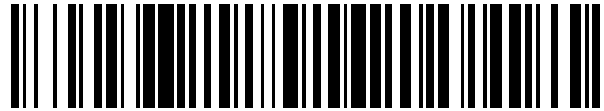


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 142**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2005 E 10001581 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2207033**

54 Título: **Proteínas neurales como biomarcadores para lesiones del sistema nervioso y otros trastornos neurales**

30 Prioridad:

15.04.2004 US 562944 P

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

01.08.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (50.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611 , US y
BANYAN BIOMARKERS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HAYES, RONALD;
WANG, KA-WANG, KEVIN;
LIU, MING-CHEN y
OLI, MONIKA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 482 142 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

Proteínas neurales como biomarcadores para lesiones del sistema nervioso y otros trastornos neurales

Campo de la invención

5 La invención proporciona la detección y la identificación fiable de biomarcadores, que son importantes para el diagnóstico y la prognosis de daños en el sistema nervioso (sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP)), lesiones cerebrales y trastornos neurales. El perfil de proteínas/péptidos en pacientes con daños en los nervios y las células cerebrales se distingue de los individuos normales utilizando técnicas baratas. Estas técnicas proporcionan estrategias sencillas, pero sensibles, para diagnosticar los daños en el sistema nervioso central, lesiones cerebrales y trastornos neuronales utilizando fluidos biológicos.

10 Antecedentes de la invención

15 La incidencia de lesiones cerebrales traumáticas ("traumatic brain injury", TBI) en EEUU se calcula, de forma conservadora, en más de 2 millones de personas por año, con aproximadamente 500.000 hospitalizaciones. De estas, aproximadamente 70.000 a 90.000 de los supervivientes de lesiones cerebrales quedan permanentemente discapacitados. El coste económico anual para la sociedad por los cuidados a los pacientes con lesiones en la cabeza se calcula en 25.000 millones de dólares. Estos datos se refieren solo a la población civil, y la incidencia es mucho mayor cuando se incluyen los accidentes de combate. En las guerras modernas (1993-2000), las TBI son la principal causa de muerte (53%) entre los heridos que llegan a las instalaciones de cuidados médicos.

20 La evaluación de la patología y la alteración neurológica inmediatamente después de TBI es crucial para la determinación de la gestión clínica apropiada y para predecir el resultado a largo plazo. Las mediciones de los resultados que se emplean con más frecuencia en las lesiones en la cabeza son la escala de coma de Glasgow (GCS), la escala de resultado de Glasgow (GOS), la tomografía computerizada, y la formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) para detectar la patología intracraneal. Sin embargo, a pesar de que los sistemas de triage de emergencias han sido mejorados en gran medida, basándose en estas mediciones de los resultados, la mayoría de las TBI sufren una alteración a largo plazo y un gran número de supervivientes de TBI se ven gravemente afectados, a pesar de las predicciones de "recuperación buena" en la GOS. Además, CT y MRI son caras y no pueden emplearse con rapidez en el entorno de una sala de emergencias. Además, en los entornos médicos austeros asociados con el combate, un diagnóstico preciso de TBI sería un prerrequisito fundamental para un triage apropiado de los accidentes.

30 El sistema nervioso de mamíferos comprende un sistema nervioso periférico (SNP) y un sistema nervioso central (SNC, que comprende el cerebro y la médula espinal), y está compuesto por dos clases principales de células: neuronas y células gliales. Las células gliales rellenan el espacio entre las neuronas, las alimentan y modulan su función. Ciertas células gliales, tales como las células de Schwann en el SNP y los oligodendrocitos en el SNC, también proporcionan una vaina de mielina protectora que rodea y protege a los axones neuronales, que son los procesos que se extienden desde el cuerpo de la célula neuronal y a través de los cuales son transportados los impulsos eléctricos de la neurona. En el sistema nervioso periférico, los axones largos de múltiples neuronas están agrupados entre sí para formar un nervio o una fibra nerviosa. Estos, a su vez, pueden combinarse en fascículos, en los que las fibras nerviosas forman agrupaciones rodeadas, junto con el suministro vascular intraneural, por una matriz de colágeno suelta unida mediante una vaina multilaminar protectora. En el sistema nervioso central, los cuerpos de las células neuronales pueden distinguirse de modo visual de sus procesos revestidos de mielina, y se conocen en la técnica como materia gris y blanca, respectivamente.

45 Durante el desarrollo, las neuronas en diferenciación de los sistemas nerviosos central y periférico proyectan los axones que deben crecer y ponerse en contacto con las células diana específicas. En algunos casos, los axones en crecimiento deben cubrir enormes distancias; algunos crecen hacia la periferia, mientras que otros se mantienen confinados dentro del sistema nervioso central. En mamíferos, esta etapa de la neurogénesis se completa durante la fase embrionaria de la vida, y las células neuronales no se multiplican tras haberse diferenciado completamente.

50 Por consiguiente, las vías neurales de un mamífero se encuentran particularmente en riesgo si las neuronas se someten a traumatismos mecánicos o químicos, o a una degeneración neuropática suficiente como para que las neuronas que definen la vía se coloquen en riesgo de muerte. Hasta la fecha se ha identificado un conjunto de neuropatías, algunas de las cuales solo afectan a una subpoblación, o a un sistema de neuronas en los sistemas nerviosos periférico o central. Las neuropatías, que pueden afectar a las propias neuronas o a las células gliales asociadas, pueden surgir de una disfunción metabólica celular, infección, exposición a agentes tóxicos, disfunción autoinmunitaria, malnutrición o isquemia. En algunos casos, se cree que la disfunción celular induce la muerte celular directamente. En otros casos, la neuropatía puede inducir una necrosis suficiente del tejido como para estimular el sistema inmunológico/inflamatorio del cuerpo, y los mecanismos de la respuesta inmunológica del cuerpo contra la lesión neural inicial entonces destruyen a las neuronas y la vía definida por estas neuronas.

55 Otra lesión común en el SNC es el ictus, la destrucción de tejido cerebral como resultado de un infarto o una hemorragia intracerebral. El ictus es la principal causa de muerte en el mundo desarrollado. Puede estar provocado por un menor flujo de sangre o isquemia que provoca un suministro sanguíneo deficiente y la muerte de los tejidos

en un área del cerebro (infarto). Las causas de los ictus isquémicos incluyen coágulos sanguíneos que se forman en los vasos sanguíneos en el cerebro (trombos) y los coágulos sanguíneos o trozos de placas ateroscleróticas u otro material que puedan viajar hasta el cerebro desde otra localización (embolias). Un sangrado (hemorragia) dentro del cerebro también puede provocar síntomas que imiten al ictus. En la técnica anterior no existe la capacidad de detectar esta lesión.

Las vías neurales de mamíferos también están en riesgo debido a los daños provocados por las lesiones neoplásicas. Se han identificado neoplasias de neuronas y de células gliales. Las células transformadas de origen neural en general pierden su capacidad para comportarse como células diferenciadas normales y pueden destruir las vías neurales por la pérdida de función. Además, los tumores en proliferación pueden inducir lesiones distorsionando la estructura del tejido nervioso normal, inhibiendo vías por la compresión de nervios, inhibiendo el flujo del fluido cerebroespinal o el suministro de sangre y/o estimulando la respuesta inmunológica del cuerpo. Los tumores metastásicos, que son una causa significativa de lesiones neoplásicas en el cerebro y la médula espinal, también pueden dañar de forma similar las vías neurales e inducir la muerte de células neuronales.

Por tanto, en la técnica son necesarias evaluaciones clínicas diagnósticas apropiadas, específicas, baratas y sencillas de la gravedad de las lesiones del sistema nervioso y la eficacia del tratamiento terapéutico. Por tanto, la identificación de marcadores neuroquímicos que sean específicos o que se encuentren predominantemente en el sistema nervioso central (SNC (cerebro y médula espinal) y SNP), sería inmensamente beneficiosa para la predicción del resultado y como guía para la administración terapéutica dirigida.

Sumario

La presente invención proporciona marcadores de proteínas neuronales que están presentes diferencialmente en las muestras de pacientes que padecen lesiones neurales y/o trastornos neuronales, comparado con muestras de sujetos control. La presente invención también proporciona métodos sensibles y rápidos, y kits que pueden utilizarse como ayuda para el diagnóstico de lesiones neurales y/o trastornos neuronales mediante la detección de estos marcadores. La medición de estos marcadores, solos o en combinación, en muestras de pacientes proporciona información que un diagnosticador puede correlacionar con un diagnóstico probable del grado de lesión neural, tal como lesiones cerebrales traumáticas (TBI) e ictus.

En una realización preferida, la invención proporciona biomarcadores que son indicativos de una lesión cerebral traumática, daños neuronales, trastornos neurales, daños cerebrales, daños neurales debidos a la adicción a fármacos o alcohol, enfermedades asociadas con el cerebro o el sistema nervioso, tal como el sistema nervioso central. Preferiblemente, los biomarcadores son proteínas, sus fragmentos o derivados, y están asociadas con células neuronales, células cerebrales o cualquier célula que esté presente en el cerebro y el sistema nervioso central.

En una realización preferida, los biomarcadores son preferiblemente proteínas neurales, sus péptidos, fragmentos o derivados. Los ejemplos de proteínas neurales incluyen, pero no se limitan a proteínas axonales, proteína precursora de amiloides, proteínas dendríticas, proteínas somáticas, proteínas presinápticas, proteínas postsinápticas, y proteínas nucleares neurales.

En otra realización preferida, los biomarcadores se seleccionan de al menos una proteína, sus péptidos, variantes o fragmentos, tales como las proteínas listadas en la siguiente tabla 1. Por ejemplo, proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolipidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos

específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

En otra realización preferida, los biomarcadores proceden de al menos dos o más proteínas, sus péptidos, variantes o fragmentos, tales como las proteínas listadas en la siguiente tabla 1. Por ejemplo, proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptotagmina-1 (Q62910), sinaptotagmina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_I49015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a/-b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

- En otra realización preferida, los biomarcadores comprenden al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o trastornos neurales. La composición comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).
- En otra realización preferida, se emplea un panel expandido de biomarcadores para proporcionar información muy enriquecida del mecanismo de la lesión, los modos de muerte celular (necrosis frente a apoptosis), los sitios de la lesión, los sitios y el estado de los diferentes tipos de células en el sistema nervioso, y un mejor diagnóstico (mejor selectividad y especificidad). Esta invención es una mejora importante y significativa frente a las tecnologías existentes que se centran en un pequeño panel (por ejemplo, un panel de cuatro marcadores: MBP-trombomodulina-S 100B-NSE de Syn X Pharma (Mississauga, Canadá), o marcadores individuales (por ejemplo, S100B de DiaSorin (Suecia)).
- En otra realización preferida, los biomarcadores se seleccionan para distinguir entre diferentes regiones anatómicas del hospedante. Por ejemplo, al menos un biomarcador puede seleccionarse de biomarcadores de proteínas subcelulares neurales, marcadores anatómicos del sistema nervioso, tales como biomarcadores de proteínas del hipocampo y biomarcadores de proteínas del cerebelo. Los ejemplos de biomarcadores de proteínas subcelulares son NF-200, NF-160, NF-68. Los ejemplos de biomarcadores de proteínas del hipocampo son SCG10, estatmina. Un ejemplo de un biomarcador de proteínas del cerebelo es la proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2).
- En otra realización preferida, los biomarcadores se seleccionan para distinguir entre lesiones a nivel celular, detectando con ello qué tipo de célula ha sido dañada. Por ejemplo, al menos una proteína biomarcadora se selecciona de un panel representativo de biomarcadores de proteínas específicos para este tipo de célula. Los ejemplos de biomarcadores específicos para tipos de células incluyen biomarcadores de mielina-oligodendrocitos, tales como proteína básica de mielina (MBP), proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), proteína NS-1 de oligodendrocitos, glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG). Los ejemplos de biomarcadores específicos para células de Schwann incluyen, pero no se limitan a proteína de mielina de células de Schwann. Los ejemplos de biomarcadores de proteínas de células gliales incluyen, pero no se limitan a GFAP (n.º de registro de proteínas P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI)-P04785. Así, mediante la detección de uno o más biomarcadores específicos, pueden determinarse los tipos de células específicos que se han dañado.
- En otra realización preferida, pueden utilizarse biomarcadores específicos para diferentes estructuras subcelulares de una célula para determinar el nivel subcelular de la lesión. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a biomarcadores de proteínas subcelulares neurales, tales como NF-200, NF-160, NF-68; biomarcadores dendríticos, tales como, por ejemplo, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B, MAP-2C, Tau, dinamina-1 (P212575), focina, dinactina (Q13561), p24, proteína asociada a microtúbulos, vimentina (P31000); proteínas somáticas, tales como, por ejemplo, UCH-L1 (Q00981), PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, proteínas 14-3-3; proteínas nucleares neurales, tales como, por ejemplo, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), NeuN. Así, la detección de biomarcadores específicos determinará el grado y la localización subcelular de la lesión.
- En otra realización preferida, se seleccionan biomarcadores específicos para diferentes regiones anatómicas, diferentes tipos de células y/o diferentes estructuras subcelulares de una célula para proporcionar información acerca de la localización de una lesión anatómica, la localización del tipo de célula dañada, y la localización de la lesión a nivel subcelular. Puede utilizarse cualquiera de una serie de biomarcadores de cada conjunto para proporcionar información detallada y muy enriquecida del mecanismo, modo y sitios subcelulares de la lesión, localizaciones anatómicas de la lesión, y estado de los diferentes tipos de células en el sistema nervioso (subtipos neuronales, células progenitoras neurales, células astrogiales, oligodendrocitos y células microgliales).
- En una realización preferida, se emplea al menos un biomarcador específico de diferentes localizaciones, tales como para una región anatómica, diferentes tipos de células y/o diferentes estructuras subcelulares, para determinar el mecanismo, modo, sitios subcelulares de la lesión, localizaciones anatómicas de la lesión, y estado de los diferentes tipos de células en el sistema nervioso, más preferiblemente se selecciona un panel de al menos 2 biomarcadores de cada localización deseada, más preferiblemente se seleccionan al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hasta aproximadamente 100 biomarcadores de cada localización.
- En una realización preferida, los biomarcadores neuronales subcelulares para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC y/o trastornos neurales, preferiblemente son al menos uno de proteínas axonales, proteínas dendríticas, proteínas somáticas, proteínas nucleares neurales, proteínas presinápticas, proteínas postsinápticas.

En una realización preferida, las proteínas axonales identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina, sus péptidos, fragmentos o derivados;

5 En una realización preferida, las proteínas dendríticas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2, sus péptidos, fragmentos o derivados;

10 En otra realización preferida, las proteínas nucleares neurales identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: NeuN - 1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina, sus péptidos o fragmentos.

En otra realización preferida, las proteínas somáticas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-epsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22, sus péptidos, fragmentos o derivados;

20 En otra realización preferida, las proteínas presinápticas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), sintaxina, CRMP1, 2, anfifisina-1 (NP_001626), anfifisina-2 (NP_647477), sus péptidos, fragmentos o derivados;

25 En otra realización preferida, las proteínas postsinápticas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP, sus péptidos, fragmentos o derivados;

En otra realización preferida, los biomarcadores identificados distinguen el subtipo de células neurales dañadas, tales como, por ejemplo, mielina-oligodendrocitos, células gliales, microgliales, células de Schwann, cicatriz glial.

30 En una realización preferida, los biomarcadores de mielina-oligodendrocitos son: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina.

40 En otra realización preferida, los biomarcadores que identifican la localización anatómica de lesiones neurales y/o daños neurales incluyen, pero no se limitan a: hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); PH8 (S serotérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca^{2+} mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, y visinina.

45 En otra realización preferida, los biomarcadores que identifican los subtipos neurales dañados incluyen, pero no se limitan a receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores

dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT]), GABA-B-R2.

- 5 Las proteínas de desmielinación identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: proteína básica de mielina (MBP), proteína de proteolípidos de mielina, sus péptidos, fragmentos o derivados.

En otra realización preferida, las proteínas gliales identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI - P04785), sus péptidos, fragmentos o derivados.

En otra realización preferida, las proteínas colinérgicas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa, sus péptidos, fragmentos o derivados.

15 En otra realización preferida, las proteínas dopaminérgicas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32, sus péptidos, fragmentos o derivados.

En otra realización preferida, las proteínas noradrenérgicas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: dopamina beta-hidroxilasa (DbH), sus péptidos, fragmentos o derivados.

20 En otra realización preferida, las proteínas serotoninérgicas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: triptófano hidroxilasa (TrH), sus péptidos, fragmentos o derivados.

En otra realización preferida, las proteínas glutamatérgicas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: glutaminasa, glutamina sintetasa, sus péptidos, fragmentos o derivados.

En otra realización preferida, las proteínas GABAérgicas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: GABA transaminasa (4-aminobutirato-2-cetoglutarato transaminasa [GABAT]), ácido glutámico descarboxilasa (GAD25, 44, 65, 67), sus péptidos, fragmentos o derivados.

30 En otra realización preferida, los receptores de neurotransmisores identificados como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: subtipos de beta-adrenorreceptores, (por ejemplo, beta (2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, (alfa (2c)), receptores de GABA (por ejemplo, GABA(B)), receptor de glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (por ejemplo, GluR4), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7), sus péptidos, fragmentos o derivados.

40 En otra realización preferida, los transportadores de neurotransmisores identificados como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales, preferiblemente son: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de colina (por ejemplo, CHT1), sus péptidos, fragmentos o derivados.

45 En otra realización preferida, otras proteínas identificadas como biomarcadores para el diagnóstico y la detección de lesiones del cerebro y/o SNC o trastornos neurales incluyen, pero no se limitan a vimentina (P31000), CK-BB (P07335), 14-3-3-épsilon (P42655), MMP2, MMP9, sus péptidos, fragmentos o derivados.

Los marcadores se caracterizan por el peso molecular, las huellas de digestión enzimática y sus identidades de proteína conocidas. Los marcadores pueden separarse de otras proteínas en una muestra utilizando una diversidad de técnicas de fraccionamiento, por ejemplo, separación cromatográfica acoplada con espectrometría de masas, o mediante inmunoensayos tradicionales. En realizaciones preferidas, el método de separación implica la espectrometría de masas de desorción/ionización de láser potenciada en la superficie ("SELDI"), en la que la superficie de la sonda de espectrometría de masas comprende adsorbentes que se unen a los marcadores.

55 En otras realizaciones preferidas, se detecta una pluralidad de biomarcadores, preferiblemente se detectan al menos dos de los biomarcadores, más preferiblemente se detectan al menos tres de los biomarcadores, y lo más preferiblemente se detectan al menos cuatro de los biomarcadores.

En un aspecto, la cantidad de cada biomarcador se mide en la muestra sujeto y se determina la proporción de las cantidades entre los marcadores. Preferiblemente, la cantidad de cada biomarcador en la muestra sujeto y la proporción de las cantidades entre los marcadores se comparan con individuos sanos normales. El aumento en la proporción de las cantidades de los biomarcadores entre individuos sanos e individuos que padecen una lesión es indicativa de la magnitud de la lesión y el avance del trastorno, cuando se compara con datos pertinentes desde el punto de vista clínico.

Preferiblemente, los biomarcadores que se detectan en diferentes estadios de lesiones y enfermedad clínica se correlacionan para evaluar la lesión anatómica, el tipo de daños celulares, y la localización subcelular de la lesión. El control de aquellos biomarcadores que se detectan en cada estadio, grado de lesión de una enfermedad o lesión física proporcionará paneles de biomarcadores que proporcionen información específica sobre los mecanismos de lesión, identifican múltiples sitios subcelulares de lesión, identifican múltiples tipos de células implicadas en las lesiones relacionadas con enfermedades, e identifican la localización anatómica de la lesión.

En otro aspecto, preferiblemente se emplea un único biomarcador en combinación con uno o más biomarcadores de individuos sanos normales para diagnosticar una lesión, la localización de una lesión y el avance de una enfermedad y/o lesión neural, más preferiblemente se emplea una pluralidad de marcadores en combinación con uno o más biomarcadores de individuos sanos normales para diagnosticar una lesión, la localización de una lesión y el avance de una enfermedad y/o lesión neural. Se prefiere emplear uno o más biomarcadores de proteínas para comparar los perfiles de proteínas de pacientes susceptibles o que padecen una enfermedad y/o lesión neural, con sujetos normales.

Los métodos de detección preferidos incluyen el uso de una matriz de biochip. Las matrices de biochips útiles en la invención incluyen matrices de proteínas y ácidos nucleicos. Uno o más marcadores se inmovilizan sobre la matriz del biochip y se someten a una ionización de láser para detectar el peso molecular de los marcadores. El análisis de los marcadores se realiza, por ejemplo, mediante el peso molecular de uno o más marcadores frente a un umbral de intensidad que se normaliza frente a la corriente iónica total. Preferiblemente, se emplea una transformación logarítmica para reducir los intervalos de intensidad de los picos para limitar el número de marcadores detectados.

