica el anticuerpo primario usado para la transferencia de tipo western. La Figura 3 muestra una transferencia de tipo western compuesta que muestra la presencia de proteínas codificadas por los genes para INA, SNAP-25 y MOBP. Todas las proteínas codificadas excepto las codificadas por PLP1 estaban claramente presentes en el tejido cerebral.

15 Ejemplo 4

Abundancia potenciada de los biomarcadores candidatos en el cerebro en comparación con otros tejidos

La presencia de proteína expresada por algunos genes candidatos se evaluó en varios tejidos. Se realizó una transferencia de tipo western en una matriz tisular humana (GenoTechnology, Inc. 50 mg por tejido). La matriz tisular humana incluyó hígado, cerebro, pulmón, riñón, bazo, testículos, ovarios, corazón, páncreas, útero, mama,

20 cuello uterino, recto, próstata, tiroides, laringofaringe, estómago y piel. Para la VLP-1 humana hay una expresión proteica elevada en cerebro con mucho menos en cuello uterino y algo en la piel. La falta de expresión proteica en los demás tejidos es consistente con los datos de expresión del ARNm. Para la neuroserpina, se encontró algo de la proteína en próstata y en tiroides, pero mucho menos que en cerebro, e indicios en riñón y páncreas. El producto génico proteico codificado por SNAP-25 se encontró en abundancia en el cerebro, con solo cantidades mínimas en otros pocos tejidos. Asimismo, para la proteína codificada por MOBP, solo se encontró una cantidad mínima en

25 páncreas. La expresión de Zilina t GAD67 se produce únicamente en tejido cerebral y no en ninguno de los demás

tejidos analizados.

Ejemplo 5

Determinación de la tipo visinina 1 en pacientes de ictus

5 Se recogió sangre de forma retrospectiva de muestras de análisis clínico disponibles de un grupo de pacientes que acudieron al Barnes-Jewish Hospital (BJH) con un déficit neurológico agudo entre marzo y noviembre de 2002. Estos pacientes tenían un diagnóstico al alta de ictus isquémico. Se excluyó a los pacientes que no tenían un tiempo de inicio claro del ictus. Dieciocho pacientes cumplieron este criterio y fueron analizados.

10 El plasma de las muestras de sangre se sometió al procedimiento siguiente para determinar el nivel del tipo visinina 1 (VLP-1). Se usó electroquimioluminiscencia en el equipo Meso Scale Discovery (MSD). El procedimiento fue el siguiente::

Día 1

1. Recubrir placas de unión regulares de MSD con 5 ml/pocillo de 60 mg/ml de anticuerpo monoclonal 3A8.1. Dejar la placa sin cubrir y permitir que las muestras se sequen durante la noche a temperatura ambiente.

Día 2

15 2. Añadir 200 µl de TBS-Caseína (0,1% de Tween 20) e incubar la placa a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación.

3. Lavar la placa con 300 µl de tampón TBS (0,1% de Tween 20) dos veces. Aspirar o decantar el tampón.

4. Diluir los patrones de VLP-1 en plasma o suero heparinizado normal combinado.

5. Preparar los patrones, QC y muestras del siguiente modo.

20 - 110 µl de plasma/suero

- 44 µl de reactivo HBR (2 mg/ml)

- 66 µl de TBS-Caseína (0,1 % de Tween 20)

Mezclar bien y añadir 100 µl de patrones, QC y muestras en cada pocillo. Incubar durante la noche a 4°C en agitación.

25 Día 3

6. Lavar la placa tres veces con 300 µl de tampón TBS (0,1% de Tween 20).

7. Añadir 100 µl, 4,5 µg/ml de anti-VLP-1 de conejo marcada con rutenio (R3471) (marcada en una proporción de 20:1) en TBS-caseína (0,1% de Tween 20). Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

8. Lavar la placa tres veces con 300 µl de tampón TBS (0,1 % de Tween 20).

30 9. Añadir 150 µl de 1X tampón de lectura T.

10. Leer la placa con el Sector Imager instrument de MSD.

Se encontró que las concentraciones de los anticuerpos de revestimiento y detección indicadas anteriormente daban la sensibilidad más alta de todas las concentraciones analizadas.

35 Los patrones entre 13,7 y 10.000 µg/ml se prepararon enriqueciendo con la VLP-1 recombinante en un grupo de plasma normal. Las Figuras 4A y 4B muestran una curva estándar típica generada mediante un software de ajuste de curvas de 4 parámetros. La Figure 4A muestra el intervalo hasta 12.500 µg/ml; el panel B muestra una representación expandida de la curva estándar en la región de 0-1,250 µg/ml. "URL" hace referencia a las unidades relativas de luz. La sensibilidad del ensayo (menor cantidad mensurable) se estimó en 41,1 µg/ml en base al blanco del ensayo + 3 desviaciones típicas.

40 Treinta y nueve muestras de plasma de donantes normales se analizaron y 36 de ellos estaban por debajo del límite de detección; los otros tenían valores bajos de 42,3, 83,6 y 104,6 µg/ml. De los 18 pacientes con ictus confirmado, solo dos no tenían muestras con VLP-1 detectable, siendo la mayoría considerablemente altos. Las Figuras 5A-5E muestran los resultados en µg/ml a varios tiempos después del inicio del ictus para los 18 pacientes.

Ejemplo 6

45 Modelo de ictus en ratas

Se usó un modelo de ictus en ratas para evaluar el curso en el tiempo de la aparición de tipo visinina 1 en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, en función del tiempo.

5 Se usó un modelo de ictus de filamento con oclusión permanente de la arteria cerebral permanente (pMCAO). Se indujo isquemia en ratas Sprague-Dawley (Charles-River) con la vena femoral canulada usando el procedimiento del filamento intraluminal de oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO). En resumen, se realizó una incisión en la línea media y se expusieron las arterias carótidas común derecha, interna y externa. Las arterias carótida externa y occipital se ligaron. La arteria carótida común se ligó y la carótida interna se cerró temporalmente. Se realizó una incisión pequeña en la arteria carótida común y se insertó un filamento (3.0 Ethilon; con la punta roma) en la arteria carótida interna a través de la arteria carótida común. Se hizo avanzar el filamento 17,5 mm para ocluir el origen de la ACM. El filamento se fijó en su lugar en la arteria carótida común derecha usando una sutura de nailon quirúrgica. Después de la cirugía, se interrumpió la anestesia (isoflurano) y se dejó que los animales se recuperaran.

15 Se extrajo sangre (aproximadamente 0,25 ml) a 5 puntos de tiempo (24 horas antes de la cirugía, así como a las 1, 4, 8 y 24 horas desde la oclusión). Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente y después se centrifugó con el fin de recoger muestras de suero. El LCR se recogió 24 horas después de la oclusión. Todas las muestras se codificaron antes del ensayo de acuerdo con el protocolo siguiente:

1. Diluir los patrones
2. Lavar la placa que se había recubierto con el mAb 3A8.1 3 veces con 300 µl de tampón TBS-T por pocillo. Aspirar el exceso de tampón después del tercer lavado.
- 20 3. Añadir 100 µl (ensayo de LCR) o 150 µl (ensayo de suero) de los patrones, QC y muestras en cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador de placas y agitar brevemente. Incubar en agnación a temperatura ambiente durante 2 horas (Ensayo de LCR) o agitar durante la noche a 4 °C (Ensayo de suero). Las muestras del ensayo de LCR se pasan sin diluir, mientras que las muestras del ensayo de suero se pasan diluidas a 1:3 en el tampón de ensayo.
- 25 4. Preparar 0,1 µg/ml de biotina-2B9.3 (ensayo de LCR) o 0,5 µg/ml de anti VLP-1 de conejo-biotina (ensayo de suero) en tampón de bloqueo.
5. Decantar el líquido de la placa y extraer con golpecitos el exceso de fluido. Asegurarse de que todo el fluido está fuera de los pocillos.
6. Lavar la placa 4 veces con 300 µl de tampón TBS-T por pocillo. Aspirar el exceso de tampón después del cuarto lavado.
- 30 7. Añadir inmediatamente 100 µl de anti-VLP-biotina-2B9.3 (ensayo de LCR) 0,1 µg/ml o 0,5 µg/ml de anti VLP-1 de conejo-biotina (ensayo de suero) a cada pocillo. Incubar 2 horas a 37 °C.
8. Preparar 0,5 µg/ml de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluyendo a 1:1000. 0,5 mg/ml de reserva en glicerol con tampón de bloqueo.
- 35 9. Decantar el líquido de la placa y extraer con golpecitos el exceso de fluido. Asegurarse de que todo el fluido está fuera de los pocillos.
10. Lavar la placa 4 veces con 300 µl de tampón TBS-T por pocillo. Aspirar el exceso de tampón después del cuarto lavado.
- 40 11. Añadir a cada pocillo 100 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina 0,5 µg/ml. Incubar 1,5 horas a 37 °C. Decantar el líquido de la placa y extraer con golpecitos el exceso de fluido. Asegurarse de que todo el fluido está fuera de los pocillos.
12. Lavar la placa 4 veces con 300 µl de tampón TBS-T por pocillo. Aspirar el exceso de tampón después del cuarto lavado.
13. Inmediatamente añadir 100 µl del sustrato CDP-Star a cada pocillo.
14. Leer la placa 5-10 minutos a 460/40 nm.
- 45 El curso de tiempo de la visinina en suero de acuerdo con el ensayo en el modelo de rata se muestra en la Figura 6. Antes de inducir el ictus, los valores eran indetectables. Como se ha mostrado, la VLP-1 era detectable mediante una hora postoclusión y se mantuvo durante 24 horas. Ensayos similares en líquido cefalorraquídeo mostraron los valores medios en una muestra de cinco ratas de > 20.000 pg/ml tras 24 horas.

Ejemplo 7

50 Desarrollo de ensayos adicionales

También se desarrollaron ensayos cuantitativos para neuroserpina, GAD67 y zígina.

El ensayo para neuroserpina usó anticuerpo de captura 4221 5B5.1 (recubierto a 3 µg/ml) y 2 µg/ml de 4505 2F1.1. biotinilado. La detección se realizó mediante estreptavidina-fosfatasa alcalina. (Véase la figura 7A) La serpina se detectó en de 5 a 6 muestras de LCR de un modelo de rata de ictus isquémico. Los valores variaron de 7 a 20 unidades de serpina.

Se desarrolló un ensayo cuantitativo para GAD67 usando electroquimioluminiscencia (MESO Scale Discovery). El ensayo usó anti-GAD467 de conejo inmunopurificado (R4043) como anticuerpo de captura y anti-GAD67 de conejo inmunopurificado marcado (R4610) con rutenio como anticuerpo de terminación. La curva estándar da un valor señal de aproximadamente 1.000 unidades a una concentración de 1 ng/ml de AGD67 y una progresión no lineal de aproximadamente 14.000 unidades de señal a 100 ng/ml. (Véase la figura 7B)

Se desarrolló un ensayo cuantitativo para Zígina usando electroquimioluminiscencia (MESO Scale Discovery). El ensayo usa el anticuerpo monoclonal 1G4.4 como anticuerpo de captura (300 ng recubiertos en placas de MSD) y el anticuerpo monoclonal 4G3-1 marcado con rutenio como anticuerpo de detección. La curva estándar (Figura 7C) proporciona una relación lineal general de entre 1.000 unidades de MSD a 1 ng/ml a aproximadamente 3.500 unidades de MSD a 3 ng/ml.

Ejemplo 8

Muestras de LCR posmortem

Una muestra posmortem de LCR humano (Analytical Biological Services, Wilmington, DE) se analizó para determinar si se encontraría algunos de los marcadores cerebrales en el LCR de cerebros privados de oxígeno durante horas.

Se realizaron transferencias de tipo western en líquido espinal posmortem humano a varias diluciones y la intensidad de la banda se comparó visualmente con los patrones de las respectivas proteínas. Los valores para zígina, neuroserpina y GAD67 fueron inferiores a 2,5 ng/ml y de visinina eran entre 25 y 250 ng/ml. Este intervalo era muy acorde con la determinación del ensayo cuantitativo de 17,1 ng/ml para visinina (4 muestras de LCR pre-mortem obtenidas de Teragenix tenían valores que variaban únicamente de 0,11 ng/ml a 0,31 ng/ml). El sistema cuantitativo también detectó GAD67 a 300 pg/ml y zígina a 56 pg/ml en el líquido espinal posmortem.

Resumen de los resultados

La tabla 3 muestra un resumen de los resultados indicados anteriormente determinados para determinadas proteínas marcadoras.

Tabla 3

Expresión proteica de algunos genes específicos de cerebro*					
Gen	Transferencia de tipo Western de cerebro humano	Otros tejidos humanos	Encontrado en sangre humana tras ictus isquémico	LCR humano posmortem	LCR de modelo de ictus en ratas
VSNL1	+	Cuello uterino, piel	Sí	Sí	Sí
FEZ1	+	Ninguno		Sí	
SERPINI1	+	Próstata, tiroides y restos en riñón y páncreas			Sí
GAD1	+	Ninguno		Sí	
INA	+				
SNAP25	+	Restos en unos pocos tejidos			
MOBP	+	Restos en páncreas			
PLP1	Neg				

*Las zonas no rellenadas no se realizaron

Las proteínas expresadas por los genes específicos de cerebro se encuentran en cantidades significativas en el

cerebro y solo ligeramente, si se expresan algo, en otros tejidos. Las proteínas analizadas también se encontraron en sangre tras un ictus en seres humanos o en sangre y/o LCR en un modelo de ictus en rata. Por tanto, los productos proteicos de los genes específicos de cerebro dan hallazgos similares a los de la expresión del ARNm de los genes.

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar la aparición de daño cerebral en un sujeto, en el que el procedimiento comprende analizar una muestra que comprende un fluido biológico, o fracción del mismo, de dicho sujeto para detectar la presencia de un marcador que es el ARNm o el producto proteico del gen localizado en el gen N° ID 7447 (VSNL1) que codifica el tipo visinina 1 (VLP-1), en el que la presencia de dichos marcadores indica daño cerebral.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto es humano.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho daño cerebral se debe a un ictus o a la enfermedad de Alzheimer.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el fluido biológico es LCR, suero, orina o plasma.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el fluido biológico es suero o plasma.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho análisis comprende tratar dicho fluido de muestra con al menos un anticuerpo inmunorreactivo con VLP-1.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la proteína es monoclonal reconoce un epítipo seleccionado de los aminoácidos 3-11, 16-23 y 139-155 de la VLP-1 humana.
8. El procedimiento de las reivindicaciones 6 o 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además incluye analizar dicha muestra para detectar la presencia de un marcador adicional, que es el ARNm o producto proteico de un gen seleccionado del grupo que consiste en el localizado en
 - el gen N° ID 6616 (SNAP25) que codifica la proteína asociada con el sinaptosoma, 25 kDa,
 - el gen N° ID 2571 (GAD1) que codifica la glutamato descarboxilasa 1, (cerebro, 67 kDa) (GAD67),
 - el gen N° ID 4336 (MOBP) que codifica la proteína básica de oligodendrocitos asociados con la mielina,
 - el gen N° ID 6857 (SYT1) que codifica la sinaptotagmina I,
 - el gen N° ID 10382 (TUBB4) que codifica la tubulina, beta 4,
 - el gen N° ID 9638 (FEZ1) que codifica la proteína zeta 1 de fasciculación y elongación (Zigina 1)
 - el gen N° ID 2743 (GLRB) que codifica el receptor de la glicina, beta,
 - el gen N° ID 140767 (VMP) que codifica la proteína de membrana vesicular p24,
 - el gen N° ID 10439 (OLFM1) que codifica la olfatomedina 1,
 - el gen N° ID 7545 (ZIC1) que codifica el miembro 1 de la familia Zic (homólogo mal apareado, Drosophila),
 - el gen N° ID 29993 (PACSIN1) que codifica el sustrato de la proteína quinasa C y de la caseína quinasa en neuronas 1,
 - el gen N° ID 5354 (PLP1) que codifica la proteína proteolípídica 1 (enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, paraplejía espástica 2),
 - el gen N° ID 9118 (INA) que codifica la proteína del filamento intermedio neuronal internexina, alfa,
 - el gen N° ID 140679 (SLC32A1) que codifica la familia de transportadores de soluto 32 (transportador vesicular de GABA), miembro 1
 - el gen N° ID 5274 (SERPINI1) que codifica el inhibidor de la serina (o cisteína) proteinasa, clado I (neuroserpina), miembro 1
 - el gen N° ID 4826 (NNAT) que codifica la neuronatina,
 - el gen N° ID 2566 (GABRG2) que codifica el receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA), gamma 2
 - el gen N° ID 6844 (VAMP2) que codifica la proteína de membrana asociada a la vesícula (sinaptobrevina 2), o
 - el gen N° ID 4900 (NRGN) que codifica la neurogranina (sustrato de la proteína quinasa C, RC3).
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el marcador adicional es neuroserpina y los anticuerpos son

inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo 4421 2G10.2; y/o 4421 5B5.1; y/o 4421 7D6.3; y/o 4505 2F1.1, o en el que el marcador adicional es zigina y los anticuerpos son inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo 4554 1 G4.4; y/o 4563 4G3.1; y/o R4726; y/o R4727, o