En otro método preferido, se generan datos a partir de muestras sujeto inmovilizadas sobre una matriz de biochip, sometiendo dicha matriz de biochip a una ionización de láser y detectando la intensidad de la señal para la proporción de masa/carga; transformando los datos en una forma de lectura mediante ordenador; y ejecutando un algoritmo que clasifica los datos según los parámetros de entrada del usuario, para detectar señales que representan marcadores presentes en pacientes lesionados y/o enfermos y que carecen de sujetos control no lesionados y/o enfermos.

Preferiblemente, las superficies del biochip son, por ejemplo iónicas, aniónicas, compuestas por iones níquel inmovilizados, compuestas por una mezcla de iones positivos y negativos, compuestas por uno o más anticuerpos, ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios, compuestas por proteínas, péptidos o sus fragmentos, sondas de aminoácidos, o compuestas por bancos de presentación de fagos.

En otros métodos preferidos, se detectan uno o más marcadores utilizando una espectrometría de masas de desorción/ionización de láser que comprende proporcionar una sonda adaptada para su uso con un espectrómetro de masas que comprende un adsorbente unido a él; poner en contacto la muestra sujeto con el adsorbente; y desorber e ionizar el marcador o marcadores de la sonda y detectar los marcadores desionizados/ionizados con el espectrómetro de masas.

Preferiblemente, la espectrometría de masas de desorción/ionización de láser comprende proporcionar un sustrato que comprende un adsorbente unido a él; poner en contacto la muestra sujeto con el adsorbente; colocar el sustrato sobre una sonda adaptada para su uso con un espectrómetro de masas que comprende un adsorbente unido a él; y desorber e ionizar el marcador o marcadores de la sonda y detectar el marcador o marcadores desorbidos/ionizados con el espectrómetro de masas.

El adsorbente puede ser, por ejemplo, hidrófobo, hidrófilo, un adsorbente iónico o de metal quelado, tal como níquel, o un anticuerpo, un oligonucleótido monocatenario o bicatenario, aminoácidos, proteínas, péptidos o sus fragmentos.

Otra realización es un proceso para la purificación de un biomarcador, que comprende fraccionar una muestra que comprende uno o más biomarcadores de proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular, y recoger una fracción que incluye dichos uno o más biomarcadores; y/o fraccionar una muestra que comprende uno o más biomarcadores mediante una cromatografía de intercambio aniónico, y recoger una fracción que incluye dichos uno o más biomarcadores. El fraccionamiento se controla para la pureza sobre una fase normal y matrices de níquel inmovilizado. La generación de los datos sobre las fracciones del marcador inmovilizado sobre una matriz se realiza sometiendo dicha matriz a una ionización de láser y detectando la intensidad de la señal para la proporción de masa/carga; transformando los datos en una forma de lectura mediante ordenador; y ejecutando un algoritmo que clasifica los datos según los parámetros de entrada del usuario, para detectar señales que representan marcadores presentes en pacientes lesionados y/o enfermos y que carecen de sujetos control no lesionados y/o enfermos. Preferiblemente, las fracciones se someten a una electroforesis en gel y se correlacionan con los datos generados

mediante la espectrometría de masas. En un aspecto, las bandas del gel representativas de marcadores potenciales se extirpan y se someten a un tratamiento enzimático y se aplican a matrices de biochips para el cartografiado de péptidos.

5 En otra realización preferida, la presencia de ciertos biomarcadores es indicativa del grado de lesión del SNC y/o del cerebro. Por ejemplo, la detección de uno o más marcadores de daños dendríticos, marcadores de daños en el soma, marcadores de desmielinación, y marcadores de lesiones axonales sería indicativa de lesión en el SNC, y la presencia de uno o más sería indicativa del grado de lesión de los nervios.

10 En otra realización preferida, la presencia de ciertos biomarcadores es indicativa de un trastorno neurológico, es decir, marcadores de daños dendríticos, marcadores de daños en el soma, marcadores de desmielinación, marcadores de lesiones axonales, marcadores de terminales sinápticos, y marcadores postsinápticos.

15 Los métodos preferidos para la detección y el diagnóstico de lesiones del SNC/SNP y/o del cerebro que detectan al menos uno o más biomarcadoras de proteínas en una muestra de un sujeto, y que correlacionan la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión del SNC y/o del cerebro, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de: proteínas neurales, tales como, por ejemplo, proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3- ϵ (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a/-b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-ZZ1; tálamo: epítipo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca^{2+} mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

60 En otra realización preferida, la invención proporciona un kit para analizar los daños celulares en un sujeto. El kit incluye preferiblemente: (a) uno o más biomarcadores; (b) un sustrato para sostener una muestra biológica aislada a partir de un sujeto humano sospechoso de tener una célula nerviosa dañada; (c) un agente que se une específicamente al menos a una o más de las proteínas neurales; y (d) instrucciones impresas para hacer reaccionar el agente con la muestra biológica, o con una porción de la muestra biológica, para detectar la presencia o la

cantidad de al menos un marcador en la muestra biológica. Los biomarcadores incluyen, pero no se limitan a: proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, 5 dinamina-1 (P21575), focéina, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3- ϵ (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina 10 (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz 15 glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo caloso: MBP, MOG, PLP, MAG; 25 médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotonérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: 30 subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina 35 esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotonérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

45 En otra realización preferida, el kit comprende una composición o panel de biomarcadores que comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, 50 tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

Preferiblemente, la muestra biológica es un fluido en comunicación con el sistema nervioso del sujeto antes de ser aislado del sujeto, por ejemplo, CSF (fluido cerebroespinal) o sangre, y el agente puede ser un anticuerpo, aptámero u otra molécula que se une específicamente al menos a una o más de las proteínas neurales. El kit también puede 55 incluir un marcador detectable, tal como como un marcador conjugado al agente, o un marcador conjugado con una sustancia que se une específicamente al agente (por ejemplo, un anticuerpo secundario).

Otros aspectos de la invención se describen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La invención se indica con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Las anteriores y otras ventajas de esta invención pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción, tomada junto con los dibujos 60 adjuntos, en los que:

La figura 1 es una ilustración esquemática que muestra el destino de los biomarcadores de lesiones cerebrales. La vía de génesis de los biomarcadores desde el cerebro hasta la liberación final de dichos biomarcadores hacia biofluidos, tales como CSF, sangre, orina, saliva, sudor, etc., proporciona una oportunidad para la detección de biomarcadores con baja invasividad.

5 La figura 2 es una ilustración esquemática que muestra las fuentes de biomarcadores de lesiones cerebrales de diferentes tipos de células (neuronas, células astrogiales, células microgliales, oligodendrocitos o células de Schwann) y de diferentes estructuras subcelulares de una neurona (dendritas, axones, cuerpo de la célula, terminal presináptico y densidad postsináptica).

10 La figura 3A es una transferencia Western que muestra la detección y la acumulación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 1: proteína neural UCH-L1 en CSF de roedores después de una lesión cerebral traumática experimental en ratas.

15 La figura 3B es una gráfica que muestra la elevación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 1: ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) en CSF de rata 48 h después de una lesión cerebral experimental: craneotomía y lesión cerebral inducida por un impacto cortical controlado (CCI), cuando se compara con CSF de ratas control intactas.

La figura 4A es una transferencia Western que muestra la detección y la acumulación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 2: proteína de unión a microtúbulos neuronal (p24) en CSF de roedores después de una lesión cerebral traumática experimental en ratas.

20 La figura 4B es una gráfica que muestra la elevación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 2: proteína de unión a microtúbulos neuronal (p24) en CSF de ratas 48 h después de una lesión cerebral experimental: craneotomía y lesión cerebral inducida por un impacto cortical controlado (CCI), cuando se compara con CSF de ratas control intactas.

25 La figura 5A es una transferencia Western que muestra la detección y la acumulación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 3: proteína neuronal α -sinucleína en CSF de roedores después de una lesión cerebral traumática experimental en ratas.

La figura 5B es una gráfica que muestra la elevación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 3: proteína neuronal α -sinucleína en CSF de ratas 48 h después de una lesión cerebral experimental: craneotomía y lesión cerebral inducida por un impacto cortical controlado (CCI), cuando se compara con CSF de ratas control intactas.

30 La figura 6A es una transferencia Western que muestra la detección y la acumulación de los niveles del biomarcador neuronal n.º 1 UCH-L1 elevados en CSF humano 24 h después de TBI.

La figura 6B es una gráfica que muestra la elevación de los niveles del biomarcador neuronal n.º 1 UCH-L1 elevados en CSF humano 24 h después de una lesión cerebral traumática, cuando se compara con CSF de controles neurológicos sin lesión cerebral aparente.

35 La figura 7A es una transferencia Western que muestra la detección y la acumulación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 2: proteína de unión a microtúbulos neuronal (p24) en CSF humano después de una lesión cerebral traumática.

La figura 7B es una gráfica que muestra la elevación del nuevo biomarcador neuronal específico de cerebro n.º 2: proteína de unión a microtúbulos neuronal (p24) en CSF humano 24 h después de una lesión cerebral traumática, cuando se compara con CSF de controles neurológicos sin lesión cerebral aparente.

40 La figura 8A son los resultados de un ELISA SW cuantitativo para la sinaptofisina que muestra la detección del nuevo marcador específico del cerebro n.º 4: sinaptofisina en CSF de rata después de una lesión cerebral traumática, cuando se compara con CSF de controles neurológicos sin lesión cerebral aparente.

45 La figura 8B es una gráfica que muestra la elevación del nuevo biomarcador neuronal específico de cerebro n.º 2: proteína de unión a microtúbulos neuronal (p24) en CSF humano 24 h después de una lesión cerebral traumática, cuando se compara con CSF de controles neurológicos sin lesión cerebral aparente.

La figura 9A es una gráfica que muestra la elevación del nuevo marcador específico de cerebro n.º 1: ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1), medida mediante un ELISA de sandwich cuantitativo con muestras de CSF humano y suero de pacientes con lesión cerebral traumática grave.

50 La figura 9B es una gráfica que muestra los cambios temporales medidos mediante un ELISA de sandwich cuantitativo en los niveles de UCH-L1 medidos en el suero de un paciente con TBI grave. Las muestras de suero se tomaron en el momento en que el paciente fue admitido en el hospital (0d), y a las 12 horas (1d), 48 horas (2d), 72 horas (3d), y 120 horas (5d) después del momento de la lesión.

Descripción detallada

5 La presente invención identifica biomarcadores que son diagnósticos de una lesión en las células nerviosas y/o de trastornos neuronales. La detección de diferentes biomarcadores de la invención también es diagnóstica del grado de gravedad de la lesión de los nervios, de la célula o células implicadas en la lesión, y de la localización subcelular de la lesión. En particular, la invención emplea una etapa de correlacionar la presencia o la cantidad de una o más proteínas neurales, con la gravedad y/o el tipo de lesión de las células nerviosas.

10 La cantidad de la proteína neural, su fragmento o derivado, se relaciona directamente con la gravedad de la lesión del tejido nervioso, puesto que una lesión más grave daña a un mayor número de células nerviosas que, a su vez, provoca que se acumule una mayor cantidad de proteína o proteínas neurales en la muestra biológica (por ejemplo, CSF).

Antes de describir la invención, puede resultar útil para su comprensión indicar las definiciones de ciertos términos y expresiones que se emplearán en lo sucesivo en la presente.

15 Un "marcador", en el contexto de la presente invención, se refiere a un polipéptido (con un peso molecular aparente concreto) que está presente diferencialmente en una muestra obtenida de pacientes que tienen lesiones neurales y/o trastornos neuronales, comparado con una muestra comparable obtenida de sujetos control (por ejemplo, una persona con un diagnóstico negativo, un sujeto normal o sano).

"Complementario", en el contexto de la presente invención, se refiere a la detección de al menos dos biomarcadores, que cuando se detectan juntos proporcionan una mayor sensibilidad y especificidad, comparado con la detección de un solo biomarcador.

20 La expresión "presente diferencialmente" se refiere a diferencias en la cantidad y/o la frecuencia de un marcador presente en una muestra obtenida de pacientes que tienen, por ejemplo, una lesión neural, comparado con un sujeto control. Por ejemplo, un marcador puede ser un polipéptido que esté presente a un nivel elevado o a un nivel disminuido en muestras de pacientes con lesión neural, comparado con muestras de sujetos control. Como alternativa, un marcador puede ser un polipéptido que se detecta con una frecuencia mayor o con una frecuencia menor en muestras de pacientes, comparado con muestras de sujetos control. Un marcador puede estar presente diferencialmente en términos de cantidad, frecuencia o ambos.

30 Un polipéptido está presente diferencialmente entre las dos muestras si la cantidad del polipéptido en una muestra es diferente de modo estadísticamente significativo de la cantidad del polipéptido en la otra muestra. Por ejemplo, un polipéptido está presente diferencialmente entre las dos muestras si está presente en al menos aproximadamente 120%, en al menos aproximadamente 130%, en al menos aproximadamente 150%, en al menos aproximadamente 180%, en al menos aproximadamente 200%, en al menos aproximadamente 300%, en al menos aproximadamente 500%, en al menos aproximadamente 700%, en al menos aproximadamente 900%, o en al menos aproximadamente 1000% una cantidad mayor que está presente en la otra muestra, o si es detectable en una muestra y no es detectable en la otra.

35 Como alternativa, o además, un polipéptido está presente diferencialmente entre los dos conjuntos de muestras si la frecuencia de la detección del polipéptido en las muestras de pacientes que padecen una lesión neural y/o trastornos neuronales es mayor o menor, de forma estadísticamente significativa, que en las muestras control. Por ejemplo, un polipéptido está presente diferencialmente entre los dos conjuntos de muestras si se detecta con al menos aproximadamente 120%, con al menos aproximadamente 130%, con al menos aproximadamente 150%, con al menos aproximadamente 180%, con al menos aproximadamente 200%, con al menos aproximadamente 300%, con al menos aproximadamente 500%, con al menos aproximadamente 700%, con al menos aproximadamente 900%, o con al menos aproximadamente 1000% más frecuencia o menos frecuencia observada en un conjunto de muestras que en el otro conjunto de muestras.

45 "Diagnóstico" significa identificar la presencia o la naturaleza de un trastorno patológico. Los métodos diagnósticos se diferencian en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que puntúan como positivos (porcentaje de "positivos verdaderos"). Los individuos enfermos que no son detectados por el ensayo son los "falsos negativos." Los sujetos que no están enfermos y que puntúan como negativos en el ensayo se denominan "negativos verdaderos." La "especificidad" de un ensayo diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, mientras que la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de individuos sin la enfermedad que puntúan como positivos en el ensayo. Aunque un método diagnóstico concreto puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de un trastorno, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

55 Una "cantidad de ensayo" de un marcador se refiere a una cantidad de un marcador presente en una muestra que se está ensayando. Una cantidad de ensayo puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, $\mu\text{g/ml}$) o una cantidad relativa (por ejemplo, la intensidad relativa de señales).

Una "cantidad diagnóstica" de un marcador se refiere a una cantidad de un marcador en la muestra de un sujeto que es coherente con un diagnóstico de una lesión neural y/o trastorno neuronal. Una cantidad diagnóstica puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, µg/ml) o una cantidad relativa (por ejemplo, la intensidad relativa de señales).

5 Una "cantidad control" de un marcador puede ser cualquier cantidad o un intervalo de una cantidad que se va a comparar frente a una cantidad de ensayo de un marcador. Por ejemplo, una cantidad control de un marcador puede ser la cantidad de un marcador en una persona sin lesiones neurales y/o trastorno neuronal. Una cantidad control puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, µg/ml) o una cantidad relativa (por ejemplo, la intensidad relativa de señales).

10 Una "sonda" se refiere a un dispositivo que puede insertarse de forma retirable en un espectrómetro iónico de fase gaseosa y que comprende un sustrato que tiene una superficie para presentar un marcador para su detección. Una sonda puede comprender un único sustrato o una pluralidad de sustratos.

Un "sustrato" o un "sustrato de sonda" se refiere a una fase sólida sobre la cual puede proporcionarse un adsorbente (por ejemplo, mediante unión, depósito, etc.).

15 Un "adsorbente" se refiere a cualquier material capaz de adsorber un marcador. El término "adsorbente" se emplea en la presente para referirse a un único material ("adsorbente monoplex") (por ejemplo, un compuesto o grupo funcional) al cual se expone el marcador, y a una pluralidad de diferentes materiales ("adsorbente múltiplex") a los cuales se expone el marcador. Los materiales adsorbentes en un adsorbente múltiplex se denominan "especies adsorbentes." Por ejemplo, una localización direccionable sobre un sustrato de sonda puede comprender un adsorbente múltiplex caracterizado por muchas especies adsorbentes diferentes (por ejemplo, materiales de intercambio aniónico, quelantes de metales, o anticuerpos) que tienen diferentes características de unión. El propio material de sustrato también puede contribuir a la adsorción del marcador y puede considerarse parte de un "adsorbente."

La "adsorción" o "retención" se refiere a la unión detectable entre un adsorbente y un marcador antes o después de lavar con un eluyente (modificador del umbral de selectividad) o una disolución de lavado.

25 Un "eluyente" o "disolución de lavado" se refiere a un agente que puede utilizarse para mediar en la adsorción de un marcador a un adsorbente. Los eluyentes y las disoluciones de lavado también se denominan "modificadores del umbral de selectividad." Los eluyentes y las disoluciones de lavado pueden utilizarse para lavar y eliminar los materiales no unidos de la superficie del sustrato de sonda.

30 "Resolver," "resolución," o "resolución de un marcador" se refieren a la detección de al menos un marcador en una muestra. La resolución incluye la detección de una pluralidad de marcadores en una muestra mediante separación y posterior detección diferencial. La resolución no requiere la separación completa de uno o más marcadores de todas las demás biomoléculas en una mezcla. Por el contrario, cualquier separación que permita la distinción entre al menos un marcador y otras biomoléculas resulta suficiente.

35 Un "espectrómetro iónico de fase gaseosa" se refiere a un aparato que mide un parámetro que puede traducirse en una proporción de masa a carga de los iones formados cuando una muestra se volatiliza e ioniza. En general, los iones de interés portan una única carga, y las proporciones de masa a carga a menudo se denominan simplemente masa. Los espectrómetros iónicos de fase gaseosa incluyen, por ejemplo, espectrómetros de masas, espectrómetros de movilidad iónica, y dispositivos que miden la corriente iónica total.

40 Un "espectrómetro de masas" se refiere a un espectrómetro iónico de fase gaseosa que incluye un sistema de entrada, una fuente de ionización, un ensamblaje óptico iónico, un analizador de masas y un detector.

Un "espectrómetro de masas de desorción de láser" se refiere a un espectrómetro de masas que emplea un láser para desorber, volatilizar e ionizar un analito.

"Detectar" se refiere a identificar la presencia, la ausencia o la cantidad del objeto que se va a detectar.

45 Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se emplean de modo intercambiable en la presente para indicar un polímero de restos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoácidos son análogos o miméticos de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Los polipéptidos pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de restos carbohidratos para formar glicoproteínas. Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" incluyen glicoproteínas, así como no glicoproteínas.

50 Un "resto detectable" o un "marcador" se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, ³⁵S, tintes fluorescentes, reactivos densos a electrones, enzimas (por ejemplo, como las que se emplean habitualmente en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácidos nucleicos con una secuencia complementaria con una diana. El resto detectable a menudo genera una señal mensurable, tal como una señal radiactiva, cromogénica, o

55

fluorescente, que puede utilizarse para cuantificar la cantidad del resto detectable unido en una muestra. La cuantificación de la señal se logra, por ejemplo, mediante recuento de centelleo, densitometría, o citometría de flujo.

5 Un "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o por genes de inmunoglobulinas, o sus fragmentos, que se une específicamente y reconoce un epitopo (por ejemplo, un antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante de la cadena ligera kappa y lambda, los genes de la región constante de cadena pesada alfa, gamma, delta, épsilon y mu, y la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulinas. Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con diversas peptidasas. Esto incluye, por ejemplo, fragmentos Fab' y F(ab)₂. El término "anticuerpo," tal como se emplea en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados de novo empleando metodologías de ADN recombinante. También incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos monocatenarios. La porción "Fc" de un anticuerpo se refiere a la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de región constante de cadena pesada, CH₁, CH₂ y CH₃, pero no incluye la región variable de cadena pesada.

Un "inmunoensayo" es un ensayo que emplea un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un marcador). El inmunoensayo se caracteriza por el uso de las propiedades de unión específica de un anticuerpo concreto para aislar, dirigirse y/o cuantificar al antígeno.

20 La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "inmunorreacciona específicamente (o selectivamente)," cuando se refiere a una proteína o un péptido, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Así, bajo condiciones de inmunoensayo concretas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína concreta al menos dos veces por encima del fondo, y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo estas condiciones puede requerir seleccionar un anticuerpo por su especificidad por una proteína concreta. Por ejemplos, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales generados contra el marcador NF-200 de especies específicas, tales como rata, ratón o ser humano, para obtener solo los anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con el marcador NF-200 y no con otras proteínas, excepto los variantes polimórficos y alelos del marcador NF-200. Esta selección puede lograrse extrayendo los anticuerpos que presentan reactividad cruzada con moléculas del marcador NF-200 de otra especie. Puede utilizarse una variedad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína concreta. Por ejemplo, de forma habitual se emplean inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos que inmunorreaccionan específicamente con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica). Generalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces mayor que la señal de fondo o ruido, y más generalmente más de 10 a 100 veces mayor que el fondo.

40 Una "molécula absorbente de energía" o "EAM" se refiere a una molécula que absorbe energía de una fuente de ionización en un espectrómetro de masas, ayudando así a la desorción del analito, tal como un marcador, de la superficie de la sonda. Dependiendo del tamaño y la naturaleza del analito, la molécula absorbente de energía puede utilizarse opcionalmente. Las moléculas absorbentes de energía utilizadas en MALDI se denominan con frecuencia una "matriz." Los derivados del ácido cinámico, ácido sinapínico ("SPA"), ácido cianohidroxicinámico ("CHCA") y ácido dihidroxibenzoico se emplean con frecuencia como moléculas absorbentes de energía en la desorción de láser de moléculas bioorgánicas.

45 Una "muestra" se emplea en la presente en su sentido más amplio. Una muestra que comprende polinucleótidos, polipéptidos, péptidos, anticuerpos y similares puede comprender un fluido corporal; una fracción soluble de una preparación de células, o el medio en que se cultivaron las células; un cromosoma, un orgánulo, o una membrana aislada o extraída de una célula; ADN genómico, ARN o ADNc, polipéptidos o péptidos en disolución o unidos a un sustrato; una célula; un tejido; una huella de un tejido; una huella digital, piel o cabello; y similares.

50 "Sustancialmente purificado" se refiere a moléculas de ácidos nucleicos o proteínas que son retiradas de su entorno natural y aisladas o separadas, y están al menos aproximadamente 60% exentas, preferiblemente aproximadamente 75% exentas, y lo más preferiblemente aproximadamente 90% exentas de otros componentes con los que están asociadas en la naturaleza.

55 Un "sustrato" se refiere a cualquier soporte rígido o semirrígido al cual se unen moléculas de ácidos nucleicos o proteínas, e incluye membranas, filtros, chips, portaobjetos, obleas, fibras, o esferas magnéticas o no magnéticas, geles, capilares u otros tubos, placas, polímeros, y micropartículas con una diversidad de formas de la superficie, que incluyen pocillos, zanjas, varillas, canales y poros.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "lesión o lesión neural" pretende incluir un daño que afecta, directa o indirectamente, al funcionamiento normal del SNC. Por ejemplo, la lesión puede ser un daño a las células ganglionares retinianas; una lesión cerebral traumática; una lesión relacionada con un ictus; un lesión relacionada

- 5 con un aneurisma cerebral; un lesión de médula espinal, que incluye monoplejía, diplejía, paraplejía, hemiplejía y cuadriplejía; un trastorno neuroproliferativo o un síndrome de dolor neuropático. Los ejemplos de lesiones o enfermedades del SNC incluyen TBI, ictus, concusión (que incluye síndrome postconcusión), isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas del cerebro, tales como enfermedad de Parkinson, demencia pugilística, enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, lesiones cerebrales secundarias a ataques que son inducidas por radiación, exposición a plasma ionizante o de hierro, agentes nerviosos, cianuro, concentraciones tóxicas de oxígeno, neurotoxicidad debida a malaria del SNC o un tratamiento con agentes antimalaria, tripanosomas, patógenos maláricos, y otros traumatismos del SNC.
- 10 Tal como se emplea en la presente, el término "ictus" se reconoce en la técnica, y pretende incluir la disminución repentina o pérdida de conciencia, sensaciones, y movimiento voluntario provocado por la rotura u obstrucción (por ejemplo, por un coágulo de sangre) de un arteria del cerebro.
- 15 Tal como se emplea en la presente, la expresión "lesión cerebral traumática" se reconoce en la técnica y pretende incluir el trastorno en el que un golpe traumático en la cabeza provoca daños en el cerebro, a menudo sin penetrar en el cráneo. Habitualmente, el traumatismo inicial puede producir un hematoma expansivo, una hemorragia subaracnoide, un edema cerebral, un aumento en la presión intracraneal (ICP), e hipoxia cerebral que, a su vez, puede conducir a graves acontecimientos secundarios debidos a un bajo flujo de sangre cerebral (CBF).
- 20 Las "células neurales", tal como se definen en la presente, son células que residen en el cerebro, los sistemas nervioso central y periférico, que incluyen, pero no se limitan a células nerviosas, células gliales, oligodendrocitos, células microgliales o células precursoras neurales.
- 25 Las "proteínas específicas neuronales o neuronalmente enriquecidas" se definen en la presente como proteínas que están presentes en células neurales y no en células no neuronales, tales como, por ejemplo, cardiomiocitos, miocitos, en el músculo esquelético, hepatocitos, células renales y células en los testículos. Los ejemplos no limitantes de proteínas neurales se muestran en la siguiente tabla I.
- 30 Los "defectos, trastornos o enfermedades neurales (neuronales)", tal como se emplean en la presente, se refieren a cualquier trastorno neurológico, que incluye, pero no se limita a trastornos neurodegenerativos (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer) o trastornos autoinmunológicos (esclerosis múltiple) del sistema nervioso central; pérdida de memoria; trastornos de la memoria a largo plazo y a corto plazo; trastornos del aprendizaje; autismo, depresión, amnesia benigna, trastornos del aprendizaje en la infancia, lesión cerrada en la cabeza, y trastorno de déficit de atención; trastornos autoinmunológicos del cerebro, reacción a una infección vírica; daños cerebrales; depresión; trastorno psiquiátricos, tales como bipolarismo, esquizofrenia y similares; narcolepsia/trastornos del sueño (que incluyen trastornos del ritmo circadiano, insomnio y narcolepsia); corte de nervios o daños en nervios; corte del cordón del nervio cerebroespinal (SNC) y cualquier daño al cerebro o a las células nerviosas; déficits neurológicos asociados con SIDA; tics (por ejemplo, síndrome de Giles de la Tourette); corea de Huntington, esquizofrenia, lesión cerebral traumática, zumbido de oídos, neuralgia, en especial neuralgia del trigémino, dolor neuropático, actividad neuronal inapropiada que produce neurodistesias en enfermedades tales como diabetes, MS y enfermedad de las neuronas motoras, ataxias, rigidez muscular (espasticidad) y disfunción de la articulación temporomandibular; comportamientos de síndrome de deficiencia de recompensa (RDS) en un sujeto.
- 35 Tal como se emplea en la presente, los comportamientos de "RDS" son los comportamientos que manifiestan uno o más trastornos del comportamiento relacionados con la sensación de bienestar de un individuo, con ansiedad, ira o deseo de una sustancia. Los comportamientos de RDS incluyen alcoholismo, SUD, tabaquismo, BMI u obesidad, ludopatía, ingesta excesiva de carbohidratos, diagnóstico de eje 11, SAB, ADD/ADHD, CD, TS, historia familiar de SUD, y obesidad. Todos estos comportamientos y otros descritos en la presente que están asociados con comportamientos de RDS o con genes implicados en las vías neurológicas relacionadas con RDS, se incluyen como comportamientos de RDS como parte de esta invención. Además, muchos de los términos y expresiones clínicas utilizadas en la presente para muchos trastornos específicos que son trastornos de RDS se encuentran en the Quick Reference to the Diagnostic Criteria From DSM-IV™, The American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994.
- 40 Los trastornos afectivos, que incluyen depresión mayor, y la enfermedad bipolar, maníaca-depresiva, se caracterizan por cambios en el estado de ánimo como la manifestación clínica principal. La depresión mayor es la más común de las enfermedades mentales significativas, y debe distinguirse desde el punto de vista clínico de los periodos de pena, tristeza y decepción normales, y la disforia o desmoralización relacionadas que se asocian con frecuencia con una enfermedad médica. La depresión se caracteriza por sentimientos de intensa tristeza y desesperación, enlentecimiento mental y pérdida de concentración, preocupación pesimista, agitación y autodesprecio. También pueden producirse cambios físicos, que incluyen insomnio, anorexia, y pérdida de peso, menor energía y líbido, y alteración de los ritmos circadianos hormonales.
- 45 La manía, así como la depresión, se caracteriza por cambios en el estado de ánimo como síntoma principal. Cualquiera de estos dos extremos de estados de ánimo puede venir acompañado de psicosis, con pensamientos trastornados y percepciones delirantes. La psicosis puede presentar, como síntomas secundarios, un cambio en el estado de ánimo, y este solapamiento con la depresión provoca mucha confusión en el diagnóstico. Con frecuencia aparecen cambios graves del estado de ánimo en la depresión, y a menudo vienen acompañados de ansiedad.

La enfermedad de Parkinson, independiente de una etiología específica, es un trastorno del sistema nervioso central progresivo y crónico que normalmente aparece de forma insidiosa en las últimas décadas de la vida. La enfermedad produce una discapacidad que lentamente va aumentando en el movimiento intencionado. Se caracteriza por las cuatro principales características clínicas de temblores, bradiquinesia, rigidez y una alteración en la postura. A menudo, los pacientes presentan demencia acompañante. En el parkinsonismo idiopático, normalmente se produce una pérdida de células en la sustancia negra, el locus cerúleo, y otras neuronas pigmentadas del cerebro, y una disminución en el contenido en dopamina en los terminales axonales de los nervios de células que se proyectan desde la sustancia negra. La comprensión de que el parkinsonismo es un síndrome de deficiencia en dopamina y el descubrimiento de la levodopa como un fármaco importante para el tratamiento de la enfermedad han sido la culminación lógica de una serie de observaciones clínicas y básicas relacionadas que han servido como base para el tratamiento con fármacos.

Tal como se emplea en la presente, el término "esquizofrenia" se refiere a un trastorno psiquiátrico que incluye al menos dos de los siguientes: delirios, alucinaciones, habla desorganizada, comportamiento catatónico o extremadamente desorganizado, o síntomas negativos (APA, 1994, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4ª edición), Washington, D.C.).

La expresión "enfermedad de Alzheimer" se refiere a un deterioro mental progresivo que se manifiesta por una pérdida de memoria, confusión y desorientación que comienza al final de la mediana edad y generalmente produce la muerte en cinco a diez años. Desde el punto de vista patológico, la enfermedad de Alzheimer puede caracterizarse por el espesamiento, conglutinación y distorsión de las neurofibrillas intracelulares, las madejas neurofibrilares y las placas seniles compuestas por masas argentofílicas granulares o filamentosas con un núcleo amiloide. Los métodos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse los criterios de the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (McKhann et al., 1984, Neurology, 34:939-944). La función cognitiva del paciente puede evaluarse mediante la subescala cognitiva-escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer (ADAS-cog; Rosen et al., 1984, Am. J. Psychiatry, 141:1356-1364).

Tal como se emplea en la presente, el término "autismo" se refiere a un estado de introversión mental que se caracteriza por una autoabsorción mórbida, fracaso social, retraso en el lenguaje y comportamiento estereotipado.

Tal como se emplea en la presente, el término "depresión" se refiere a un síndrome clínico que incluye un estado de ánimo triste persistente o la pérdida de interés en actividades, que dura durante al menos dos semanas en ausencia de tratamiento.

La expresión "amnesia benigna," tal como se emplea en la presente, se refiere a una tendencia suave a ser incapaz de recuperar o recordar información que ya está registrada, aprendida y almacenada en la memoria (por ejemplo, la incapacidad de acordarse de dónde se colocaron las llaves o dónde se aparcó el coche). La amnesia benigna afecta generalmente a individuos mayores de 40 años y puede ser reconocida mediante instrumentos de evaluación convencionales, tales como la escala de memoria de Wechsler (Russell, 1975, J. Consult Clin. Psychol., 43:800-809).

Tal como se emplea en la presente, la expresión "trastornos de aprendizaje en la infancia" se refiere a una capacidad alterada para aprender que presentan ciertos niños.

La expresión "lesión cerrada en la cabeza," tal como se emplea en la presente, se refiere a un trastorno clínico después de un traumatismo o una lesión en la cabeza, pudiéndose caracterizar dicho trastorno por una alteración cognitiva y en la memoria. Este trastorno puede diagnosticarse como "trastorno amnésico debido a un trastorno médico general" según DSM-IV.

La expresión "trastorno de déficit de atención," tal como se emplea en la presente, se refiere a un trastorno que muestran, de modo más habitual, niños, y que puede caracterizarse por una mayor actividad motora y un menor periodo de mantenimiento de la atención. El trastorno de déficit de atención ("attention-deficit disorder", ADD) es un trastorno habitual del comportamiento de aprendizaje en los niños que afecta de modo adverso a su rendimiento escolar y relaciones familiares. Los síntomas y señales incluyen hiperactividad (por ejemplo ADDH y AD/HD, DSM-IV), impulsividad, labilidad emocional, descoordinación motora y algunas dificultades perceptivas. El tratamiento ha incluido psicoestimulantes, que aunque son eficaces resultan controvertidos, y pueden provocar efectos secundarios problemáticos, tales como disforia, dolor de cabeza y retraso en el crecimiento. Otros fármacos, que incluyen los antidepresivos tricíclicos, parecen mejorar la atención, pero pueden ser menos eficaces que los psicoestimulantes.

Tal como se emplea en la presente, una "localización subcelular" se refiere a estructuras subcelulares definidas dentro de una única célula nerviosa. Estas estructuras definidas subcelularmente muestran correspondencia con proteínas neurales exclusivas derivadas, por ejemplo, de localizaciones dendríticas, axonales, de la vaina de mielina, de los terminales presinápticos y postsinápticos, según se ilustra en la figura 2. Mediante el control de la liberación de las proteínas exclusivas de cada una de estas regiones se pueden controlar y definir, por tanto, los daños subcelulares después de una lesión cerebral. Además, las neuronas maduras se diferencian en un subtipo

dedicado mediante la unión de un transmisor neural primario, tal como colinérgico (nicotínico y muscarínico), glutamatérgico, gabaérgico, serotoninérgico, dopaminérgico. Cada uno de estos subtipos neuronales expresa proteínas neurales exclusivas, tales como las dedicadas a la síntesis, el metabolismo y el transportador y el receptor de cada sistema neurotransmisor exclusivo (tabla 1).

- 5 Tal como se emplea en la presente, un componente "farmacéuticamente aceptable" es un componente que es adecuado para su uso con seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) en proporción a una proporción razonable de beneficio/riesgo.

10 Los términos "paciente" o "individuo" se emplean de modo intercambiable en la presente, y significan un sujeto mamífero que se va a tratar, prefiriéndose los pacientes humanos. En algunos casos, los métodos de la invención pueden utilizarse en animales experimentales, en aplicaciones veterinarias, y en el desarrollo de modelos animales para enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a roedores, que incluyen ratones, ratas y hámsters; y primates.

15 Tal como se emplea en la presente, "mejorado" o "tratamiento" se refiere a un síntoma que se acerca a un valor normalizado, por ejemplo es menor que 50% diferente de un valor normalizado, preferiblemente es menor que aproximadamente 25% diferente de un valor normalizado, más preferiblemente es menor que 10% diferente de un valor normalizado, y aún más preferiblemente no es significativamente diferente de un valor normalizado, según se determina utilizando ensayos estadísticos habituales. Por ejemplo, la mejora o el tratamiento de la depresión incluye, por ejemplo, el alivio de los síntomas de la depresión que incluye, pero no se limita a cambios en el estado de ánimo, sentimientos de intensa tristeza y desesperación, enlentecimiento mental, pérdida de concentración, preocupación pesimista, agitación, y autodesprecio. También pueden aliviarse los cambios físicos, que incluyen insomnio, anorexia, y pérdida de peso, menor energía y libido, y la vuelta a los ritmos circadianos hormonales normales. Otro ejemplo, cuando se utilizan las expresiones "tratar la enfermedad de Parkinson" o "mejorar", tal como se emplean en la presente, significa el alivio de los síntomas de la enfermedad de Parkinson que incluye, por no se limita a temblores, bradiquinesia, rigidez y una alteración de la postura.

Biomarcadores de proteínas

25 En una realización preferida, la detección de uno o más biomarcadores neurales es diagnóstica de daños neurales y/o enfermedad neuronal. Los ejemplos de biomarcadores neurales incluyen, pero no se limitan a: proteínas neurales, tales como, por ejemplo, proteínas axonales - NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), NF-68 (NF-L); proteína precursora de amiloides; proteínas dendríticas - alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B, MAP-2C, Tau, dinamina-1 (P21575), dinactina (Q13561), P24; proteínas somáticas - UCH-L1 (Q00981), PEBP (P31044), NSE (P07323), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina; proteínas presinápticas - sinapsina-1, sinapsina-2, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), GAP43, sinaptofisina, sinaptotagmina (P21707), syntaxina; proteínas postsinápticas - PSD95, PSD93, receptor de NMDA (incluyendo todos los subtipos); biomarcadores de desmielinación - proteína básica de mielina (MBP), proteína de proteolípidos de mielina; proteínas gliales - GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI - P04785); biomarcadores de neurotransmisores - biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa; biomarcadores dopaminérgicos - tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos - dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores serotoninérgicos - triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos - glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos - GABA transaminasa (4-aminobutirato-2-cetoglutarato transaminasa [GABAT]), ácido glutámico descarboxilasa (GAD25, 44, 65, 67); receptores de neurotransmisores - subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (por ejemplo, GluR4), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores - transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); otros biomarcadores de proteínas incluyen, pero no se limitan a vimentina (P31000), CK-BB (P07335), 14-3-3-épsilon (P42655), MMP2, MMP9.

50 En otra realización preferida, una composición o panel de biomarcadores comprende: proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), focina, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptotagmina-1 (Q62910), sinaptotagmina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de

kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a/-b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

En otra realización preferida, el panel de biomarcadores comprende al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o trastornos neurales. La composición comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptotagmina-1 (Q62910), sinaptotagmina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

Aunque no se pretende limitación alguna por la teoría, después de una lesión, la integridad estructural y funcional de la membrana celular y la barrera hematoencefálica se ve comprometida. Proteínas específicas del cerebro y proteínas enriquecidas en el cerebro son liberadas hacia el espacio extracelular y después hacia el CSF y la sangre. Esto se muestra en la ilustración esquemática de la figura 1.

En una realización preferida, la detección de al menos una proteína neural en CSF, sangre u otros fluidos biológicos es diagnóstica de la gravedad de una lesión cerebral y/o el control del avance de la terapia. Preferiblemente, las proteínas neurales se detectan durante las etapas tempranas de la lesión. Un aumento en la cantidad de proteínas neurales, sus fragmentos o derivados, en un paciente que padece una lesión neural o una enfermedad neuronal, comparado con un individuo sano normal, será diagnóstico de una lesión neural y/o un trastorno neuronal.

En otra realización preferida, la detección de al menos una proteína neural en CSF, sangre u otros fluidos biológicos, es diagnóstica de la gravedad de una lesión después de una diversidad de agresiones al SNC, tales como, por ejemplo, ictus, lesión de la médula espinal, o neurotoxicidad provocada por el alcohol o el abuso de sustancias (por ejemplo, éxtasis, metanfetamina, etc.).

En una realización preferida, los biomarcadores de una lesión cerebral, una lesión neural y/o trastornos neurales comprenden proteínas del sistema neural (SNC y SNP). El SNC comprende muchas proteínas específicas del cerebro y enriquecidas en el cerebro que son preferiblemente biomarcadores para el diagnóstico de una lesión cerebral, una lesión neural, trastornos neurales y similares. Se muestran ejemplos no limitantes en la tabla 1 y la figura 2. Por ejemplo, los biomarcadores específicos neurales pueden incluir proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), focina, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1,

glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anifisina-1 (NP_001626), anifisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolipidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2. Además, proteínas tales como GFAP y proteína disulfuro isomerasa (PDI) solo se sintetizan en células gliales del SNC, una característica que se emplea para detectar y diagnosticar el grado de daños en el SNC.