5 en el que el marcador adicional es GAD67 y los anticuerpos son inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo R4610; y/o R4609; y/o R4043; y/o R4404; y/o Chemicon MAB5406,

o en el que el marcador adicional es internexina y los anticuerpos son inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo SC-7571 y/o SC-7570, o

en el que el marcador adicional es la proteína asociada con el sinaptosoma 25 kDa y los anticuerpos son inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo SC-7538; y/o SC-7539 y/o SC-20038, o

10 en el que el marcador adicional es la proteína proteolípídica 1 y los anticuerpos son inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo SC-23570; y/o SC-18529, o

en el que el marcador adicional es la proteína básica de oligodendrocitos asociada con la mielina y los anticuerpos son inmunorreactivos con un epítoto reconocido por el anticuerpo SC-14250, y/o SC-25666.

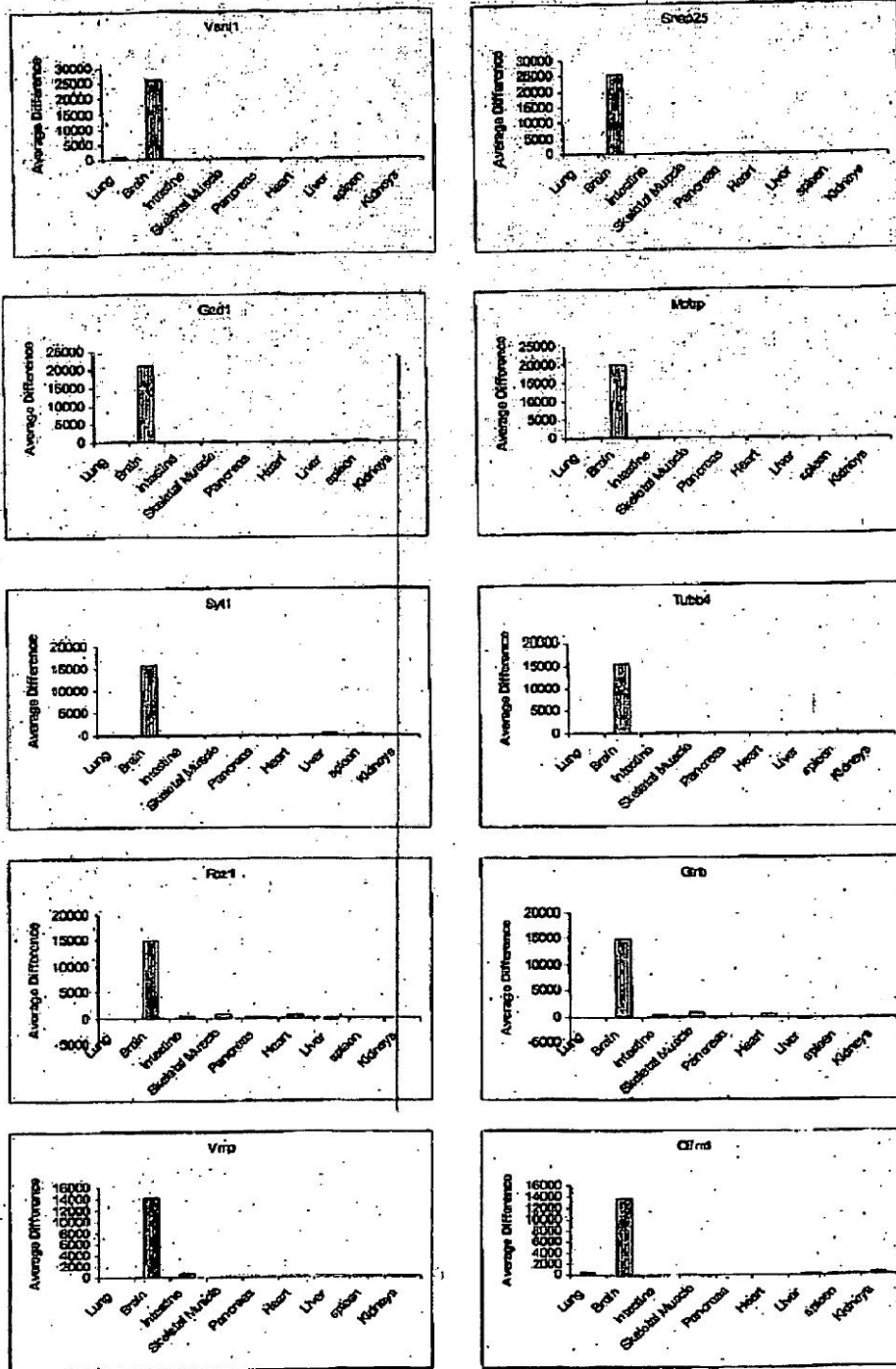


FIGURA 1A

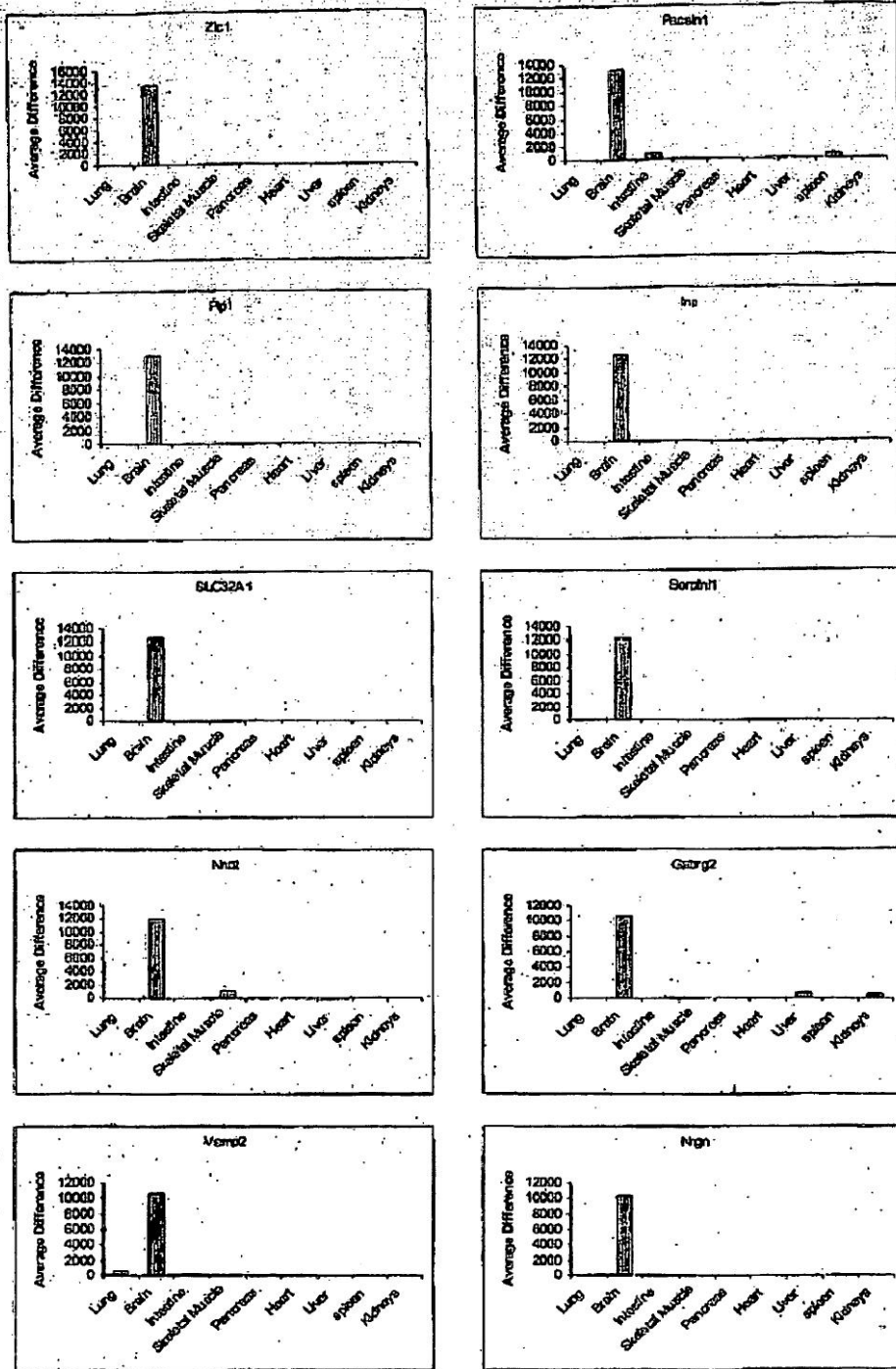


FIGURA 1B

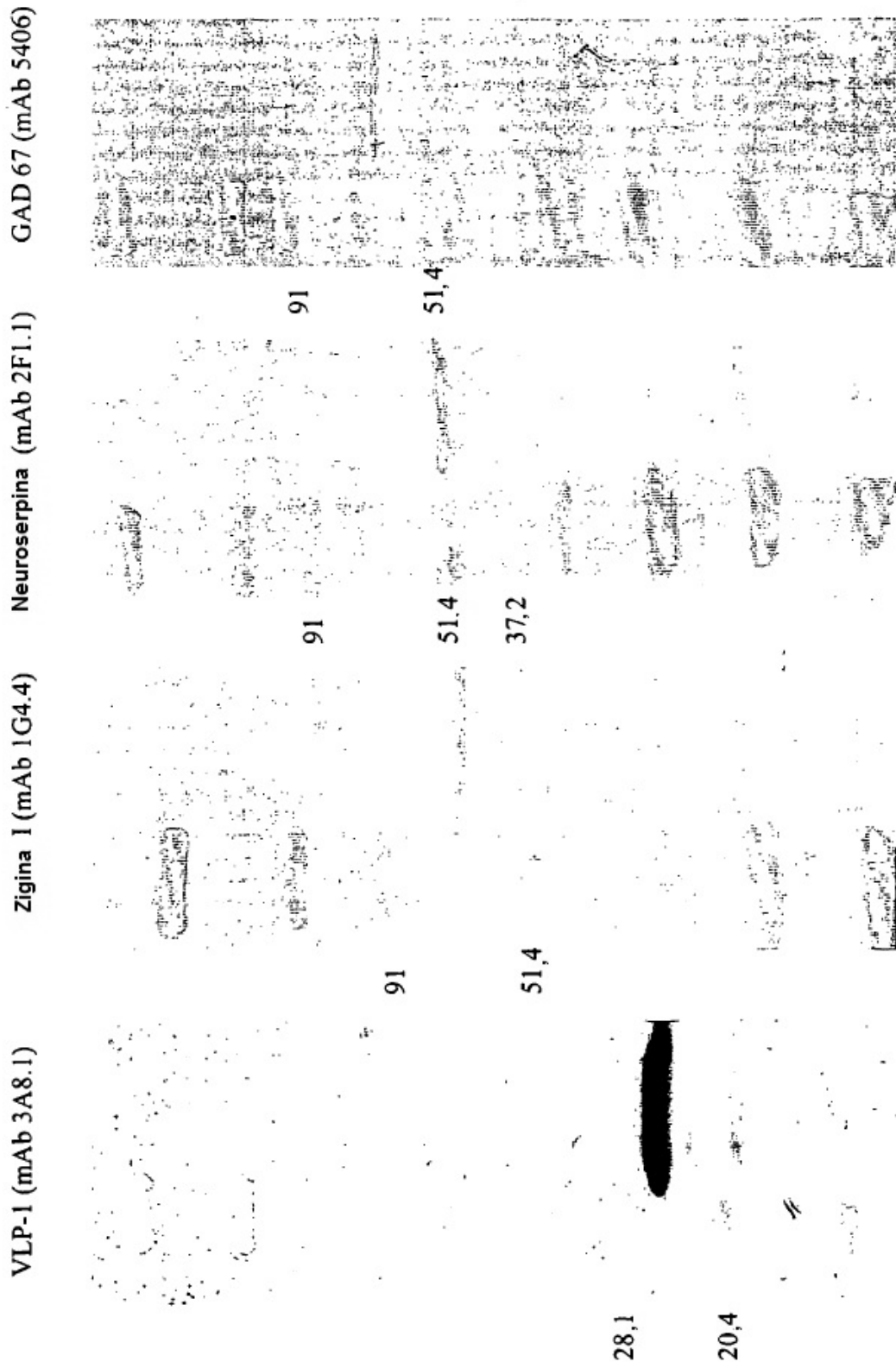
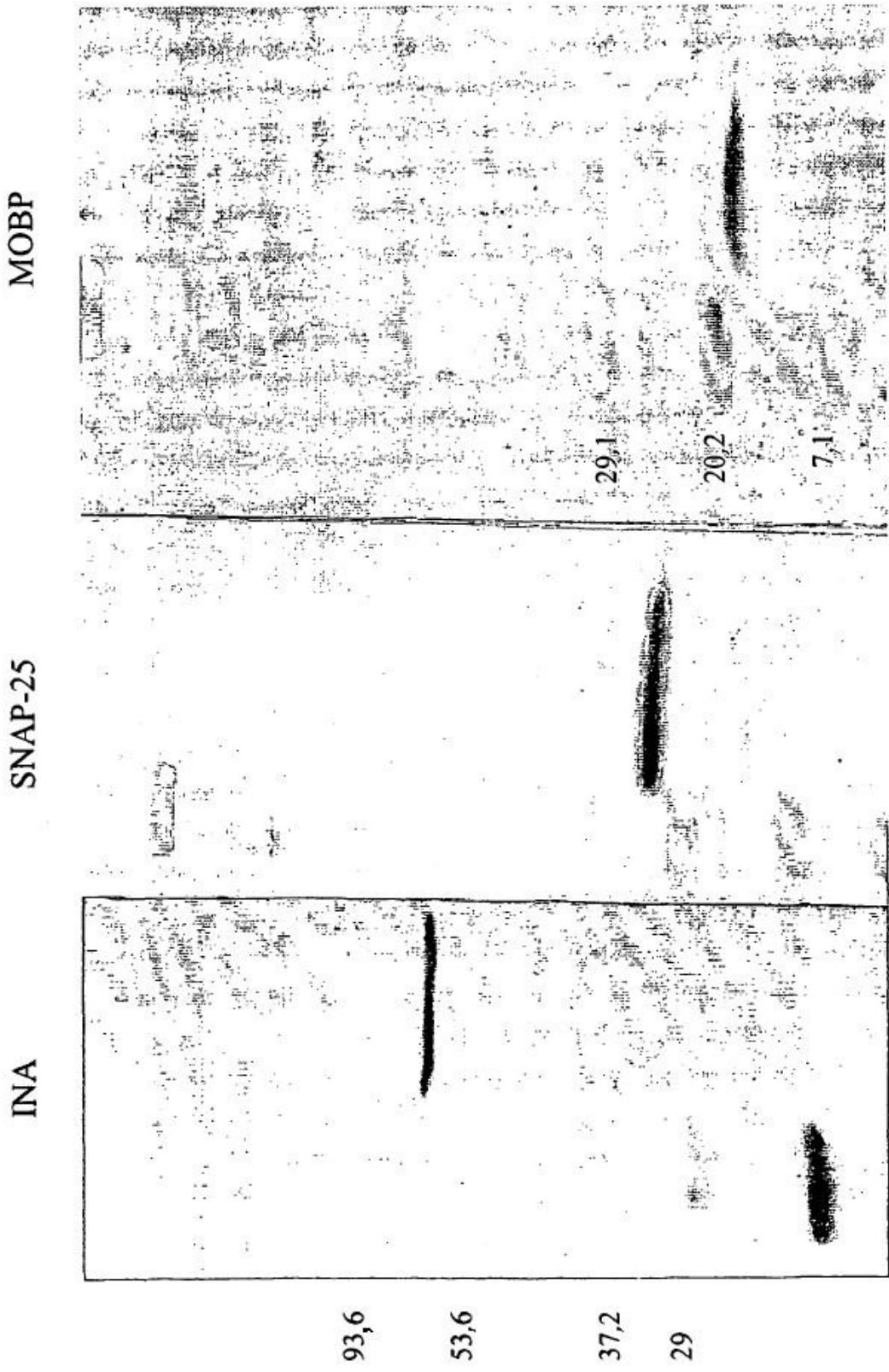