En otra realización preferida, la invención proporciona la detección cuantitativa de daños en el SNC, SNP y/o lesiones cerebrales a nivel subcelular. Dependiendo del tipo y la gravedad de la lesión, las neuronas pueden sufrir daños en regiones celulares específicas. Por ejemplo, la detección de ciertos biomarcadores, tales como, por ejemplo, proteínas axonales, sus fragmentos y derivados, incluyen, pero no se limitan a NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), NF-68 (NF-L), y similares, diferencia entre el daño axonal y el dendrítico. Los ejemplos no limitantes de proteínas dendríticas, sus péptidos, fragmentos y derivados incluyen, pero no se limitan a: alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P0 4691), MAP-2A/B, MAP-2C, Tau, dinamina-1 (P21575), dinactina (Q13561), p24 (MAP específica neural). Además, la detección de diferentes biomarcadores no solo diferencia entre, por ejemplo, el daño axonal o dendrítico, sino que también permite la evaluación de una patología sináptica, una lesión específica de elementos del terminal presináptico y la densidad postsináptica. Véase la tabla 1 para ejemplos de biomarcadores de cada localización celular, subcelular y anatómica, cuya detección detecta la localización de la lesión.

En una realización preferida, los biomarcadores indicativos de una lesión neural en diferentes localizaciones anatómicas *in vivo* incluyen, pero no se limitan a: hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG 10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina. Por ejemplo, para determinar una lesión en cierta localización anatómica, la detección de estatmina y/o hipocalcina y/o SCG10 es diagnóstica de lesiones en el hipocampo. La detección de la proteína-2 de células de Purkinje (Pcp2) y/o calbindina D9K y/o calbindina D28K (NP_114190) y/o CaBP cerebelar, mancha 35 es diagnóstica de lesiones en el

cerebelo. La detección de una combinación de biomarcadores, tales como estatmina y/o hipocalcina y/o proteína-2 de células de Purkinje (Pcp2) y/o calbindina D9K y/o calbindina D28K (NP_114190) y/o CaBP cerebelar, mancha 35 es diagnóstica de lesiones en el hipocampo y el cerebelo. Por tanto, la detección de una o más combinaciones de biomarcadores es diagnóstica de la localización de lesiones neurales.

5 En otra realización preferida, la cantidad de marcador detectada, por ejemplo, en µg/ml es diagnóstica del grado del daño o lesión. La cuantificación de cada biomarcador se describe en la memoria descriptiva y en los ejemplos siguientes. Los ensayos incluyen inmunoensayos (tales como ELISA), espectrofotometría, HPLC, SELDI, biochips y similares. Por tanto, por ejemplo, 10 µg/ml de estatmina y 0,001 µg/ml de CaBP son diagnósticos de que la lesión principal se ha producido en el hipocampo, con alguna lesión en el cerebelo. La detección de biomarcadores de localizaciones subcelulares es diagnóstica de las células que están lesionadas. Por ejemplo, la detección de biomarcadores axonales frente a biomarcadores dendríticos frente a biomarcadores microgliales es diagnóstica del tipo de células lesionadas. Tal como se analiza a continuación, la cuantificación de cada uno, comparado con un individuo normal, es diagnóstica del grado de la lesión.

15 En otra realización preferida, la detección de ciertos biomarcadores es diagnóstica del tipo de célula específica afectada después de una lesión, puesto que las neuronas y las células gliales poseen proteínas diferenciadas. Por ejemplo, la detección de proteínas gliales, sus péptidos, fragmentos y derivados, es diagnóstica de daños en las células gliales. Los ejemplos de proteínas gliales incluyen, pero no se limitan a: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta.

20 La capacidad para detectar y controlar los niveles de estas proteínas después de una lesión del SNC proporciona una mayor capacidad diagnóstica permitiendo a los médicos (1) determinar el nivel de gravedad de la lesión en pacientes con diversas lesiones en el SNC, (2) controlar a los pacientes para la aparición de señales de lesiones secundarias en el SNC que puedan provocar estos cambios celulares, y (3) controlar los efectos de la terapia mediante el estudio de estas proteínas en el CSF o la sangre. A diferencia de otras enfermedades con base en órganos, en las que un diagnóstico rápido para detectar biomarcadores sustitutos demuestra ser inestimable para el desarrollo de la acción que ha de realizarse para tratar la enfermedad, no existen estos ensayos de diagnóstico rápidos y definitivos para lesiones cerebrales traumáticas o isquémicas que puedan proporcionar a los médicos marcadores neuroquímicos cuantificables para ayudar a determinar la gravedad de la lesión, la patología anatómica y celular de la lesión, y la puesta en marcha de un tratamiento y gestión médica apropiada.

25 En un ejemplo ilustrativo, que no pretende limitar o interpretar la invención de ninguna manera, la identificación de las proteínas específicas del cerebro y enriquecidas en el cerebro que presentan niveles elevados en el CSF después de una lesión cerebral traumática (TBI) es diagnóstica, por ejemplo, de lesiones cerebrales, del grado de lesión cerebral, del tipo de daños celulares y del grado de los daños celulares. Además, la detección de ciertas proteínas específicas del cerebro y enriquecidas en el cerebro, sus fragmentos y derivados, es diagnóstica del tipo y grado de los daños celulares. Por ejemplo, se han detectado unos niveles mayores de una diversidad de proteínas específicas del cerebro y enriquecidas en el cerebro en el CSF 48 horas después de la lesión. De modo específico, se han detectado unos niveles elevados de la proteína somática ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1), la proteína dendrítica p24, y la α-sinucleína, una proteína presináptica, después de una lesión.

30 En comparación con los productos existentes en la actualidad, la invención proporciona varias ventajas y beneficios mayores. En primer lugar, la identificación de biomarcadores neuronales proporciona un diagnóstico más rápido y barato de la gravedad de lesiones que los dispositivos diagnósticos existentes, tales como la tomografía computerizada (CT) y la formación de imágenes de resonancia magnética (MRI). La invención también permite la detección cuantitativa y la evaluación de alto contenido de daños en el SNC a nivel subcelular (es decir, axonales frente a dendríticos). La invención también permite la identificación del tipo de célula específica afectada (por ejemplo, neuronas frente a células gliales). Además, los niveles de estas proteínas específicas del cerebro y enriquecidas en el cerebro proporciona una información más precisa con respecto al nivel de gravedad de la lesión que la existente en el mercado.

35 En otra realización preferida, los daños en las células nerviosas de un sujeto se analizan (a) proporcionando una muestra biológica aislada a partir de un sujeto sospechoso de presentar una célula nerviosa dañada; (b) detectando en la muestra la presencia o la cantidad de al menos un marcador seleccionado de una o más proteínas neurales; y (c) correlacionando la presencia o la cantidad del marcador con la presencia o el tipo de daño en la célula nerviosa del sujeto. Preferiblemente, las células neurales, tales como las células que residen en los sistemas nerviosos central y periférico, que incluyen células nerviosas, células gliales, oligodendrocitos, células microgliales o células precursoras neurales) en un cultivo *in vitro*, o *in situ* en un sujeto animal, expresan niveles mayores de proteínas neurales (proteínas "específicas neuronales o enriquecidas neuronalmente"; se indican ejemplos en la tabla 1), comparado con células no neuronales, tales como cardiomiocitos, miocitos en el músculo esquelético, hepatocitos, células renales y células en los testículos. Preferiblemente, las muestras comprenden células neurales, por ejemplo, una biopsia de un tejido del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico es una muestra biológica adecuada para su uso en la invención. Además, después de la lesión al sistema nervioso (tal como una lesión cerebral), la membrana de la célula neural se ve comprometida, lo cual conduce a la salida de estas proteínas neurales primero hacia el fluido o espacio extracelular y al fluido cerebroespinal, y por último a la sangre en circulación (favorecido por la barrera hematoencefálica comprometida) y otros biofluidos (por ejemplo, orina, sudor,

saliva, etc.). Así, otras muestras biológicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a estas células o los fluidos segregados desde estas células. La obtención de fluidos biológicos, tales como fluido cerebroespinal, sangre, plasma, suero, saliva y orina, de un sujeto generalmente es mucho menos invasiva y traumática que la obtención de una muestra de biopsia de tejido sólido. Así, se prefieren las muestras que son fluidos biológicos para su uso en la invención. Se prefiere el CSF, en particular, para detectar daños nerviosos en un sujeto, porque está en contacto inmediato con el sistema nervioso y puede obtenerse con facilidad.

En una realización preferida, la detección de daños en células nerviosas comprende la detección de uno o más biomarcadores, que comprenden: proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foveína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-epsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos); proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT]), GABA-B-R2.

En otra realización preferida, la detección de daños neurales comprende la detección de uno o más biomarcadores que comprenden al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o trastornos neurales. La composición o panel de biomarcadores comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

Puede obtenerse una muestra biológica de un sujeto mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, puede obtenerse CSF mediante punción lumbar. Puede obtenerse sangre mediante venipunción, mientras que puede obtenerse plasma y suero mediante el fraccionamiento de sangre completa según métodos conocidos. Las técnicas quirúrgicas para obtener muestras de tejidos sólidos son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describen

métodos para obtener una muestra de tejido del sistema nervioso en textos de neurocirugía convencionales, tales como Atlas of Neurosurgery: Basic Approaches to Cranial and Vascular Procedures, por F. Meyer, Churchill Livingstone, 1999; Stereotactic and Image Directed Surgery of Brain Tumors, 1ª ed., por David G.T. Thomas, WB Saunders Co., 1993; y Cranial Microsurgery: Approaches and Techniques, por L. N. Sekhar y E. De Oliveira, 1ª ed., Thieme Medical Publishing, 1999. Los métodos para obtener y analizar tejido cerebral también se describen en Belay et al., Arch. Neurol., 58:1673-1678 (2001); y Seijo et al., J. Clin. Microbiol., 38:3892-3895 (2000).

Cualquier animal que exprese proteínas neurales, tales como, por ejemplo, las listadas en la tabla 1, puede utilizarse como sujeto a partir del cual se obtiene una muestra biológica. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, primate, rata, ratón y otros vertebrados, tales como peces, aves y reptiles. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Se prefieren particularmente sujetos sospechosos de padecer o en riesgo de desarrollar lesiones del sistema nervioso traumáticas o no traumáticas, tales como víctimas de lesiones cerebrales provocadas por agresiones traumáticas (por ejemplo, heridas de bala, accidentes de automóvil, accidentes deportivos, síndrome del niño sacudido), acontecimientos isquémicos (por ejemplo, ictus, hemorragia cerebral, parada cardíaca), lesiones en la médula espinal, trastornos neurodegenerativos (talse como enfermedad de Alzheimer, Huntington, y Parkinson; enfermedad relacionada con priones; otras formas de demencia, y degeneración de la médula espinal), epilepsia, abuso de sustancias (por ejemplo, anfetaminas, metanfetamina/speed, éxtasis/MDMA, o etanol y cocaína), y patologías del sistema nervioso periférico, tales como neuropatía diabética, neuropatía inducida por quimioterapia, y dolor neuropático, daños en nervios periféricos o atrofia (ALS), esclerosis múltiple (MS).

| Marcadores neuronales subcelulares | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Proteínas axonales | |
| • | α II espectrina (y SPDB)-1 |
| • | NF-68 (NF-L)-2 |
| • | Tau-3 |
| • | β II, III espectrina |
| • | NF-200 (NF-H) |
| • | NF-160 (NF-M) |
| • | proteína precursora de amiloides |
| • | α internexina |

20

| | |
|-----------------------|---|
| Proteínas dendríticas | |
| • | betaIII-tubulina-1 |
| • | p24, proteína asociada a microtúbulos-2 |
| • | alfa-tubulina (P02551) |
| • | beta-tubulina (P04691) |
| • | MAP-2A/B-3 |
| • | MAP-2C-3 |
| • | estatmina-4 |
| • | dinamina-1 (P21575) |
| • | foceína |
| • | dinactina (Q13561) |
| • | vimentina (P31000) |
| • | dinamina |

| Proteínas dendríticas | |
|-----------------------|--------------|
| • | profilina |
| • | cofilina-1,2 |

| Proteínas somáticas | |
|---------------------|---|
| • | UCH-L (Q00981)-1 |
| • | glucógeno fosforilasa-BB-2 |
| • | PEBP (P31044) |
| • | NSE (P07323) |
| • | CK-BB (P07335) |
| • | Thy 1.1 |
| • | proteína priónica |
| • | huntingtina |
| • | proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)) |
| • | SM22- α |
| • | calgranulina AB |
| • | alfa-sinucleína (P37377) |
| • | beta-sinucleína (Q63754) |
| • | HNP 22 |

| Proteínas nucleares neurales | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| • | NeuN-1 |
| • | autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA) |
| • | huntingtina |

| Proteínas presinápticas | |
|-------------------------|--------------------------------|
| • | sinaptofisina-1 |
| • | sinaptotagmina (P21707) |
| • | sinaptojanina-1 (Q62910) |
| • | sinaptojanina-2 |
| • | sinapsina1 (sinapsina-1a) |
| • | sinapsina2 (Q63537) |
| • | sinapsina3 |
| • | GAP43 |
| • | Bassoon (NP_003449) |
| • | Piccolo (aczonina) (NP_149015) |

| Proteínas nucleares neurales | |
|------------------------------|--------------------------|
| • | sintaxina |
| • | CRMP1, 2 |
| • | anfifisina-1 (NP_001626) |
| • | anfifisina-2 (NP_647477) |

| Proteínas postsinápticas | |
|--------------------------|--|
| • | PSD95-1 |
| • | receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2 |
| • | PSD93 |
| • | receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos) |
| • | mGluR (todos los subtipos) |
| • | proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma |
| • | CaMPK-IV |
| • | SNAP-25 |
| • | a-/b-SNAP |

| Biomarcadores del subtipo de célula nerviosa | |
|--|---|
| Mielina-oligodendrocitos | |
| • | proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos |
| • | proteína de proteolípidos de mielina (PLP) |
| • | proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP) |
| • | glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) |
| • | proteínas asociada a mielina (MAG) |
| • | proteína NS-1 de oligodendrocitos |

| Biomarcadores de proteínas gliales | |
|------------------------------------|---|
| • | GFAP (P47819) |
| • | proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785 |
| • | neurocalcina delta |
| • | S100beta |

| Biomarcadores de proteínas microgliales | |
|---|-------|
| • | Iba1 |
| • | OX-42 |

| Biomarcadores de proteínas microgliales | |
|---|---|
| • | OX-8 |
| • | OX-6 |
| • | ED-1 |
| • | PTPasa (CD45) |
| • | CD40; CD68 |
| • | CD11b |
| • | fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1) |
| • | antígeno 5-d-4 |

| Marcadores de células de Schwann | |
|----------------------------------|---|
| • | proteína de mielina de células de Schwann |
| • | cicatriz glial |
| • | tenascina |

| Biomarcadores cerebrales anatómicos (SNC + SNP) | |
|---|-------------|
| Hipocampo | |
| • | estatmina |
| • | hipocalcina |
| • | SCG10 |

| Cerebelo | |
|----------|--|
| • | proteína-2 de células de Purkinje (Pcp2) |
| • | calbindina D9K, |
| • | calbindina D28K (NP_114190) |
| • | CaBP cerebelar, mancha 35 |

| Corteza cerebral | |
|------------------|-----------------------|
| • | cortexina-1, P60606 |
| • | producto génico H-2Z1 |

5

| Tálamo | |
|--------|--|
| • | epitopo CD 15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina) |

| | |
|------------|--|
| Hipotálamo | |
| • | receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito |
| • | orexinas (péptidos específicos del hipotálamo) |

| | |
|---------------|-----|
| Cuerpo caloso | |
| • | MBP |
| • | MOG |
| • | PLP |
| • | MAG |

| | |
|----------------|---|
| Médula espinal | |
| • | proteína de mielina de células de Schwann |

| | |
|-----------------|--|
| Cuerpo estriado | |
| • | estriatina |
| • | Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado) |

| | |
|----------------------|---------|
| Ganglios periféricos | |
| • | Gadd45a |

5

| | |
|---|--|
| Fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras) | |
| • | periferina |
| • | proteína de mielina periférica 22 (AAH91499) |

| | |
|---|---|
| Otras proteínas específicas de neuronas | |
| • | PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico) |
| • | PEP-19, una proteína no específica de neuronas |
| • | neurocalcina (NC) |
| • | una proteína de unión a Ca ²⁺ mano-EF específica de neuronas |
| • | encefalopsina |
| • | estriatina |
| • | SG2NA |
| • | zinedina |
| • | recoverina |

ES 2 482 142 T3

| | |
|---|----------|
| Otras proteínas específicas de neuronas | |
| • | visinina |

| | |
|---|---|
| Subtipos de neuronas basados en transportadores y receptores de neurotransmisores | |
| Receptores de neurotransmisores | |
| • | subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B) |
| • | subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4) |
| • | subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)) |
| • | subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)) |
| • | receptores de GABA (por ejemplo, GABA(B)) |
| • | receptor de glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3) |
| • | receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)) |
| • | receptores de dopamina (por ejemplo, D4) |
| • | receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1) |
| • | receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7) |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Transportadores de neurotransmisores | |
| • | transportador de norepinefrina (NET) |
| • | transportador de dopamina (DAT) |
| • | transportador de serotonina (SERT) |
| • | proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2) |
| • | transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT) |
| • | transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1) |
| • | transportador de acetilcolina vesicular |
| • | transportador de glutamato vesicular I |
| • | [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2 |
| • | transportador de colina (por ejemplo, CHT1) |

| | |
|--|---------------------------------|
| Subtipos de neuronas basadas en el sistema neurotransmisor | |
| Biomarcadores colinérgicos | |
| • | acetilcolina esterasa |
| • | colina acetiltransferasa [ChAT] |
| Biomarcadores dopaminérgicos | |
| • | tirosina hidroxilasa (TH) |
| • | fosfo-TH |

| Subtipos de neuronas basadas en el sistema neurotransmisor | |
|--|---------------------------------|
| Biomarcadores colinérgicos | |
| • | DARPP32 |
| • | Biomarcadores noradrenérgicos |
| • | dopamina beta-hidroxilasa (DbH) |

| | |
|----------------------------|--|
| Biomarcadores adrenérgicos | |
| • | feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) |
| • | Biomarcadores serotoninérgicos |
| • | triptófano hidroxilasa (TrH) |

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Biomarcadores glutamatérgicos | |
| • | glutaminasa |
| • | glutamina sintetasa |

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| Biomarcadores GABAérgicos | |
| • | GABA transaminasa [GABAT] |
| • | GABA-B-R2 |

5 Tal como se describió anteriormente, la invención proporciona la etapa de correlacionar la presencia o la cantidad de una o más proteínas neurales, con la gravedad y/o el tipo de lesión de las células nerviosas. La cantidad de una proteína neural, sus péptidos, fragmentos, derivados o formas modificadas, se relaciona directamente con la gravedad de la lesión del tejido nervioso, puesto que una lesión más grave daña a un mayor número de células nerviosas que, a su vez, provoca que se acumule una mayor cantidad de proteína o proteínas neurales en la muestra biológica (por ejemplo, CSF). Puede determinarse si una lesión de una célula nerviosa activa una muerte celular apoptótica, oncótica (necrótica) o de tipo 2 (autofágica), estudiando las proteínas exclusivas liberadas hacia el biofluido en respuesta a diferentes fenotipos de muerte celular. Las proteínas exclusivas se detectan en los muchos tipos de células que comprenden el sistema nervioso, por ejemplo, células astrogliales, oligodendrocitos, células microgliales, células de Schwann, fibroblastos, neuroblastos, células precursoras neurales y neuronas maduras. Además, las neuronas maduras se diferencian en un subtipo dedicado mediante la unión de un transmisor neural primario, tal como colinérgico (nicotínico y muscarínico), glutamatérgico, gabaérgico, serotoninérgico, dopaminérgico. Cada uno de estos subtipos neuronales expresa proteínas neurales exclusivas, tales como las dedicadas a la síntesis, el metabolismo y el transportador y el receptor de cada sistema neurotransmisor exclusivo (tabla 1). Por último, dentro de una única célula nerviosa, existen estructuras definidas subcelularmente que se corresponden con proteínas neurales exclusivas (dendríticas, axonales, de la vaina de mielina, de terminales presinápticos y de densidad postsináptica). Mediante el control de la liberación de las proteínas exclusivas de cada una de estas regiones se pueden controlar y definir los daños subcelulares después de una lesión cerebral (figura 2).

Los biomarcadores de la invención pueden detectarse en una muestra por cualquier medio. Los métodos para detectar los biomarcadores se describen en detalle en los materiales y métodos y los ejemplos que aparecen a continuación. Por ejemplo, los inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que emplean técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos fluorescentes y similares. Estos ensayos son habituales y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad). A continuación se describen brevemente ejemplos de inmunoensayos (aunque no pretenden ser limitantes).

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis, tal como tampón RIPA (NP-40 al 1% o Triton X-100, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, trasilol al 1%), suplementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de proteasas (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir un anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4 °C, añadir esferas de Sepharose-proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4 °C, lavar las esferas en tampón de lisis, y resuspender las esferas en SDS/tampón de muestra. Puede evaluarse la capacidad del anticuerpo para inmunoprecipitar un antígeno concreto mediante, por ejemplo, un análisis de la transferencia Western. Los expertos en la técnica sabrán los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (por ejemplo, preaclara el lisado celular con esferas de Sepharose). Para un mayor análisis con respecto a los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

Un análisis de la transferencia Western generalmente comprende preparar muestras de proteínas, someter a una electroforesis a las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS al 8%-20%-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), trasladar la muestra de proteína desde el gel de poliacrilamida a una membrana, tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en una disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA al 3% o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con un anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce al anticuerpo primario, por ejemplo, un anti-anticuerpo humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o una molécula radiactiva (por ejemplo, ^{32}P o ^{125}I) diluido en el tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del antígeno. Los expertos en la técnica conocerán los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para un mayor análisis con respecto a los protocolos de la transferencia Western, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

Un ELISA comprende preparar un antígeno (es decir, un biomarcador neural), revestir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En un ELISA, no es necesario que el anticuerpo de interés esté conjugado con un compuesto detectable; por el contrario, puede añadirse al pocillo un anticuerpo secundario (que reconoce al anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, puede revestirse el pocillo con el anticuerpo. En este caso, puede añadirse un anticuerpo secundario conjugado con un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés al pocillo revestido. Los expertos en la técnica conocerán los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para un mayor análisis con respecto a los ELISA, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

Identificación de nuevos marcadores y cuantificación de los marcadores

En una realización preferida, se obtiene una muestra biológica de un paciente con una lesión neural. Se emplean como comparación muestras biológicas que comprenden biomarcadores de otros pacientes y sujetos control (es decir, individuos sanos normales de edad, sexo, y condición física similares). Las muestras biológicas se extraen tal como se analizó anteriormente. Preferiblemente, la muestra se prepara antes de la detección de los biomarcadores. Generalmente, la preparación implica el fraccionamiento de la muestra y la recolección de las fracciones que se ha determinado que contienen los biomarcadores. Los métodos de prefraccionamiento incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de heparina, cromatografía de afinidad, extracción secuencial, electroforesis en gel y cromatografía líquida. Los analitos también pueden modificarse antes de la detección. Estos métodos son útiles para simplificar la muestra para su posterior análisis. Por ejemplo, puede resultar útil eliminar proteínas muy abundantes, tales como la albúmina, de la sangre antes del análisis.

En una realización, una muestra puede prefraccionarse según el tamaño de las proteínas en una muestra utilizando cromatografía de exclusión molecular. Para una muestra biológica en la que la cantidad de muestra disponible es pequeña, se emplea preferiblemente una columna de centrifugación de selección de tamaño. En general, la primera fracción que se eluye de la columna ("fracción 1") tiene el mayor porcentaje de proteínas de alto peso molecular; la fracción 2 tiene un porcentaje menor 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 cantidad menor de proteínas grandes; etc. Cada fracción después puede analizarse mediante inmunoensayos, espectrometría iónica en fase gaseosa y similares, para la detección de marcadores.

En otra realización, una muestra puede prefraccionarse mediante una cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio aniónico permite el prefraccionamiento de las proteínas en una muestra en líneas generales según sus características de carga. Por ejemplo, puede utilizarse una resina de intercambio aniónico Q

(por ejemplo, Q HyperD F, Biosepra), y una muestra puede eluirse secuencialmente con eluyentes que tengan diferentes pH. Una cromatografía de intercambio aniónico permite la separación de biomarcadores en una muestra que tienen una carga más negativa de los otros tipos de biomarcadores. Las proteínas que se eluyen con un eluyente que tiene un pH alto es probable que tengan una carga débilmente negativa, y una fracción que eluye con un eluyente con un pH bajo es probable que tenga una fuerte carga negativa. Así, además de reducir la complejidad de una muestra, la cromatografía de intercambio aniónico separa a las proteínas según sus características de unión.

En otra realización, una muestra puede prefraccionarse mediante una cromatografía de heparina. La cromatografía de heparina permite el prefraccionamiento de los marcadores en una muestra basándose también en la interacción de afinidad con la heparina y las características de carga. La heparina, un mucopolisacárido sulfatado, se une a marcadores con restos con carga positiva, y una muestra puede eluirse secuencialmente después con eluyentes que tengan diferentes pH o concentraciones salinas. Los marcadores eluidos con un eluyente que tiene un pH bajo es más probable que tengan una carga débilmente positiva. Los marcadores eluidos con un eluyente que tiene un pH alto es más probable que tengan una carga positiva fuerte. Así, la cromatografía de heparina también reduce la complejidad de una muestra y separa a los marcadores según sus características de unión.

En otra realización, una muestra puede prefraccionarse aislando proteínas que tengan una característica específica, por ejemplo, están glicosiladas. Por ejemplo, una muestra de CSF puede fraccionarse haciendo pasar la muestra a través de una columna de cromatografía de lectina (que tiene una alta afinidad por azúcares). Las proteínas glicosiladas se unirán a la columna de lectina, y las proteínas no glicosiladas pasarán a través de ella en el flujo. Las proteínas glicosiladas después se eluyen de la columna de lectina con un eluyente que contenga un azúcar, por ejemplo N-acetilglucosamina, y están disponibles para su posterior análisis.

Así, existen muchas formas para reducir la complejidad de una muestra basándose en las propiedades de unión de las proteínas en la muestra, o las características de las proteínas en la muestra.

En otra realización, 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 a un primer adsorbente para extraer ciertas proteínas, y se recoge un eluyente que contiene las proteínas no adsorbentes (es decir, las proteínas que no se unen al primer adsorbente). Después, la fracción se expone a un segundo adsorbente. Este extrae aún más diversas proteínas de la fracción. Esta segunda fracción se expone después a un tercer adsorbente, etc.

Puede utilizarse cualquier material y método adecuado para realizar la extracción secuencial de una muestra. Por ejemplo, puede utilizarse una serie de columnas de centrifugación que comprenden diferentes adsorbentes. En otro ejemplo, pueden utilizarse pocillos múltiples que comprenden diferentes adsorbentes en el fondo. En otro ejemplo, puede realizarse una extracción secuencial sobre una sonda adaptada para su uso en un espectrómetro iónico de fase gaseosa, en la que la superficie de la sonda comprende adsorbentes para unir biomarcadores. En esta realización, la muestra se aplica a un primer adsorbente sobre la sonda, que después se lava con un eluyente. Los marcadores que no se unen al primer adsorbente se retiran con un eluyente. Los marcadores que están en la fracción pueden aplicarse a un segundo adsorbente sobre la sonda, etc. La ventaja de realizar una extracción secuencial sobre una sonda de un espectrómetro iónico de fase gaseosa es que los marcadores que se unen a diversos adsorbentes en cada etapa del protocolo de extracción diferencial pueden analizarse directamente utilizando un espectrómetro iónico de fase gaseosa.

En otra realización, los biomarcadores en una muestra pueden separarse mediante una electroforesis de alta resolución, por ejemplo, una electroforesis en gel uni- o bidimensional. Puede aislarse una fracción que contiene un marcador y después analizarse mediante una espectrometría iónica en fase gaseosa. Preferiblemente se emplea una electroforesis en gel bidimensional para generar una matriz bidimensional de manchas de biomarcadores, que incluye uno o más marcadores. Véase, por ejemplo, Jungblut y Thiede, *Mass Spectr. Rev.*, 16:145-162 (1997).

La electroforesis en gel bidimensional puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Deutscher ed., *Methods In Enzymology*, vol. 182. Generalmente, los biomarcadores en una muestra se separan, por ejemplo, mediante enfoque isoeléctrico, durante el cual los biomarcadores en una muestra se separan en un gradiente de pH hasta que alcanzan una mancha en la que su carga neta es cero (es decir, el punto isoeléctrico). Esta primera etapa de separación da como resultado una matriz unidimensional de biomarcadores. Los biomarcadores en una matriz unidimensional se separan después utilizando una técnica en general distinta de la utilizada en la primera etapa de separación. Por ejemplo, en la segunda dimensión, los biomarcadores separados mediante enfoque isoeléctrico se separarán después utilizando un gel de poliacrilamida, tal como una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel de SDS-PAGE permite otra separación basada en la masa molecular de los biomarcadores. Generalmente, una electroforesis en gel bidimensional puede separar biomarcadores químicamente diferentes en el intervalo de masa molecular de 1000-200.000 Da dentro de mezclas complejas.

Los biomarcadores en la matriz bidimensional pueden detectarse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, los biomarcadores en un gel pueden marcarse o tñirse (por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o con plata). Si la electroforesis en gel genera manchas que se corresponden con el peso molecular de

uno o más marcadores de la invención, la mancha puede analizarse después mediante análisis densitométricos o espectrometría iónica en fase gaseosa. Por ejemplo, las manchas pueden extirparse del gel y analizarse mediante espectrometría iónica en fase gaseosa. Como alternativa, el gel que contiene los biomarcadores puede trasladarse a una membrana inerte aplicando un campo eléctrico. Después, una mancha sobre la membrana que se corresponda aproximadamente con el peso molecular de un marcador puede analizarse mediante espectrometría iónica en fase gaseosa. En la espectrometría iónica en fase gaseosa, las manchas pueden analizarse utilizando cualquier técnica adecuada, tal como MALDI o SELDI.

Antes del análisis mediante espectrometría iónica en fase gaseosa, puede resultar deseable cortar los biomarcadores en la mancha en fragmentos más pequeños utilizando reactivos de rotura, tales como proteasas (por ejemplo, tripsina). La digestión de los biomarcadores en fragmentos pequeños proporciona una huella de masas de los biomarcadores en la mancha, que puede utilizarse para determinar la identidad de los marcadores si se desea.

En otra realización, puede utilizarse una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar una mezcla de biomarcadores en una muestra basándose en sus diferentes propiedades físicas, tales como polaridad, carga y tamaño. Los instrumentos de HPLC generalmente consisten en un depósito de una fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación, y un detector. Los biomarcadores en una muestra se separan inyectando una parte alícuota de la muestra en la columna. Diferentes biomarcadores en la mezcla atraviesan la columna a diferentes velocidades debido a diferencias en su comportamiento de reparto entre la fase líquida móvil y la fase estacionaria. Puede recogerse la fracción que se corresponde con el peso molecular y/o las propiedades físicas de uno o más marcadores. La fracción después puede analizarse mediante espectrometría iónica en fase gaseosa para detectar marcadores.

Opcionalmente, un marcador puede modificarse antes del análisis para mejorar su resolución o para determinar su identidad. Por ejemplo, los marcadores pueden someterse a una digestión proteolítica antes del análisis. Puede utilizarse cualquier proteasa. Las proteasas, tales como tripsina, que es probable que rompan los marcadores en un número discreto de fragmentos son particularmente útiles. Los fragmentos que resultan de la digestión actúan como huella para los marcadores, permitiendo con ello su detección indirecta. Esto resulta particularmente útil cuando existen marcadores con masas moleculares similares que puedan ser confundidos con el marcador en cuestión. Además, la fragmentación proteolítica es útil para marcadores de alto peso molecular, porque los marcadores más pequeños son resueltos con más facilidad por una espectrometría de masas. En otro ejemplo, los biomarcadores pueden modificarse para mejorar la resolución de la detección. Por ejemplo, puede utilizarse la neuraminidasa para eliminar los restos ácido siálico terminales de las glicoproteínas para mejorar la unión a un adsorbente aniónico y para mejorar la resolución de la detección. En otro ejemplo, los marcadores pueden modificarse mediante la unión de un marcador con un peso molecular concreto que se une específicamente a marcadores moleculares, lo cual hace que también se distingan. Opcionalmente, después de detectar dichos marcadores modificados, puede determinarse posteriormente la identidad de los marcadores mediante la correlación de las características físicas y químicas de los marcadores modificados con una base de datos de proteínas (por ejemplo, SwissProt).

Después de la preparación, los biomarcadores en una muestra generalmente se capturan sobre un sustrato para su detección. Los sustratos tradicionales incluyen placas de 96 pocillos revestidas con anticuerpos o membranas de nitrocelulosa que después se sondan para detectar la presencia de proteínas. Preferiblemente, los biomarcadores se identifican utilizando inmunoensayos, según se describió anteriormente. Sin embargo, los métodos preferidos también incluyen el uso de biochips. Preferiblemente, los biochips son biochips de proteínas para la captura y la detección de proteínas. En la técnica se describen muchos biochips de proteínas. Estos incluyen, por ejemplo, biochips de proteínas producidos por Packard BioScience Company (Meriden CT), Zyomyx (Hayward, CA) y Phyllos (Lexington, MA). En general, los biochips de proteínas comprenden un sustrato que tiene una superficie. Un reactivo de captura o adsorbente se une a la superficie del sustrato. Con frecuencia, la superficie comprende una pluralidad de localizaciones direccionables, cada una de las cuales tiene unido un reactivo de captura. El reactivo de captura puede ser una molécula biológica, tal como un polipéptido o un ácido nucleico, que captura otros biomarcadores de una manera específica. Como alternativa, el reactivo de captura puede ser un material cromatográfico, tal como un material de intercambio aniónico o un material hidrófilo. Los ejemplos de estos biochips de proteínas se describen en las siguientes patentes o solicitudes de patente: patente de EEUU 6.225.047 (Hutchens y Yip, "Uso de una cromatografía de retención para generar mapas de diferencia," 1 de mayo, 2001), publicación internacional WO 99/51773 (Kuimelis y Wagner, "Matrices de proteínas direccionables," 14 de octubre, 1999), publicación internacional WO 00/04389 (Wagner et al., "Matrices de agentes de captura de proteínas y métodos para su uso," 27 de julio, 2000), publicación internacional WO 00/56934 (Englert et al., "Matrices porosas continuas," 28 de septiembre, 2000).

En general, una muestra que contiene los biomarcadores se coloca sobre la superficie activa de un biochip durante un tiempo suficiente para permitir la unión. Después, las moléculas no unidas se lavan de la superficie utilizando un eluyente adecuado. En general, cuanto más riguroso sea el eluyente, con más fuerza deben unirse las proteínas para ser retenidas después del lavado. Los biomarcadores de proteínas retenidos ya pueden ser detectados por medios apropiados.

Los analitos capturados sobre la superficie de un biochip de proteínas pueden detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, espectrometría de masas, fluorescencia, resonancia de plasmón de superficie, elipsometría y microscopía de fuerzas atómicas. La espectrometría de masas y, en particular, la

espectrometría de masas SELDI, es un método particularmente útil para la detección de biomarcadores de esta invención.

Preferiblemente, se emplea un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de desorción de láser en las realizaciones de la invención. En la espectrometría de masas de desorción de láser, se introduce un sustrato o una sonda que comprende marcadores en un sistema de entrada. Los marcadores se desorben e ionizan en la fase gaseosa mediante un láser desde la fuente de ionización. Los iones generados se recogen mediante un ensamblaje óptico iónico y después, en un analizador de masas de tiempo de vuelo, los iones se aceleran a través de un campo de alto voltaje corto y se dejan dispersar en una cámara a alto vacío. En el extremo más alejado de la cámara de alto vacío, los iones acelerados impactan contra una superficie detectora sensible en momentos diferentes. Puesto que el tiempo de vuelo es una función de la masa de los iones, el tiempo que pasa entre la formación de los iones y el impacto del detector de iones puede utilizarse para identificar la presencia o la ausencia de marcadores con una proporción específica de masa a carga.

La espectrometría de masas de desorción/ionización de láser asistida por matriz, o MALDI-MS, es un método de espectrometría de masas que implica el uso de una molécula absorbente de energía, que se denomina con frecuencia matriz, para desorber proteínas intactas desde la superficie de una sonda. La MALDI se describe, por ejemplo, en la patente de EEUU 5.118.937 (Hillenkamp et al.) y la patente de EEUU 5.045.694 (Beavis y Chait). En MALDI-MS, la muestra generalmente se mezcla con un material de matriz y se coloca sobre la superficie de una sonda inerte. Los ejemplos de moléculas absorbentes de energía incluyen derivados del ácido cinámico, ácido sinapínico ("SPA"), ácido cianohidroxicinámico ("CHCA") y ácido dihidroxibenzoico. Otras moléculas absorbentes de energía adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica. La matriz se seca, formando cristales que encapsulan las moléculas de analito. Después, las moléculas de analito son detectadas mediante una espectrometría de masas de desorción/ionización de láser. La MALDI-MS es útil para detectar los biomarcadores de esta invención si la complejidad de una muestra ha sido sustancialmente reducida empleando los métodos de preparación descritos anteriormente.

La espectrometría de masas de desorción/ionización de láser potenciada por una superficie, o SELDI-MS, representa una mejora frente a MALDI para el fraccionamiento y la detección de biomoléculas, tales como proteínas, en mezclas complejas. La SELDI es un método de espectrometría de masas en el que biomoléculas, tales como proteínas, son capturadas sobre la superficie de un biochip de proteínas empleando reactivos de captura que están unidos a él. Generalmente, las moléculas no unidas son lavadas de la superficie de la sonda antes del examen. La SELDI se describe, por ejemplo, en: patente de EEUU 5.719.060 ("Método y aparato para la desorción y la ionización de analitos," Hutchens y Yip, 17 de febrero, 1998), patente de EEUU 6.225.047 ("Uso de una cromatografía de retención para generar mapas de diferencias," Hutchens y Yip, 1 de mayo, 2001), y Weinberger et al., "Espectrometría de masas de tiempo de vuelo," en Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers, ed., pp. 11915-11918, John Wiley & Sons, Chichester, 2000.

Los marcadores sobre la superficie del sustrato puede desorberse e ionizarse utilizando una espectrometría iónica en fase gaseosa. Puede utilizarse cualquier espectrómetro iónico de fase gaseosa adecuado, con la condición de que permita resolver marcadores sobre el sustrato. Preferiblemente, los espectrómetros iónicos de fase gaseosa permiten la cuantificación de marcadores.

En una realización, un espectrómetro iónico de fase gaseosa es un espectrómetro de masas. En un espectrómetro de masas típico, se introduce un sustrato o una sonda que comprende marcadores sobre su superficie, en un sistema de entrada del espectrómetro de masas. Los marcadores después son desorbidos por una fuente de desorción, tal como un láser, bombardeo de átomos rápidos, plasma de alta energía, ionización de electronebulización, ionización de termonebulización, MS iónica secundaria líquida, desorción de campo, etc. La especie volatilizada desorbida generada consiste en compuestos neutros o iones preformados que son ionizados como consecuencia directa del acontecimiento de desorción. Los iones generados son recogidos por un ensamblaje óptico iónico, y después 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 detector después traduce la información de los iones detectados en proporciones de masas a carga. La detección de la presencia de marcadores u otras sustancias implica generalmente la detección de la intensidad de 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 masas, un detector, etc.) puede combinarse con otros componentes adecuados descritos en la presente, u otros conocidos en la técnica en las realizaciones de la invención.

En otra realización, puede utilizarse un inmunoensayo para detectar y analizar marcadores en una muestra. Este método comprende: (a) proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a un marcador; (b) poner en contacto una muestra 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 sus secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos para marcadores pueden obtenerse caracterizando más a fondo estos marcadores. Por ejemplo, cada marcador puede someterse a un cartografiado de péptidos con una serie de enzimas (por ejemplo, tripsina, proteasa V8, etc.). Los pesos

moleculares de los fragmentos de la digestión de cada marcador pueden utilizarse para realizar una búsqueda en bases de datos, tales como la base de datos SwissProt, para descubrir secuencias que se correspondan con los pesos moleculares de los fragmentos de la digestión generados por diversas enzimas. Utilizando este método, las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de otros marcadores pueden identificarse si estos marcadores son proteínas conocidas en las bases de datos.

Como alternativa, las proteínas pueden secuenciarse utilizando la secuenciación de escalera de proteínas. Las escaleras de proteínas pueden generarse, por ejemplo, fragmentando las moléculas y sometiendo los fragmentos a una digestión enzimática u otros métodos que eliminen secuencialmente un único aminoácido del extremo del fragmento. Los métodos para preparar escaleras de proteínas se describen, por ejemplo, en la publicación internacional WO 93/24834 (Chait et al.) y la patente de EEUU 5.792.664 (Chait et al.). La escalera después es analizada mediante una espectrometría de masas. La diferencia en las masas de los fragmentos de la escalera identifican al aminoácido retirado del extremo de la molécula.

Si los marcadores no son proteínas conocidas en las bases de datos, pueden determinarse las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos conociendo tan solo una porción de la secuencia de aminoácidos del marcador. Por ejemplo, pueden prepararse sondas degeneradas basadas en la secuencia de aminoácidos N-terminal del marcador. Estas sondas después se pueden utilizar para seleccionar un banco genómico o de ADNc creado a partir de una muestra en la que se detectó inicialmente un marcador. Los clones positivos pueden identificarse, amplificarse, y sus secuencias de ADN recombinante pueden subclonarse utilizando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, *Current Protocols for Molecular Biology* (Ausubel et al., Green Publishing Assoc. and 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 sus secuencias de ácidos nucleicos, pueden prepararse anticuerpos que se unen específicamente con un marcador utilizando cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y 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 incluyen, pero no se limitan a la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos a partir de bancos de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)).