Figura 2

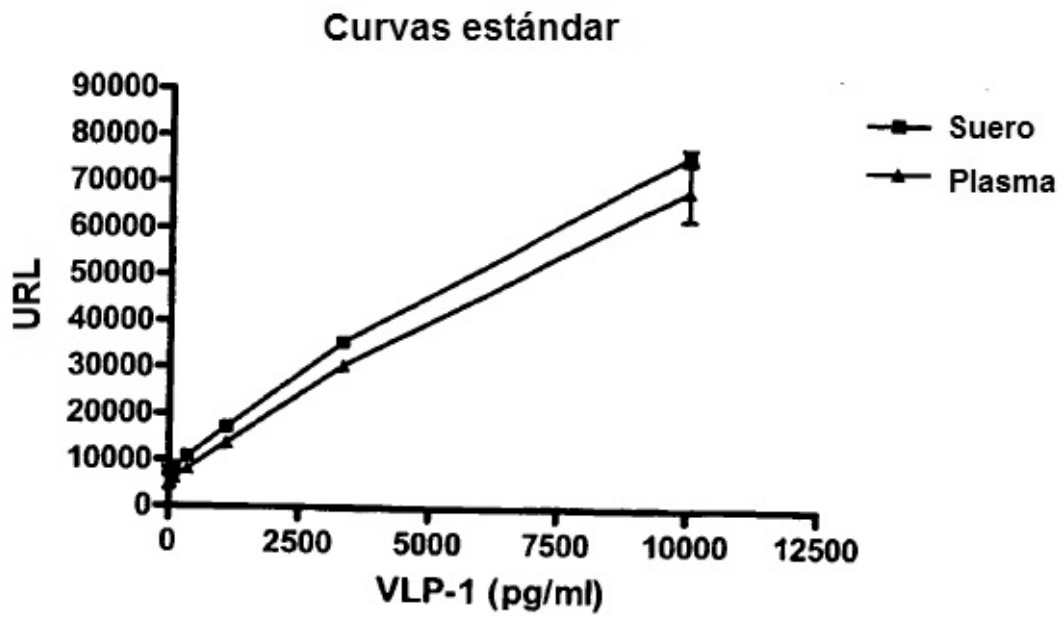


Conejo sc-25666

Cabra sc-7571 & sc-7570 Cabra sc-7539 & sc-7538

Figura 3

A



B

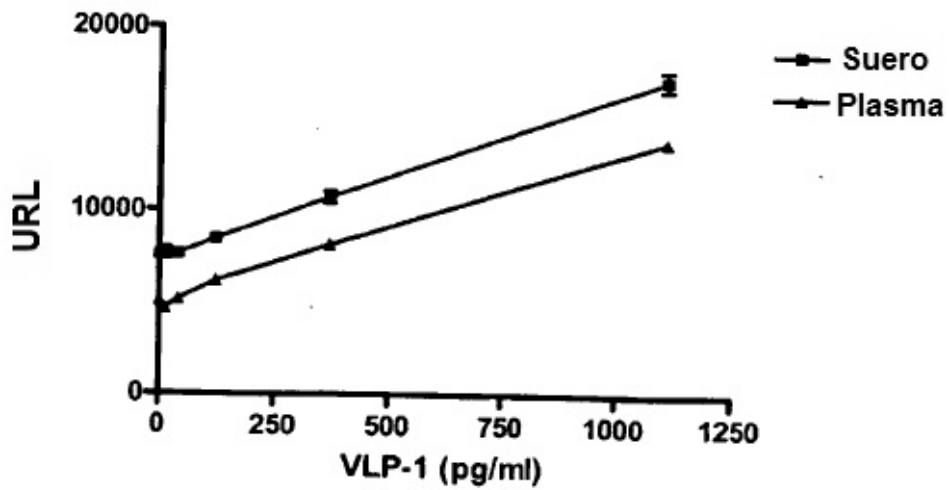