Después de proporcionar el anticuerpo, un marcador puede detectarse y/o cuantificarse utilizando cualquiera de los ensayos de unión inmunológica adecuados conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EEUU n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo de enzimas (EIA), tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de la transferencia Western, o un ensayo de transferencia de ranuras. 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 y Terr, eds., 7ª ed., 1991); y Harlow y Lane, *supra*. La detección y la cuantificación de biomarcadores se describe en detalle en los ejemplos siguientes.

En general, una muestra obtenida de un sujeto puede ponerse en contacto con el anticuerpo que se une específicamente al marcador. Opcionalmente, el anticuerpo puede fijarse a un soporte sólido para facilitar el lavado y el posterior aislamiento del complejo, antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio o plástico en forma, por ejemplo, de una placa de microtitulación, una varilla, una esfera o una microesfera. Los anticuerpos también pueden unirse a un sustrato de sonda o una matriz ProteinChip® descrita anteriormente. La muestra preferiblemente es una muestra de un fluido biológico obtenida de un sujeto. Los ejemplos de muestras de fluidos biológicos incluyen fluido cerebroespinal, sangre, suero, plasma, células neuronales, tejidos, orina, lágrimas, saliva etc. En una realización preferida, el fluido biológico comprende fluido cerebroespinal. La muestra puede diluirse con un eluyente adecuado antes de poner en contacto la muestra con el anticuerpo.

Después de incubar la muestra con anticuerpos, la mezcla se lava y puede detectarse el complejo de anticuerpo-marcador formado. Esto puede lograrse incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. Este reactivo de detección puede ser, por ejemplo, un anticuerpo secundario que está marcado con un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen esferas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), tintes fluorescentes, radiomarcadores, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras que se emplean habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal o vidrio coloreado o esferas de plástico. Como alternativa, el marcador en la muestra puede detectarse utilizando un ensayo indirecto, en el que, por ejemplo, se emplea un segundo anticuerpo marcado para detectar el anticuerpo específico de marcador unido y/o un ensayo de competición o inhibición, en el que, por ejemplo, se incuba un anticuerpo monoclonal que se une a un epitopo diferenciado del marcador, simultáneamente con la mezcla.

A lo largo de los ensayos, pueden ser necesarias unas etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación

dependerá del formato del ensayo, el marcador, el volumen de la disolución, las concentraciones y similares. Normalmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse en un intervalo de temperaturas, tal como de 10 °C a 40 °C.

5 Pueden utilizarse inmunoensayos para determinar la presencia o la ausencia de un marcador en una muestra, así como la cantidad de un marcador en una muestra. En primer lugar, puede detectarse una cantidad de ensayo de un marcador en una muestra utilizando los métodos de inmunoensayo descritos anteriormente. Si un marcador está presente en la muestra, este formará un complejo de anticuerpo-marcador con un anticuerpo que se une específicamente al marcador bajo las condiciones de incubación adecuadas descritas anteriormente. La cantidad de un complejo de anticuerpo-marcador puede determinarse mediante la comparación con un patrón. Un patrón puede ser, por ejemplo, un compuesto conocido u otra proteína que se sabe que está presente en una muestra. Tal como se indicó anteriormente, no es necesario medir la cantidad de ensayo del marcador en unidades absolutas, siempre que la unidad de medición pueda compararse con un control.

15 Los métodos para detectar estos marcadores en una muestra pueden tener muchas aplicaciones. Por ejemplo, uno o más marcadores pueden medirse para ayudar en el diagnóstico de una lesión espinal, una lesión cerebral, el grado de la lesión, una lesión neural debida a trastornos neuronales, abuso de alcohol y fármacos, lesión fetal debida al abuso de alcohol y/o fármacos por parte de la embarazada, etc. En otro ejemplo, los métodos para la detección de los marcadores pueden utilizarse para controlar las respuestas de un sujeto a un tratamiento. En otro ejemplo, los métodos para detectar marcadores pueden utilizarse para ensayar e identificar compuestos que modulan la expresión de estos marcadores *in vivo* o *in vitro*.

20 Los datos generados por la desorción y la detección de marcadores pueden analizarse utilizando cualquier medio adecuado. En una realización, los datos se analizan mediante el uso de un ordenador digital programable. El programa del ordenador generalmente contiene un medio que puede leerse que almacena códigos. Ciertos códigos pueden estar dedicados a la memoria, que incluye la localización de cada característica en una sonda, la identidad del adsorbente en esta característica, y las condiciones de elución utilizadas para lavar el adsorbente. El ordenador también contiene códigos que reciben, como entrada, los datos sobre la potencia de la señal a diversas masas moleculares recibidos desde una localización direccionable concreta sobre la sonda. Estos datos pueden indicar el número de marcadores detectados, incluyendo la potencia de la señal generada por cada marcador.

25 El análisis de los datos puede incluir las etapas de determinar la potencia de la señal (por ejemplo, la altura de los picos) de un marcador detectado y eliminar los "valores atípicos" (los datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada). Los picos observados pueden normalizarse, un proceso mediante el cual se calcula la altura de cada pico con relación a 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 ajusta a cero en la escala. Después, la potencia 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 patrón (por ejemplo, una proteína de CSF) con la muestra de modo que puede utilizarse un pico del patrón como referencia para calcular las intensidades relativas de las señales observadas para cada marcador u otros marcadores detectados.

30 El ordenador puede transformar los datos resultantes en diversos formatos para ser mostrados. En un formato, denominado "vista del espectro o mapa de retención," puede mostrarse una vista espectral del patrón, en el que la vista muestra la cantidad de marcador que alcanza al detector en cada peso molecular concreto. En otro formato, denominado "mapa de picos," solo se mantiene la altura de los picos y la información de masas de la vista del espectro, que produce una imagen más limpia y permite visualizar con más facilidad los marcadores con pesos moleculares casi idénticos. En otro formato, denominado "vista del gel," cada masa de la vista de los picos puede convertirse en una imagen en escala de grises basada en la altura de cada pico, dando como resultado un aspecto similar a bandas sobre geles electroforéticos. En otro formato, denominado "de capas tridimensionales," varios espectros pueden superponerse para estudiar los cambios sutiles en las alturas relativas de los picos. En otro formato, denominado "vista del mapa de diferencias," dos o más espectros pueden compararse, destacando de modo conveniente los marcadores exclusivos y los marcadores que están sobre- o infrarregulados entre las muestras. Los perfiles de los marcadores (espectros) de cualquier par de muestras pueden compararse de modo visual. En otro formato, puede utilizarse una gráfica de dispersión de Spotfire, en la que los marcadores detectados se representan gráficamente como un punto en una gráfica, en la que un eje de la gráfica representa la masa molecular aparente de los marcadores detectados, y el otro eje representa la intensidad de señal de los marcadores detectados. Para cada muestra, los marcadores que se detectan y la cantidad de marcadores presentes en la muestra pueden guardarse en un medio de lectura por ordenador. Estos datos después pueden compararse con un control (por ejemplo, un perfil o cantidad de marcadores detectados en un control, por ejemplo, sujetos sanos normales sin lesión neural detectable).

Diagnóstico de una lesión neural

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para ayudar al diagnóstico de una lesión neural y/o trastornos neurales humanos utilizando uno o más marcadores, por ejemplo, las proteínas identificadas en la tabla 1, sus péptidos, fragmentos o derivados. Estos marcadores pueden utilizarse de modo individual o en combinación con

otros marcadores en cualquiera de los conjuntos, por ejemplo, axonal y dendrítico. Los marcadores están presentes diferencialmente en muestras de un paciente humano, por ejemplo, un paciente con TBI, y un sujeto normal sin lesiones neurales detectables. Por ejemplo, algunos de estos marcadores son expresados a un nivel elevado y/o están presentes con mayor frecuencia en pacientes humanos con lesión neural y/o trastornos neuronales que en sujetos normales. Por tanto, la detección de uno o más de estos marcadores en una persona proporcionará información útil con respecto a la probabilidad de que esa persona presente una lesión neural y/o un trastorno neuronal.

Las enfermedades del sistema nervioso, los trastornos neuronales y/o las afecciones que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse con las composiciones de la invención (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y/o agonistas o antagonistas) incluyen, pero no se limitan a lesiones del sistema nervioso, y enfermedades, trastornos y/o afecciones que producen una desconexión de los axones, una disminución o degeneración de las neuronas, o una desmielinación. Las lesiones del sistema nervioso que pueden tratarse, prevenirse y/o diagnosticarse en un paciente (que incluye pacientes mamíferos humanos y no humanos) según la invención incluyen, pero no se limitan a las siguientes lesiones del sistema nervioso central (que incluye la médula espinal y el cerebro) o periférico: (1) lesiones isquémicas, en las que una falta de oxígeno en una porción del sistema nervioso produce lesiones neuronales o muerte, incluyendo infarto cerebral o isquemia, o infarto o isquemia de la médula espinal; (2) lesiones traumáticas, que incluyen lesiones provocadas por lesiones físicas o asociadas con cirugía, por ejemplo, lesiones que cortan una porción del sistema nervioso, o lesiones por compresión; (3) lesiones malignas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada por un tejido maligno que es una malignidad asociada con el sistema nervioso o una malignidad derivada de un tejido no perteneciente al sistema nervioso; (4) lesiones infecciosas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada como consecuencia de una infección, por ejemplo un absceso, o está asociada con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, herpes zoster, o virus del herpes simplex o con la enfermedad de Lyme, tuberculosis, sífilis; (5) lesiones degenerativas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada como consecuencia de un proceso degenerativo que incluye, pero no se limita a la degeneración asociada con la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, o esclerosis lateral amiotrófica (ALS); (6) lesiones asociadas con enfermedades, trastornos y/o afecciones nutricionales, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada por un trastorno nutricional o un trastorno del metabolismo que incluye, pero no se limita a una deficiencia en la vitamina B12, una deficiencia en ácido fólico, la enfermedad de Wernicke, ambliopía por tabaco-alcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso), y degeneración cerebelar alcohólica; (7) lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas que incluyen, pero no se limitan a diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus eritematoso sistémico, carcinoma, o sarcoidosis; (8) lesiones provocadas por sustancias tóxicas que incluyen el alcohol, plomo, o neurotoxinas concretas; y (9) lesiones desmielinizadas en las que una porción del sistema nervioso es destruida o lesionada por una enfermedad desmielinizante que incluye, pero no se limita a esclerosis múltiple, mielopatía asociada con el virus de la inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa o diversas etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva, y mielínolisis pontina central.

Por consiguiente, las realizaciones de la invención incluyen métodos para ayudar en lesiones neural y/o trastornos neuronales humanos, comprendiendo dichos métodos: (a) detectar al menos un marcador en una muestra, en el que el marcador se selecciona de cualquiera de los marcadores listados en la tabla 1, sus péptidos, fragmentos y derivados; y (b) correlacionar la detección del marcador o marcadores con un diagnóstico probable de una lesión neural y/o trastorno neuronal humanos. La correlación puede tomar en cuenta la cantidad del marcador o marcadores en la muestra comparado con una cantidad control del marcador o marcadores (sobre- o infrarregulación del marcador o marcadores) (por ejemplo, en sujetos normales sin lesión neural humana detectable). La correlación puede tomar en cuenta la presencia o la ausencia de los marcadores en una muestra de ensayo y la frecuencia de detección de los mismos marcadores en un control. La correlación puede tomar en cuenta ambos factores para facilitar la determinación de si el sujeto presenta una lesión neural, el grado de gravedad de la lesión neural, y la localización subcelular de la lesión, o la ausencia de estas circunstancias.

En una realización preferida, el método para diagnosticar y detectar una lesión neural y/o trastornos neuronales comprende detectar uno o más de estos biomarcadores: proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-epsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neuronales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-1a), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de

5 proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epítipo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo calloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VMAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

30 En otra realización preferida, el método para diagnosticar y detectar una lesión neural y/o trastornos neurales comprende detectar al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o trastornos neurales. La composición comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptotagmina-1 (Q62910), sinaptotagmina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

40 Puede obtenerse cualquier muestra adecuada de un sujeto para detectar marcadores. Preferiblemente, una muestra es una muestra de fluido cerebroespinal obtenida del sujeto. Si se desea, la muestra puede prepararse como se describió anteriormente para potenciar la detectabilidad de los marcadores. Por ejemplo, para aumentar la detectabilidad de los marcadores, una muestra de suero sanguíneo del sujeto puede preferiblemente fraccionarse, por ejemplo, mediante una cromatografía de agarosa de azul de Cibacron y una cromatografía de afinidad de ADN monocatenario, una cromatografía de intercambio aniónico y similares. Las preparaciones de la muestra, tales como los protocolos de prefractionamiento, son opcionales y pueden no ser necesarias para potenciar la detectabilidad de los marcadores, dependiendo de los métodos de detección utilizados. Por ejemplo, la preparación de la muestra puede ser innecesaria si se emplean anticuerpos que se unen específicamente con los marcadores, para detectar la presencia de marcadores en una muestra.

50 Puede utilizarse cualquier método adecuado para detectar un marcador o marcadores en una muestra. Por ejemplo, puede emplearse un inmunoensayo o una espectrometría iónica de fase gaseosa, tal como se describió anteriormente. Utilizando estos métodos, pueden detectarse uno o más marcadores. Preferiblemente, una muestra se ensaya para detectar la presencia de una pluralidad de marcadores. La detección de la presencia de una pluralidad de marcadores, en lugar de un único marcador, proporciona más información para el diagnosticador. De modo específico, la detección de una pluralidad de marcadores en una muestra aumenta el porcentaje de diagnósticos positivos verdaderos y negativos verdaderos, y disminuye el porcentaje de diagnósticos falsos positivos o falsos negativos.

60 La detección del marcador o marcadores después se correlaciona con un diagnóstico probable de una lesión neural y/o trastornos neuronales. En algunas realizaciones, la detección de la mera presencia o ausencia de un marcador, sin cuantificar la cantidad del marcador, es útil y puede correlacionarse con un diagnóstico probable de lesión neural y/o trastornos neuronales. Por ejemplo, pueden detectarse con más frecuencia proteínas neurales, sus fragmentos o derivados, tales como, por ejemplo, las proteínas axonales NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), NF-68 (NF-L), en pacientes con lesión neuronal que en sujetos normales.

En otras realizaciones, la detección de marcadores puede implicar cuantificar los marcadores para correlacionar la detección de los marcadores con un diagnóstico probable de lesión neural, el grado de gravedad de la lesión neural, el diagnóstico de trastornos neurales y similares. Así, si la cantidad de los marcadores detectada en un sujeto que se está ensayando es mayor, comparado con una cantidad control, entonces el sujeto que se está ensayando tiene mayor probabilidad de presentar dichas lesiones y/o trastornos neurales.

De modo similar, en otra realización, la detección de marcadores también puede implicar cuantificar los marcadores para correlacionar la detección de los marcadores con un diagnóstico probable de lesión neural, el grado de gravedad de la lesión neural, el diagnóstico de trastornos neurales y similares, en la que los marcadores están presentes en cantidades menores en muestras de CSF o suero sanguíneo que en muestras de suero sanguíneo de sujetos normales. Así, si la cantidad de los marcadores detectada en un sujeto que se está ensayando es menor, comparado con una cantidad control, entonces el sujeto que se está ensayando tiene mayor probabilidad de presentar una lesión neural y/o un trastorno neural.

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 sujetos normales sin lesión neural y/o trastornos neurales detectables. La cantidad control se mide bajo las mismas condiciones experimentales, o unas condiciones sustancialmente similares, que las utilizadas en la medición de la cantidad de ensayo. Por ejemplo, si una muestra de ensayo se obtiene del fluido cerebroespinal de un sujeto y/o de una muestra de suero sanguíneo, y un marcador se detecta utilizando una sonda concreta, entonces una cantidad control del marcador se determina preferiblemente a partir de una muestra de suero de un paciente utilizando la misma sonda. Se prefiere que la cantidad control del marcador se determine basándose en un número significativo de muestras procedentes de sujetos normales que no tengan una lesión neural y/o trastornos neuronales, de forma que refleje las variaciones de las cantidades de marcador en esta población.

Los datos generados mediante una espectrometría de masas después pueden analizarse con un programa informático. El programa puede comprender códigos que convierten la señal del espectrómetro de masas en una forma de lectura por ordenador. El programa también puede incluir códigos que aplican un algoritmo al análisis de la señal para determinar si la señal representa un "pico" en la señal correspondiente a un marcador de esta invención u otros marcadores útiles. El programa también puede incluir un código que ejecute un algoritmo que compare la señal de una muestra de ensayo con una señal típica característica de una lesión neural humana y "normal", y determine la cercanía de ajuste entre las dos señales. El programa también puede incluir un código que indique cuál es la muestra más cercana, proporcionando con ello un diagnóstico probable.

Producción de anticuerpos para detectar biomarcadores neurales

Los biomarcadores neurales obtenidos a partir de muestras de pacientes que padecen diversas lesiones neurales, grados de gravedad de la lesión, trastornos neuronales y similares, pueden prepararse como se describió anteriormente. Además, los biomarcadores neurales pueden someterse a una digestión enzimática para obtener fragmentos o péptidos de los biomarcadores para la producción de anticuerpos contra diferentes epitopos antigénicos que puedan estar presentes en un péptido frente a la proteína completa. Los epitopos antigénicos son útiles, por ejemplo, para generar anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente al epitopo. Los epitopos antigénicos pueden utilizarse como moléculas diana en inmunoensayos (véase, por ejemplo, Wilson et al., Cell, 37:767-778 (1984); Sutcliffe et al., Science, 219:660-666 (1983)).

En una realización preferida, los anticuerpos se dirigen a epitopos (a los que se unen específicamente) de biomarcadores de proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-1a), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a/-b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606),

producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo caloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhés (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): 5 periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), 10 transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: 15 feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

En otra realización preferida, los anticuerpos de la invención se unen al menos a un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o 25 trastornos neurales. La composición comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptotagmina-1 (Q62910), sinaptotagmina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC). 30

Los epitopos de biomarcadores neurales pueden utilizarse, por ejemplo, para inducir anticuerpos según métodos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sutcliffe et al., *supra*; Wilson et al., *supra*; Chow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:910-914; y Bittle et al., J. Gen. Virol., 66:2347-2354 (1985)). Pueden presentarse polipéptidos 35 neurales que comprenden uno o más epitopos inmunogénicos para inducir una respuesta de anticuerpos junto con una proteína portadora, tal como albúmina, a un sistema animal (tal como un conejo o ratón) o, si el polipéptido tiene una longitud suficiente (al menos aproximadamente 25 aminoácidos), el polipéptido puede presentarse sin un portador. Sin embargo, se ha demostrado que epitopos inmunogénicos que comprenden tan solo 3 a 10 aminoácidos son suficientes para generar anticuerpos capaces de unirse, como mínimo, a epitopos lineales en un polipéptido desnaturalizado (por ejemplo, en un ensayo de la transferencia Western). 40

Los polipéptidos que portan epitopos de la presente invención pueden utilizarse para inducir anticuerpos según métodos muy conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a una inmunización *in vivo*, una inmunización *in vitro*, y métodos de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Sutcliffe et al., *supra*; Wilson et al., *supra*; y Bittle et al., J. Gen. Virol., 66:2347-2354 (1985). Si se emplea una inmunización *in vivo*, los animales pueden inmunizarse 45 con un péptido libre; sin embargo, la titulación de anticuerpos antipéptido puede reforzarse acoplado el péptido a un portador macromolecular, tal como hemacianina de lapa (KLH) o toxoide del tétanos. Por ejemplo, los péptidos que contienen restos cisteínas pueden acoplarse a un portador utilizando un conector, tal como maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a portadores utilizando un agente conector más general, tal como glutaraldehído. Animales tales como conejos, ratas y ratones son inmunizados con péptidos libres o acoplados a un portador, por ejemplo, mediante una inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 μ g de péptido o proteína vehículo y adyuvante de Freund o cualquier otro adyuvante conocido por estimular una respuesta inmunológica. Pueden ser necesarias varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar una titulación útil de anticuerpo antipéptido que pueda detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo ELISA utilizando el 50 péptido libre adsorbido sobre una superficie sólida.

La titulación de anticuerpos antipéptido en el suero de un animal inmunizado puede aumentar mediante la selección de anticuerpos antipéptido, por ejemplo, mediante la adsorción del péptido a un soporte sólido y la elución de los anticuerpos seleccionados según métodos muy conocidos en la técnica.

Los ácidos nucleicos de epitopos de biomarcadores neurales también pueden recombinarse con un gen de interés, tal como un marcador de epitopo (por ejemplo, el marcador de hemaglutinina ("HA") o el marcador flag) para ayudar a la detección y la purificación del polipéptido expresado. Por ejemplo, el sistema descrito por Janknecht et al. permite una purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas de células humanas 60

(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 modo que el marco de lectura abierto del gen se condensa traduccionalmente con un marcador amino-terminal que consiste en seis restos histidina. El marcador actúa como dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Extractos de células infectadas con el virus de vaccinia recombinante se cargan en una columna de agarosa-ácido nitriloacético Ni²⁺ y las proteínas marcadas con histidina pueden eluirse selectivamente con tampones que contienen imidazol.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la técnica (Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede administrarse a diversos animales hospedantes que incluyen, pero no se limitan a conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de suero que contiene los anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración de los polipéptidos de la presente invención puede suponer una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedante, e incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Estos adyuvantes también son muy conocidos en la técnica. Para los fines de la invención, un "agente inmunizante" puede definirse como un polipéptido de la invención, que incluye sus fragmentos, variantes y/o derivados, además de fusiones con polipéptidos heterólogos y otras formas de polipéptidos tal como se describen en la presente.

Generalmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, aunque también puede administrarse por vía intramuscular y/o IV. El agente inmunizante puede incluir polipéptidos de la presente invención o una de sus proteínas de fusión o variantes. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, porcentaje de hidrofobicidad, porcentaje de hidrofiliidad, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), puede resultar útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Esta conjugación incluye una conjugación química derivatizando grupos funcionales químicos activos en el polipéptido de la presente invención y la proteína inmunogénica de modo que se forma un enlace covalente, o mediante una metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de estas proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedante, e incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Otros ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por los expertos en la técnica sin experimentación indebida.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden comprender anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), y la patente de EEUU n.º 4.376.110, por Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988), por Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., (1981)), u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma de células B humanas (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 pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de altas titulaciones de mAb *in vivo* hace que este sea el método de producción preferido.

En un método de hibridoma, un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunológico humano, un hámster, u otro animal hospedante apropiado generalmente se inmuniza con un agente inmunizante para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente con el agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante generalmente incluirá polipéptidos neurales, sus fragmentos o una proteína de fusión de este. En general, se emplean linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se emplean células del bazo o células de nódulos linfáticos si se desean una fuente de mamífero no humano. Los linfocitos después se fusionan con células inmortalizadas utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas generalmente son células de mamífero transformadas, en

particular células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Generalmente se emplean líneas de células de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas inmortalizadas. Por ejemplo, si las células de origen carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), puesto que dichas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas de células inmortalizadas preferidas son las que se fusionan de forma eficaz, mantienen un nivel de expresión alto estable del anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Las líneas de células inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo en the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., y the American Type Culture Collection, Manassas, Va. Tal como se infiere a lo largo de la memoria descriptiva, también se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano 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).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma después puede ensayarse para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos neurales de la invención. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Estas técnicas son conocidas en la técnica y están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollart, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este objetivo incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco y RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como fluido de ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatito, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los expertos en la técnica sabrán que existe una diversidad de métodos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales y, por tanto, la invención no se limita a su exclusiva producción en hibridomas. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EEUU n.º 4.816.567. En este contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un único clon eucariota, de fago o procarriota. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse con facilidad utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadena pesada y ligera de anticuerpos murinos, o a este tipo de cadenas de origen humano, humanizado o de otro origen). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de este tipo de ADN. Después de haberse aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transforman en células hospedantes, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteínas de inmunoglobulinas, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes.

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos utilizando la tecnología del hibridoma se emplean habitualmente y son conocidas en la técnica. En un ejemplo no limitante, pueden inmunizarse ratones con un biomarcador polipeptídico o una célula que exprese dicho péptido. Tras haber detectado una respuesta inmunológica, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos del antígeno en el suero de ratón, el bazo del ratón se extrae y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos después se fusionan mediante técnicas conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible en ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitante. Los clones de hibridoma después se ensayan mediante métodos conocidos en la técnica para detectar células que segregan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. Puede generarse fluido de ascitis, que en general contiene niveles altos de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales, así como anticuerpos producidos mediante el método de cultivar una célula de hibridoma que segrega un anticuerpo de la invención, en los que, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención, con células de mieloma, y después seleccionando los hibridomas que resultan de la fusión para detectar los clones de hibridoma que segregan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Los anticuerpos que detectan biomarcadores neurales, sus péptidos y derivados, pueden

utilizarse en inmunoensayos y otros métodos para identificar nuevos biomarcadores neurales y para su uso en el diagnóstico de lesiones neurales, el grado de gravedad de la lesión y/o trastornos neurológicos.

También pueden utilizarse otros métodos para la producción a gran escala de anticuerpos específicos de biomarcadores neurales. Por ejemplo, también pueden generarse anticuerpos utilizando diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales sobre la superficie de las partículas de fagos que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En una realización concreta, estos fagos pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un banco de anticuerpos combinatorio o repertorio (por ejemplo humano o murino). Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo empleando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o esfera. Los fagos utilizados en estos métodos generalmente son fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión fd y M13 expresados a partir de un fago con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro condensados con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que pueden utilizarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos 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 n.º 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 las patentes de EEUU n.º 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; cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos de la presente invención tienen diversas utilidades. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico para detectar la presencia o la cuantificación de los polipéptidos de la invención en una muestra. Este ensayo de diagnóstico puede comprender al menos dos etapas. La primera consiste en someter una muestra al anticuerpo, en la que la muestra es un tejido (por ejemplo, humano, animal, etc.), un fluido biológico (por ejemplo, sangre, orina, esputo, semen, fluido amniótico, saliva, etc.), un extracto biológico (por ejemplo, un homogeneizado celular o de tejido, etc.), un microchip de proteínas (por ejemplo, véase, Arenkov P., et al., Anal Biochem., 278(2):123-131 (2000)), o una columna de cromatografía, etc. La segunda etapa implica la cuantificación del anticuerpo unido al sustrato. Como alternativa, el método también puede implicar una primera etapa de unir el anticuerpo, de modo covalente, electrostático, o reversible, a un soporte sólido, y una segunda etapa de someter el anticuerpo unido a la muestra, según se definió anteriormente y en otros puntos de la presente.

En la técnica se conocen diversas técnicas de ensayo de diagnóstico, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sandwich directos o indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación realizados 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 de diagnóstico pueden estar marcados con un resto detectable. El resto detectable debe ser capaz de producir, de modo directo o indirecto, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^2H , ^{14}C , ^{32}P , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, proteína fluorescente verde, o peroxidasa de rábano. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo con el resto detectable, que incluyen los métodos descritos en Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochem., 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Methods, 40:219 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982).

Kits

En otro aspecto, la invención proporciona kits para ayudar al diagnóstico de lesiones neurales, grado de gravedad de la lesión, localización subcelular y/o trastornos neuronales, en los que los kits pueden utilizarse para detectar los marcadores de la presente invención. Por ejemplo, los kits pueden utilizarse para detectar cualquiera o más de los marcadores descritos en la presente, estando dichos marcadores diferencialmente presentes en muestras de un paciente y de sujetos normales. Los kits de la invención tienen muchas aplicaciones. Por ejemplo, los kits pueden utilizarse para diferenciar si un sujeto presenta una lesión axonal, por ejemplo frente a una lesión dendrítica, o si tiene un diagnóstico negativo, ayudando así al diagnóstico de lesiones neuronales. En otro ejemplo, los kits pueden utilizarse para identificar compuestos que modulan la expresión de uno o más de los marcadores en modelos animales *in vitro* o *in vivo* para determinar los efectos de un tratamiento.

En una realización, un kit comprende (a) un anticuerpo que se une específicamente a un marcador; y (b) un reactivo de detección. Estos kits pueden prepararse a partir de los materiales descritos anteriormente, y el análisis previo con respecto a los materiales (por ejemplo, anticuerpos, reactivos de detección, soportes inmovilizados, etc.) es completamente aplicable a esta sección y no se repetirá. Opcionalmente, el kit también puede comprender columnas de centrifugación de prefraccionamiento. En algunas realizaciones, el kit también puede comprender instrucciones para los parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o una inserción separada.

En otra realización preferida, el kit comprende (a) un panel o una composición biomarcadores, y (b) un agente detector. El panel o la composición de biomarcadores incluido en un kit incluye al menos un biomarcador y/o una

pluralidad de biomarcadores para diagnosticar la localización *in vivo* de una lesión neural. Estos biomarcadores incluyen: proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foveína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo caloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

En otra realización preferida, el panel de biomarcadores en un kit comprende al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o trastornos neurales. La composición comprende: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

En otra realización preferida, los anticuerpos en un kit son específicos para un panel de biomarcadores y pueden utilizarse uno o más anticuerpos. Los anticuerpos son específicos para los biomarcadores : proteínas axonales: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foveína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (por ejemplo, 14-3-3-épsilon (P42655)), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43,

Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), sintaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP; mielina-oligodendrocitos: proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos; biomarcadores de proteínas gliales: GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta; biomarcadores de proteínas microgliales: Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; marcadores de células de Schwann: proteína de mielina de células de Schwann; cicatriz glial: tenascina; hipocampo: estatmina, hipocalcina, SCG10; cerebelo: proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; corteza cerebral: cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; tálamo: epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); hipotálamo: receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo); cuerpo caloso: MBP, MOG, PLP, MAG; médula espinal: proteína de mielina de células de Schwann; cuerpo estriado: estriatina, Rhes (homólogo de Ras enriquecido en el cuerpo estriado); ganglios periféricos: Gadd45a; fibras de nervios periféricos (sensoriales + motoras): periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499); otras proteínas específicas de neuronas: PH8 (S serotoninérgico dopaminérgico), PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina; receptores de neurotransmisores: subunidades del receptor de NMDA (por ejemplo, NR1A2B), subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato (por ejemplo, GluR1, GluR4), subtipos de beta-adrenorreceptores (por ejemplo, beta(2)), subtipos de alfa-adrenorreceptores (por ejemplo, alfa(2c)), receptores de GABA (por ejemplo GABA(B)), receptor del glutamato metabotrópico (por ejemplo, mGluR3), receptores de serotonina 5-HT (por ejemplo, 5-HT(3)), receptores de dopamina (por ejemplo, D4), receptores Ach muscarínicos (por ejemplo, M1), receptor de acetilcolina nicotínico (por ejemplo, alfa-7); transportadores de neurotransmisores: transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato (por ejemplo, GLT1), transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina (por ejemplo, CHT1); biomarcadores colinérgicos: acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT]; biomarcadores dopaminérgicos: tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; biomarcadores noradrenérgicos: dopamina beta-hidroxilasa (DbH); biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT); biomarcadores serotoninérgicos: triptófano hidroxilasa (TrH); biomarcadores glutamatérgicos: glutaminasa, glutamina sintetasa; biomarcadores GABAérgicos: GABA transaminasa [GABAT], GABA-B-R2.

En otra realización preferida, los anticuerpos son específicos para al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural. La composición de los biomarcadores es diagnóstica de lesiones neurales, daños neurales y/o trastornos neurales. Los anticuerpos se unen a: α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

En otra realización, la invención incluye un kit diagnóstico para su uso para seleccionar suero que contiene antígenos de los polipéptidos de la invención. El kit diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado que es específicamente inmunorreactivo con antígenos de polipéptidos o polinucleótidos, y un medio para detectar la unión del antígeno del polinucleótido o polipéptido al anticuerpo. En una realización, el anticuerpo está unido a un soporte sólido. En una 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 además, el medio de detección puede incluir un antígeno competitivo marcador.

En una configuración diagnóstica, el suero de ensayo se hace reaccionar con un reactivo en fase sólida que tiene un antígeno unido a la superficie obtenido mediante los métodos de la presente invención. Después de unir el anticuerpo específico de antígeno al reactivo y de retirar los componentes del suero no unidos mediante un lavado, el reactivo se hace reaccionar con un anti-anticuerpo humano marcado con un indicador para unir el indicador al reactivo en proporción a la cantidad de anticuerpo anti-antígeno unido sobre el soporte sólido. El reactivo de nuevo se lava para eliminar el anticuerpo marcado no unido, y se determina la cantidad del indicador asociado con el reactivo. Generalmente, el indicador es una enzima que se detecta incubando la fase sólida en presencia de un sustrato fluorométrico, luminiscente o colorimétrico adecuado (Sigma, St. Louis, Mo.).

El reactivo de la superficie sólida del anterior ensayo se prepara mediante técnicas conocidas para unir un material de proteína a un material de soporte sólido, tales como esferas poliméricas, varillas de inmersión, una placa de 96 pocillos, o un material de filtro. Estos métodos de unión generalmente incluyen la adsorción no específica de la proteína al soporte o la unión covalente de la proteína, generalmente a través de un grupo amina libre, con un grupo químicamente reactivo sobre el soporte sólido, tal como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activado. Como alternativa, pueden utilizarse placas revestidas con estreptavidina junto con un antígeno o antígenos biotinilados.

Opcionalmente, el kit también puede comprender información de un patrón o control de modo que la muestra de ensayo pueda compararse con la información del patrón o control para determinar si la cantidad de ensayo de un marcador detectado en una muestra es una cantidad diagnóstica coherente con un diagnóstico de lesión neural, el grado de gravedad de la lesión, la localización subcelular, un trastorno neuronal y/o el efecto de un tratamiento sobre el paciente.

En otra realización, un kit comprende: (a) un sustrato que comprende un adsorbente sobre él, en el que el adsorbente es adecuado para la unión a un marcador, y (b) instrucciones para detectar el marcador o marcadores poniendo en contacto una muestra con el adsorbente y detectando el marcador o marcadores retenidos por el adsorbente. En algunas realizaciones, el kit puede comprender un eluyente (como alternativa o en combinación con instrucciones) o instrucciones para fabricar un eluyente, en el que la combinación del adsorbentes y el eluyente permite la detección de los marcadores utilizando una espectrometría iónica en fase gaseosa. Estos kits pueden prepararse a partir de los materiales descritos anteriormente, y el análisis previo con respecto a los materiales (por ejemplo, sustratos de sonda, adsorbentes, disoluciones de lavado, etc.) es completamente aplicable a esta sección y no se repetirá.

En otra realización, el kit puede comprender un primer sustrato que comprende 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 que puede insertarse de forma retirable en un espectrómetro iónico de fase gaseosa. En otras realizaciones, el kit puede comprender un único sustrato que está en forma de una sonda insertable de forma retirable, con adsorbentes sobre el sustrato. En otra realización, el kit también puede comprender una columna de centrifugación de prefraccionamiento (por ejemplo, una columna de agarosa de azul de Cibacron, una columna de agarosa anti-HSA, una columna de exclusión molecular, una columna de centrifugación de intercambio aniónico-Q, una columna de ADN monocatenario, una columna de lectina, etc.).

Opcionalmente, el kit también puede comprender instrucciones para los parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o una inserción separada. Por ejemplo, el kit puede contener instrucciones convencionales que informen al consumidor acerca de cómo lavar la sonda después de que una muestra se haya puesto en contacto con la sonda. En otro ejemplo, el kit puede contener instrucciones para prefraccionar una muestra para reducir la complejidad de las proteínas en la muestra. En otro ejemplo, el kit puede contener instrucciones para automatizar el fraccionamiento u otros procesos.

La invención se dirige en particular a los siguientes aspectos (1) a (73):

(1) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de:

proteínas axonales, proteínas precursoras de amiloides, proteína dendríticas, proteínas somáticas, proteínas presinápticas, proteínas postsinápticas, biomarcadores de desmielinación, proteínas gliales, biomarcadores de neurotransmisores, proteínas dopaminérgicas, proteínas noradrenérgicas, proteínas serotonérgicas, proteínas glutamatérgica, proteínas GABAérgicas, receptores de neurotransmisores, transportadores de neurotransmisores, vimentina (P31000), CK-BB (P07335), 14-3-3-épsilon (P42655), MMP2, MMP9, y;

correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(2) El método del aspecto (1), en el que las proteínas axonales se seleccionan de α II espectrina, SPDB-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, y α internexina.

(3) El método del aspecto (1), en el que las proteínas dendríticas se seleccionan de beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, y cofilina-1,2.

(4) El método del aspecto (1), en el que las proteínas somáticas se seleccionan de UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3, SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), y HNP 22.

(5) El método del aspecto (1), en el que las proteínas presinápticas se seleccionan de sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRIMP1, 2, anfifisina-1 (NP_001626), y anfifisina-2 (NP_647477).

- (6) El método del aspecto (1), en el que las proteínas postsinápticas se seleccionan de SD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA (todos los subtipos), mGluR (todos los subtipos), proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, y a/b-SNAP.
- 5 (7) El método del aspecto (1), en el que las proteínas de desmielinación se seleccionan de la proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), y proteína NS-1 de oligodendrocitos.
- (8) El método del aspecto (1), en el que las proteínas gliales se seleccionan de GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, y S100β.
- 10 (9) El método del aspecto (1), en el que los neurotransmisores se seleccionan de neurotransmisores colinérgicos, neurotransmisores dopaminérgicos, neurotransmisores noradrenérgicos, neurotransmisores serotoninérgicos, neurotransmisores glutamatérgicos, y neurotransmisores GABAérgicos.
- (10) El método del aspecto (1), en el que los receptores de neurotransmisores se seleccionan de subunidades del receptor de NMDA, subunidades del receptor de glutamato (AMPA), receptores de kainato, subtipos de beta-adrenorreceptores, subtipos de alfa-adrenorreceptores, receptores de GABA, receptor de glutamato metabotrópico, receptores de serotonina 5-HT, receptores de dopamina, receptores Ach muscarínicos, y receptor de acetilcolina nicotínico.
- 15 (11) El método del aspecto (1), en el que los transportadores de neurotransmisores se seleccionan de transportadores de norepinefrina (NET), transportadores de dopamina (DAT), transportadores de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador GABA-transportadores de aminoácidos inhibidores vesiculares (VIAAT/VGAT), transportadores de glutamato, transportadores de acetilcolina vesiculares, y transportadores de colina.
- 20 (12) El método del aspecto (1), en el que se emplean uno o más biomarcadores de proteínas para diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales.
- 25 (13) El método del aspecto (12), en el que dichos uno o más biomarcadores comprenden:
 α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, βIII-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA-2, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).
- 30 (14) El método del aspecto (1), en el que se emplean uno o más biomarcadores de proteínas para diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, comprendiendo dichos biomarcadores: estatmina, hipocalcina, SCG10, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1; epítipo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina); receptores de orexina, orexinas MBP, MOG, PLP, MAG; proteína de mielina de células de Schwann; estriatina, Rhes, Gadd45a; periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), PH8, PEP-19, neurocalcina (NC), proteína de unión a Ca²⁺-mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, y visinina.
- 35 (15) El método del aspecto (1), en el que los biomarcadores comprenden uno cualquiera o más de SCG10, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), H-2Z1, CD15, receptores de orexina, orexinas, proteína de mielina de células de Schwann, proteína Rhes, estriatina, Gadd45a, periferina.
- 40 (16) El método del aspecto (1), en el que la detección de uno o más biomarcadores distingue entre tipos de células.
- (17) El método del aspecto (16), en el que los biomarcadores comprenden uno cualquiera o más de la proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), y proteína NS-1 de oligodendrocitos; GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100β; Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4; proteína de mielina de células de Schwann; y tenascina.
- 45 (18) El método del aspecto (1), en el que la detección de uno o más biomarcadores es diagnóstica de una lesión subcelular.
- 50 (19) El método del aspecto (18), en el que los biomarcadores comprenden uno cualquiera o más de los biomarcadores de proteínas subcelulares neurales: proteínas axonales: α II espectrina, SPDB-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina; proteínas

dendríticas: beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2; proteínas somáticas: UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3, SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22; proteínas nucleares neurales: NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina; proteínas presinápticas: sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anfifisina-1 (NP_001626), anfifisina-2 (NP_647477); proteínas postsinápticas: PSD95-1, receptor de NMDA-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA, mGluR, proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, y a/b-SNAP.