Figura 4

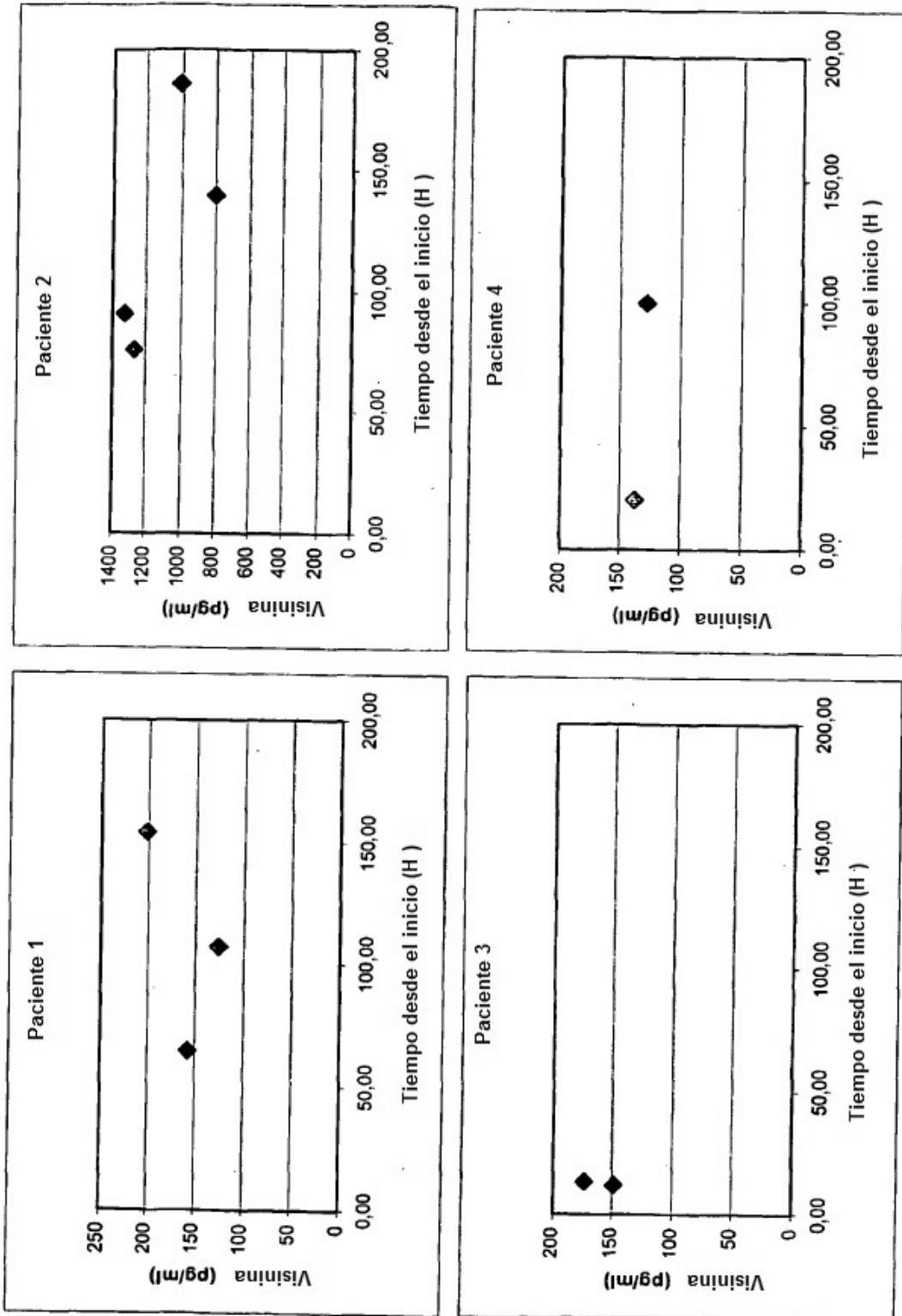


Figura 5A

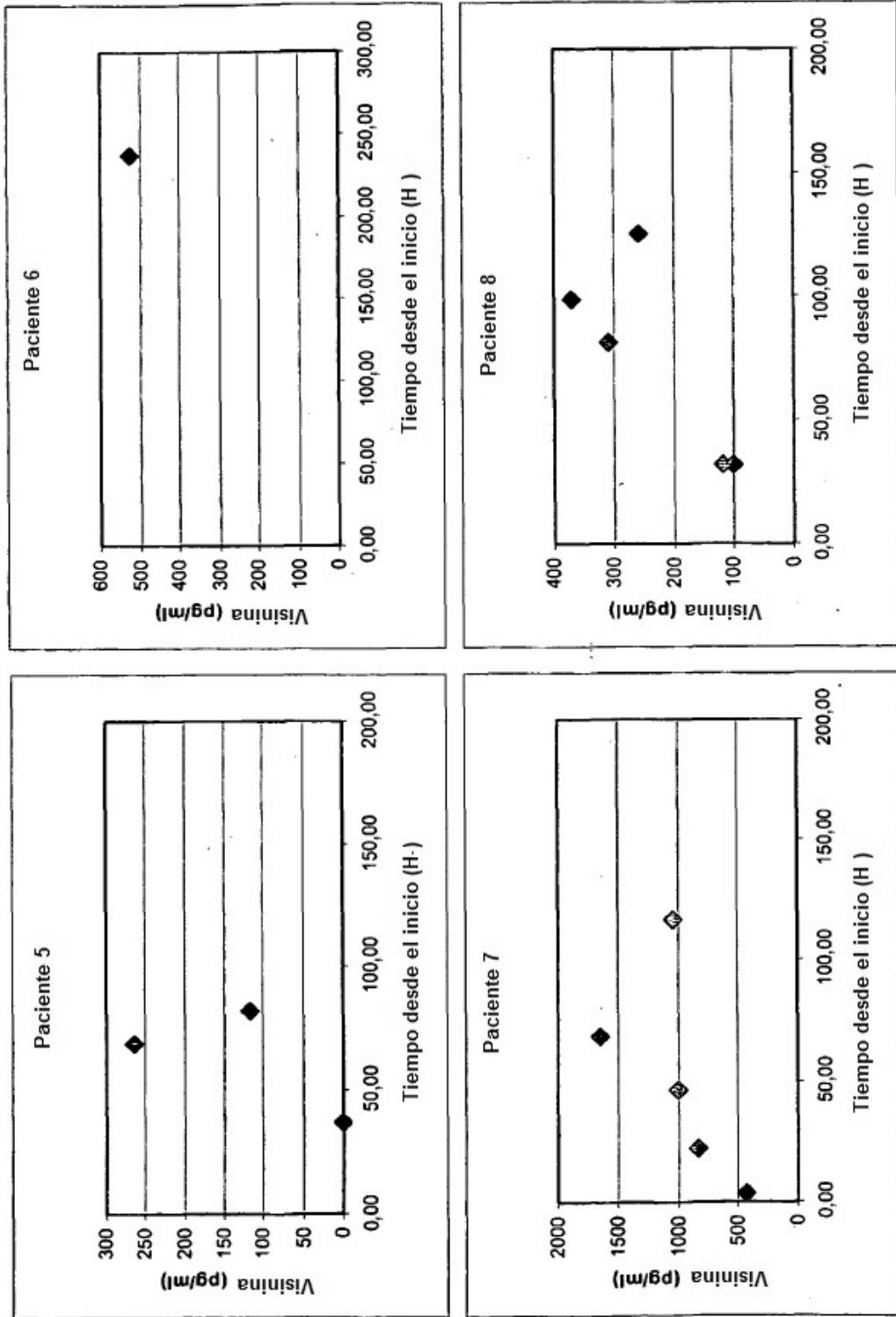


Figura 5B

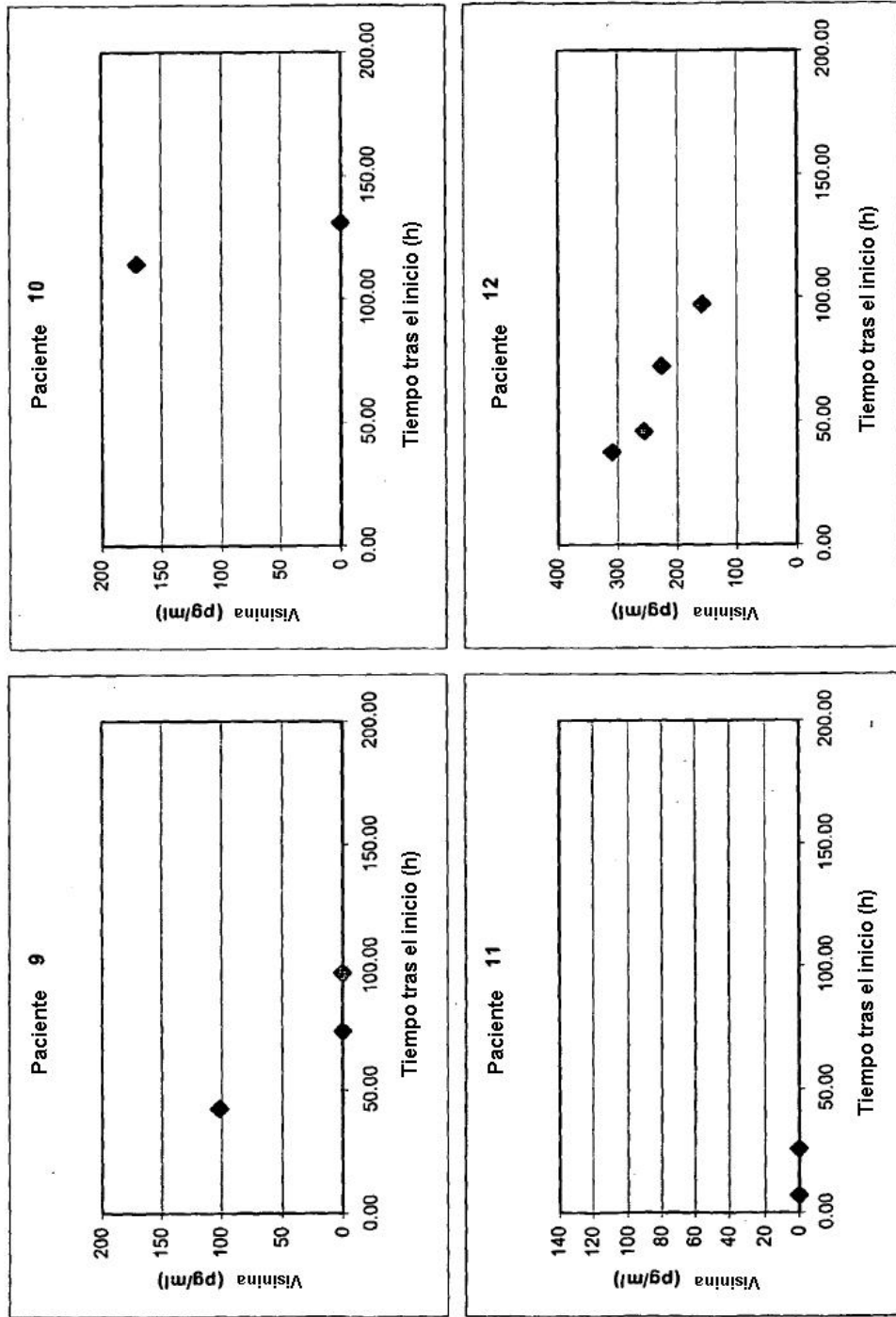


Figura 5C

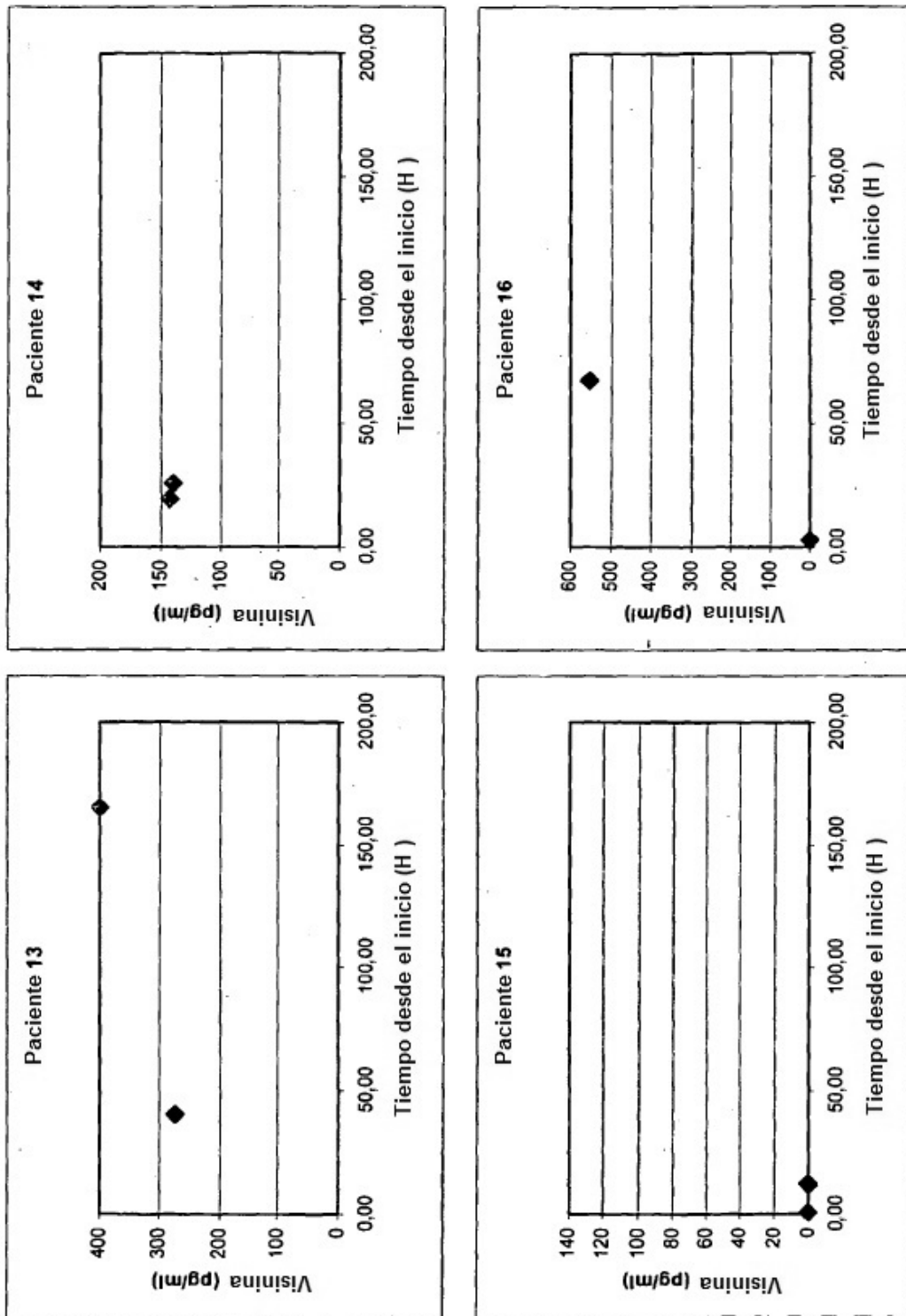


Figura 5D

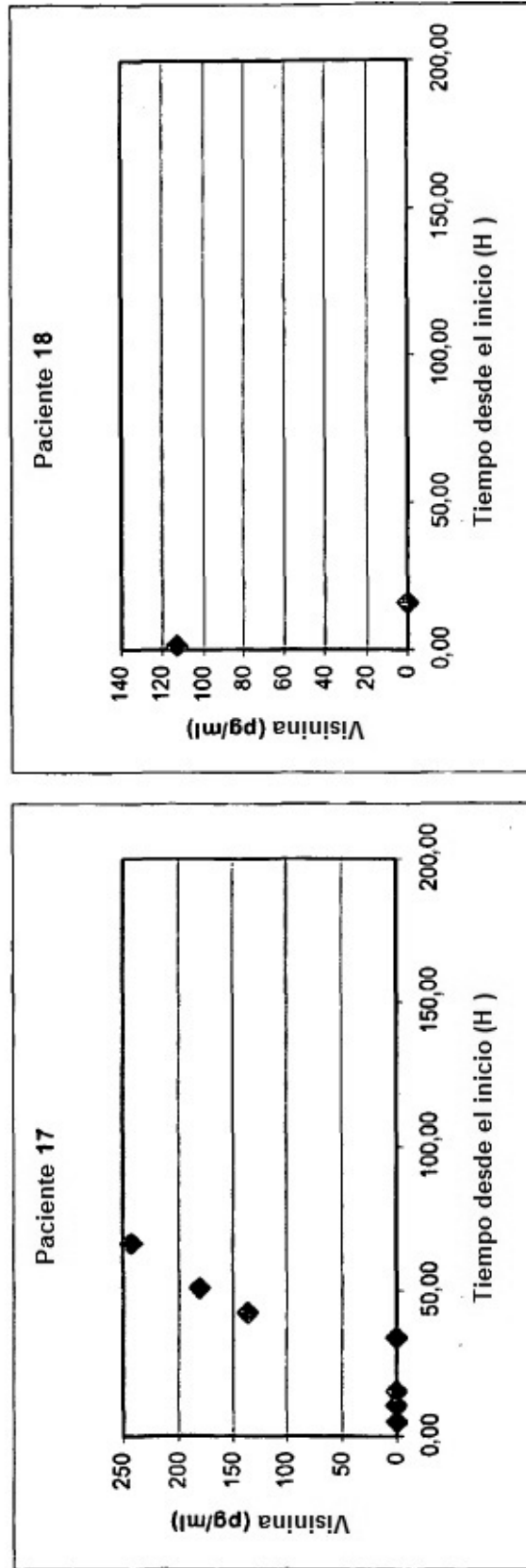


Figura 5E

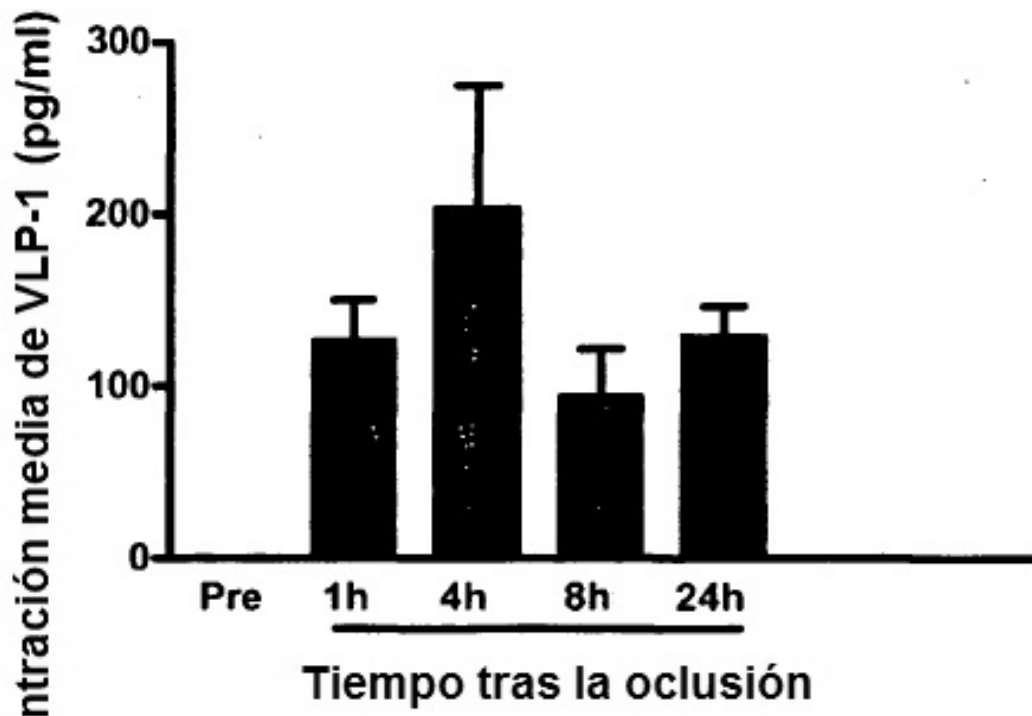


Figura 6

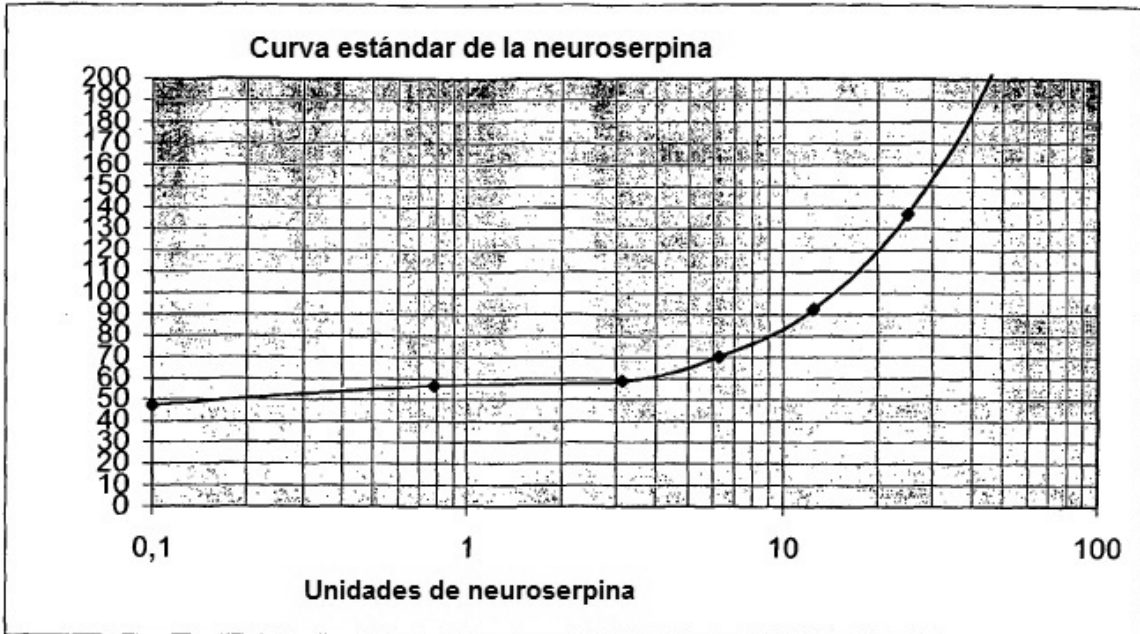


Figura 7A

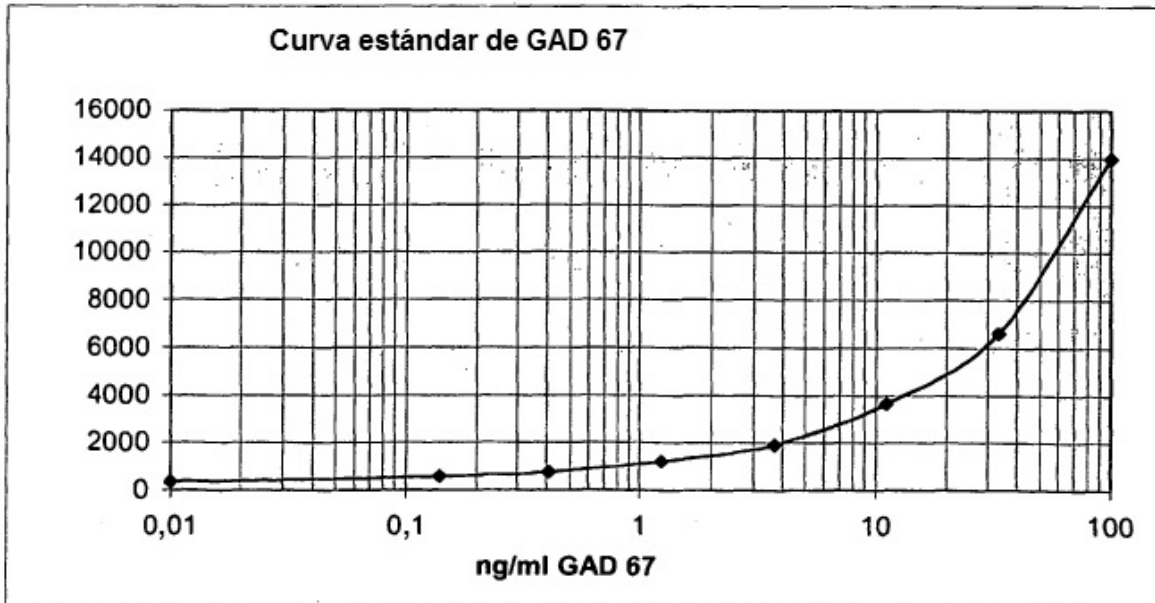


Figura 7B

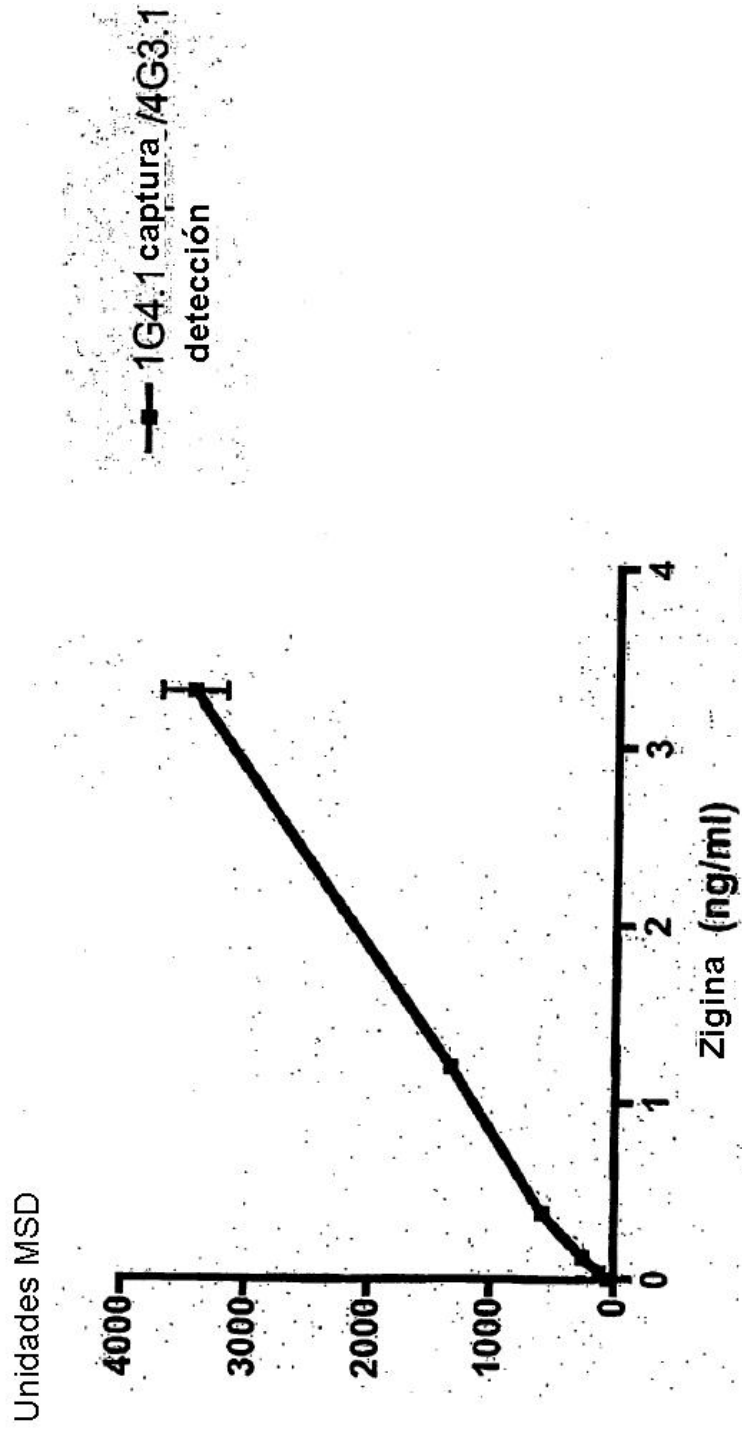


Figura 7C