- (20) El método del aspecto (1), en el que se detecta una pluralidad de los biomarcadores.
- (21) El método del aspecto (1), en el que se detectan al menos dos de los biomarcadores.
- (22) El método del aspecto (1), en el que se detectan al menos tres de los biomarcadores.
- 15 (23) El método del aspecto (1), en el que se detectan al menos cuatro de los biomarcadores.
- (24) El método del aspecto (1), en el que se detectan proteínas, péptidos o sus derivados.
- (25) El método del aspecto (1), en el que se emplea cualquier combinación de al menos dos biomarcadores para diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales.
- 20 (26) El método del aspecto (1), en el que se emplea una pluralidad de los marcadores en combinación para diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales.
- (27) El método del aspecto (1), en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en fluido cerebroespinal, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, tejido, células, y órganos.
- 25 (28) El método del aspecto (1), en el que se detectan uno o más biomarcadores de proteínas comparando los perfiles de proteínas de pacientes susceptibles o que padecen una lesión neural y/o trastornos neuronales, con sujetos normales.
- (29) El método del aspecto (1), en el que se detectan uno o más biomarcadores de proteínas utilizando un inmunoensayo.
- (30) El método del aspecto (29), en el que el inmunoensayo es un ELISA.
- 30 (31) El método del aspecto (1), en el que se detectan uno o más biomarcadores de proteínas utilizando una matriz de biochip.
- (32) El método del aspecto (31), en el que la matriz de biochip es una matriz de chip de proteínas.
- (33) El método del aspecto (31), en el que la matriz de biochip es una matriz de ácidos nucleicos.
- (34) El método del aspecto (31), en el que uno o más marcadores están inmovilizados sobre la matriz de biochip.
- 35 (35) El método del aspecto (34), en el que uno o más marcadores inmovilizados se someten a una ionización de láser para detectar el peso molecular de los marcadores.
- (36) El método del aspecto (35), en el que el peso molecular de dichos uno o más marcadores se analiza frente a un umbral de intensidad que está normalizado frente a la corriente iónica total.
- (37) El método del aspecto (36), en el que se emplea una transformación logarítmica para reducir los intervalos de intensidad de los picos para limitar el número de marcadores detectados.
- 40 (38) El método del aspecto (31), que comprende:
- generar datos sobre las muestras sujeto inmovilizadas sobre una matriz de biochip, sometiendo a la matriz de biochip a una ionización de láser y detectando la intensidad de la señal para la proporción de masa/carga; y
- transformar los datos en una forma de lectura mediante ordenador;
- y ejecutar un algoritmo que clasifica los datos según los parámetros de entrada del usuario, para detectar señales que representan marcadores presentes en pacientes que padecen una lesión neural y/o trastornos neuronales y que carecen de sujetos control normales.
- 45 (39) El método del aspecto (38), en el que la superficie de la matriz de biochip comprende uno o más anticuerpos.

- (40) El método del aspecto (38), en el que la superficie de la matriz de biochip comprende ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios.
- (41) El método del aspecto (38), en el que la superficie de la matriz de biochip comprende proteínas, péptidos o sus fragmentos.
- 5 (42) El método del aspecto (38), en el que la superficie de la matriz de biochip comprende sondas de aminoácidos.
- (43) El método del aspecto (38), en el que la superficie de la matriz de biochip comprende bancos de presentación de fagos.
- (44) El método del aspecto (38), en el que uno o más de los marcadores se detectan utilizando una espectrometría de masas de desorción/ionización de láser, que comprende:
- 10 proporcionar una sonda adaptada para su uso con un espectrómetro de masas que comprende un adsorbente unido a él, y;
- poner en contacto la muestra sujeto con el adsorbente; y
- desorber e ionizar el marcador o marcadores de la sonda y detectar los marcadores desionizados/ionizados con el espectrómetro de masas.
- 15 (45) El método del aspecto (44), en el que la espectrometría de masas de desorción/ionización de láser comprende:
- proporcionar un sustrato que comprende un adsorbente unido a él;
- poner en contacto la muestra sujeto con el adsorbente;
- colocar el sustrato sobre una sonda adaptada para su uso con un espectrómetro de masas que comprende un adsorbente unido a él; y
- 20 desorber e ionizar el marcador o marcadores de la sonda y detectar el marcador o marcadores desorbidos/ionizados con el espectrómetro de masas.
- (46) El método del aspecto (44), en el que el adsorbente es un anticuerpo, un oligonucleótido mono- o bicatenario, sus aminoácidos, proteínas, péptidos o fragmentos.
- (47) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 25 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas axonales:
- 30 α II espectrina, SPDB, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200 (NF-H), NF-160 (NF-M), proteína precursora de amiloides, α internexina, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;
- correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.
- (48) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 35 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas son proteínas precursoras de amiloides, sus péptidos o fragmentos, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico
- 40 de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.
- (49) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 45 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas dendríticas:

beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina-1,2, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

5 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(50) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

10 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas somáticas:

UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3 (P42655), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

15 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(51) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

20 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas presinápticas:

25 sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477), sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(52) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

30 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas postsinápticas:

35 PSD95-1, receptor de NMDA (y todos los subtipos)-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA, mGluR, proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CaMK)-alfa, beta, gamma, CaMK-IV, SNAP-25, a-/b-SNAP, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

40 (53) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas de desmielinación:

45 proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

50 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(54) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

- 5 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas gliales y microgliales:
- GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100 β , Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina (CX3CR1), antígeno 5-d-4, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;
- 10 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.
- (55) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 15 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas colinérgicas:
- acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;
- 20 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.
- (56) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 25 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas dopaminérgicas:
- tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32; dopamina beta-hidroxilasa (DbH), sus péptidos, fragmentos o derivados, y;
- 30 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.
- (57) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 35 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas adrenérgicas:
- biomarcadores adrenérgicos: feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), triptófano hidroxilasa (TrH), sus péptidos, fragmentos o derivados, y;
- 40 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.
- (58) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:
- 45 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de al menos un biomarcador de cada tipo de célula neural:
- 50 α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptotagmina-1 (Q62910), sinaptotagmina-2, PSD95-1, receptor de NMDA 2 y los subtipos, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina OX-1R,

OX-2R, estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), neurocalcina (NC), y sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

5 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(59) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

10 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas glutamatérgicas:

glutaminasa, glutamina sintetasa; GABA transaminasa [GABAT]), GABA-B-R2, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

15 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(60) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

20 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de las proteínas GABAérgicas:

GABA transaminasa (4-aminobutirato-2-cetoglutarato transaminasa [GABAT]), ácido glutámico descarboxilasa (GAD25, 44, 65, 67), GABA-B-R2, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

25 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(61) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

30 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de los receptores de neurotransmisores:

35 subunidades del receptor de NMDA, NR1A2B, subunidades del receptor de glutamato, AMPA), receptores de kainato, GluR1, GluR4, subtipos de beta-adrenorreceptores, beta(2), subtipos de alfa-adrenorreceptores, alfa(2c), receptores de GABA, GABA(B), receptor del glutamato metabotrópico, mGluR3, receptores de serotonina 5-HT, 5-HT(3), receptores de dopamina, D4, receptores Ach muscarínicos, M1, receptor de acetilcolina nicotínico, alfa-7, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

40 correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(62) Un método para detectar y diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales, que comprende:

45 detectar al menos uno o más biomarcadores de proteínas en una muestra sujeto, y; correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales, en el que dichos uno o más marcadores de proteínas se seleccionan de los transportadores de neurotransmisores:

50 transportadores de norepinefrina (NET), transportadores de dopamina (DAT), transportadores de serotonina (SERT), proteínas transportadoras vesiculares, VMAT1, VMAT2, transportadores de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportadores de glutamato, transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, VGLUT1; BNPI, VGLUT2, transportadores de colina, sus péptidos, fragmentos o derivados, y;

correlacionar la detección de uno o más biomarcadores de proteínas con un diagnóstico de lesión neural y/o trastornos neuronales, en el que la correlación toma en cuenta la detección de uno o más biomarcadores de proteínas en cada diagnóstico, comparado con sujetos normales.

(63) Una composición/panel de biomarcadores, que comprende:

- 5 α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200, NF-H, NF-160, NF-M, proteína precursora de amiloides, α internexina, beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina 1,2; UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3, 14-3-3- ϵ psilon (P42655), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22, NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), sintaxina, CRMP1, 2, anffisina-1 (NP_001626), anffisina-2 (NP_647477), PSD95 - 1, receptor de NMDA, subtipos del receptor de NMDA-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA, subtipos del receptor de kainato-AMPA, mGluR, subtipos de mGluR, proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, α -/b-SNAP, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos, GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta, Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina, CX3CR1, antígeno 5-d-4, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, hipocalcina, SCG10, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina, D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1, epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina), receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo), MBP, MOG, PLP, MAG, proteína de mielina de células de Schwann, estriatina, Rhes, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), PH8, serotoninérgico dopaminérgico, PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina, subunidades del receptor de NMDA, NR1A2B, subunidades del receptor de glutamato, AMPA), receptores de kainato, GluR1, GluR4, subtipos de beta-adrenorreceptores, beta(2), subtipos de alfa-adrenorreceptores, alfa(2c), receptores de GABA, GABA(B), receptor de glutamato metabotrópico, mGluR3, receptores de serotonina 5-HT, 5-HT(3), receptores de dopamina, D4, receptores Ach muscarínicos, M1, receptor de de acetilcolina nicotínico, alfa-7, transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadores vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato, GLT1, transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina, CHT1, acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT], tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32, dopamina beta-hidroxilasa (DbH), feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), triptófano hidroxilasa (TrH), glutaminasa, glutamina sintetasa, GABA transaminasa [GABAT], y GABA-B-R2.

(64) La composición del aspecto (63), en la que los biomarcadores comprenden:

- 40 α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA-2, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periferina, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

45 (65) Un kit para diagnosticar una lesión neural y/o trastornos neuronales en un sujeto, comprendiendo dicho kit:

(a) un sustrato para soportar una muestra biológica aislada a partir de un sujeto humano sospechoso de presentar una célula nerviosa dañada,

(b) un agente que se une específicamente al menos a una o más de las proteínas neurales; y

50 (c) instrucciones impresas para hacer reaccionar el agente con la muestra biológica, o con una porción de la muestra biológica, para detectar la presencia o la cantidad de al menos un marcador en la muestra biológica.

(66) El kit del aspecto (65), en el que el sustrato es hidrófobo, hidrófilo, cargado, polar o son iones metálicos.

(67) El kit del aspecto (65), en el que el agente es un anticuerpo, un oligonucleótido mono- o bicatenario, sus aminoácidos, proteínas, péptidos o fragmentos.

55 (68) El método del aspecto (65), en el que se detectan uno o más biomarcadores de proteínas utilizando inmunoensayos.

(69) El kit del aspecto (68), en el que los biomarcadores son: α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200, NF-H, NF-160, NF-M, proteína precursora de amiloides, α internexina, beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina 1,2; UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3, 14-3-3-épsilon (P42655), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22, NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anfifisina-1 (NP_001626), anfifisina-2 (NP_647477), PSD95 - 1, receptor de NMDA, subtipos del receptor de NMDA-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA, subtipos del receptor de kainato-AMPA, mGluR, subtipos de mGluR, proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a/b-SNAP, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos, GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta, Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina, CX3CR1, antígeno 5-d-4, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, hipocalcina, SCG10, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina, D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1, epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina), receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexina (péptidos específicos del hipotálamo), MBP, MOG, PLP, MAG, proteína de mielina de células de Schwann, estriatina, Rhes, Gadd45a, periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), PH8, serotoninérgico dopaminérgico, PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca^{2+} mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina, subunidades del receptor de NMDA, NR1A2B, subunidades del receptor de glutamato, AMPA), receptores de kainato, GluR1, GluR4, subtipos de beta-adrenorreceptores, beta(2), subtipos de alfa-adrenorreceptores, alfa(2c), receptores de GABA, GABA(B), receptor de glutamato metabotrópico, mGluR3, receptores de serotonina 5-HT, 5-HT(3), receptores de dopamina, D4, receptores Ach muscarínicos, M1, receptor de de acetilcolina nicotínico, alfa-7, transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadores vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato, GLT1, transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNIPI] y VGLUT2, transportador de colina, CHT1, acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT], tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32, dopamina beta-hidroxilasa (DbH), feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), triptófano hidroxilasa (TrH), glutaminasa, glutamina sintetasa, GABA transaminasa [GABAT], y GABA-B-R2.

(70) El kit del aspecto (65), en el que los biomarcadores comprenden:

α II espectrina, SPDB-1, NF-68, NF-L-2, Tau-3, β III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, NeuN-1, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, PSD95-1, receptor de NMDA-2, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, GFAP (P47819), Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), cortexina-1 (P60606), receptores de orexina (OX-1R, OX-2R), estriatina, Gadd45a, periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), y neurocalcina (NC).

(71) El kit del aspecto (65), en el que el inmunoensayo es un ELISA.

(72) El kit del aspecto (65), en el que el kit comprende anticuerpos específicos para los biomarcadores.

(73) El kit del aspecto (72), en el que los anticuerpos son específicos para α II espectrina (y SPDB)-1, NF-68 (NF-L)-2, Tau-3, α II, III espectrina, NF-200, NF-H, NF-160, NF-M, proteína precursora de amiloides, α internexina, beta III-tubulina-1, p24, proteína asociada a microtúbulos-2, alfa-tubulina (P02551), beta-tubulina (P04691), MAP-2A/B-3, MAP-2C-3, estatmina-4, dinamina-1 (P21575), foceína, dinactina (Q13561), vimentina (P31000), dinamina, profilina, cofilina 1,2; UCH-L1 (Q00981)-1, glicógeno fosforilasa-BB-2, PEBP (P31044), NSE (P07323), CK-BB (P07335), Thy 1.1, proteína priónica, huntingtina, proteínas 14-3-3, 14-3-3-épsilon (P42655), SM22- α , calgranulina AB, alfa-sinucleína (P37377), beta-sinucleína (Q63754), HNP 22, NeuN-1, autoantígeno nuclear S/G(2) (SG2NA), huntingtina, sinaptofisina-1, sinaptotagmina (P21707), sinaptojanina-1 (Q62910), sinaptojanina-2, sinapsina1 (sinapsina-la), sinapsina2 (Q63537), sinapsina3, GAP43, Bassoon (NP_003449), Piccolo (aczonina) (NP_149015), syntaxina, CRMP1, 2, anfifisina-1 (NP_001626), anfifisina-2 (NP_647477), PSD95 - 1, receptor de NMDA, subtipos del receptor de NMDA-2, PSD93, receptor de kainato-AMPA, subtipos del receptor de kainato-AMPA, mGluR, subtipos de mGluR, proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, CaMPK-IV, SNAP-25, a/b-SNAP, proteína básica de mielina (MBP) y sus fragmentos, proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), proteína NS-1 de oligodendrocitos, GFAP (P47819), proteína disulfuro isomerasa (PDI) - P04785, neurocalcina delta, S100beta, Iba1, OX-42, OX-8, OX-6, ED-1, PTPasa (CD45), CD40, CD68, CD11b, fractalquina (CX3CL1) y receptor de fractalquina, CX3CR1, antígeno 5-d-4, proteína de mielina de células de Schwann, tenascina, estatmina, hipocalcina, SCG10, proteína de células de Purkinje-2 (Pcp2), calbindina D9K, calbindina, D28K (NP_114190), CaBP cerebelar, mancha 35; cortexina-1 (P60606), producto génico H-2Z1,

epitopo CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina), receptores de orexina (OX-1R y OX-2R)-apetito, orexinas (péptidos específicos del hipotálamo), MBP, MOG, PLP, MAG, proteína de mielina de células de Schwann, estriatina, Rhes, Gadd45a, periférica, proteína de mielina periférica 22 (AAH91499), PH8, serotoninérgico dopaminérgico, PEP-19, neurocalcina (NC), una proteína de unión a Ca²⁺ mano-EF específica de neuronas, encefalopsina, estriatina, SG2NA, zinedina, recoverina, visinina, subunidades del receptor de NMDA, NR1A2B, subunidades del receptor de glutamato, AMPA), receptores de kainato, GluR1, GluR4, subtipos de beta-adrenorreceptores, beta(2), subtipos de alfa-adrenorreceptores, alfa(2c), receptores de GABA, GABA(B), receptor de glutamato metabotrópico, mGluR3, receptores de serotonina 5-HT, 5-HT(3), receptores de dopamina, D4, receptores Ach muscarínicos, M1, receptor de de acetilcolina nicotínico, alfa-7, transportador de norepinefrina (NET), transportador de dopamina (DAT), transportador de serotonina (SERT), proteínas transportadores vesiculares (VMAT1 y VMAT2), transportador de GABA-transportador de aminoácidos inhibidores vesicular (VIAAT/VGAT), transportador de glutamato, GLT1, transportador de acetilcolina vesicular, transportador de glutamato vesicular 1, [VGLUT1; BNPI] y VGLUT2, transportador de colina, CHT1, acetilcolina esterasa, colina acetiltransferasa [ChAT], tirosina hidroxilasa (TH), fosfo-TH, DARPP32, dopamina beta-hidroxilasa (DbH), feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), triptófano hidroxilasa (TrH), glutaminasa, glutamina sintetasa, GABA transaminasa [GABAT], y GABA-B-R2.

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración, y no como limitación. Aunque se han proporcionado ejemplos específicos, la anterior descripción es ilustrativa y no restrictiva. Cualquiera de las características de las realizaciones previamente descritas puede combinarse de cualquier manera con una o más características de cualquier otra realización en la presente invención. Además, para los expertos en la técnica serán evidentes muchas variaciones de la invención tras analizar la memoria descriptiva. Por tanto, el alcance de la invención debe determinarse no haciendo referencia a la anterior descripción, sino que debe determinarse haciendo referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con su alcance completo de equivalentes.

Todas las publicaciones y documentos de patentes citados en esta solicitud se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines, del mismo modo que si cada publicación o documento de patente individual se hubiera citado de modo individual. En la cita de las diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten ninguna referencia particular como "técnica anterior" a su invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Abreviaturas:

AEBSF, fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencensulfonilo; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; EGTA, ácido etilenbis(oxietilen-nitrilo)tetraacético; DMEM, medio de Eagle modificado de Dulbecco; BSA, albúmina de suero bovina; DPBS, disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; DTT, ditioneitol; FDA, diacetato de fluoresceína; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; HBSS, disolución salina equilibrada de Hanks; MAP-2, proteína asociada a microtúbulos-2; PI, yoduro de propidio; PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo; SDS, dodecilsulfato de sodio; TEMED, N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina; Calplnh-11, inhibidor de calpaína II (N-acetil-Leu-Leu-metioninal); Z-D-DCB, inhibidor de pan-caspasa (carbобензохи-Asp-CH₂-OC(O)-2-6-diclorobenceno); PBS, disolución salina tamponada con fosfato; TLCK, cloro-metil-N α -p-tosil-L-lisina; TPCK, N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona.

Procedimientos quirúrgicos

Para la lesión cerebral traumática de impacto cortical controlada se empleó un dispositivo de lesión por impacto cortical para producir TBI en roedores. La TBI por impacto cortical produce una deformación cortical en la vecindad de la punta impactadora asociada con contusión, y daños neuronales y axonales que están limitados al hemisferio ipsilateral al sitio de la lesión. Ratas macho adultas (280-300 g) Sprague-Dawley (Harlan; Indianapolis, IN) se anestesiaron inicialmente con isoflurano al 4% en un gas vehículo de O₂/N₂O 1:1 (4 min), seguido del mantenimiento de la anestesia de isoflurano al 2,5% en el mismo gas vehículo. Se controló la temperatura interna de modo continuo mediante una sonda termistor rectal y se mantuvo a 37±1 °C colocando una almohadilla calefactora de temperatura controlada y ajustable por debajo de las ratas. Los animales se montaron en un marco estereotáctico en una posición prona y se sujetaron por las orejas y barras incisoras.

Se realizó una incisión craneal en la línea media, se retiraron los tejidos blandos, y se realizó una craneotomía unilateral (ipsilateral al sitio del impacto) (7 mm de diámetro) adyacente a la sutura central, a mitad de camino entre el bregma y lambda. La duramadre se mantuvo intacta sobre la corteza. Se produjo un traumatismo en el cerebro de las ratas mediante un impacto en la corteza derecha (corteza ipsilateral) con una punta impactadora de aluminio de 5 mm de diámetro (alojada en un cilindro neumático) a una velocidad de 3,5 m/s con una compresión de 2,0 mm y un tiempo de permanencia de 150 ms (duración de la compresión). La velocidad se controló ajustando la presión (N₂ comprimido) suministrada al cilindro neumático. La velocidad y el tiempo de permanencia se midieron con un transductor de desplazamiento de velocidad lineal (Lucas Shaevitz™ modelo 500 HR; Detroit, MI) que produce una señal análoga que se registra mediante un osciloscopio de almacenamiento de trazas (BK Precision, modelo 2522B; Placentia, CA). Los animales con lesión simulada se sometieron a procedimientos quirúrgicos idénticos pero no recibieron una lesión de impacto. Se mantuvo un tratamiento pre- y postlesión apropiado.

Preparación del tejido cortical y CSF

Se recogió el CSF y las cortezas cerebrales de los animales a diversos intervalos después de la lesión simulada o TBI. En los momentos apropiados, los animales TBI o con lesión simulada se anestesiaron según se describió anteriormente y se sujetaron en un marco estereotáctico con la cabeza libre para moverse a lo largo del eje longitudinal. La cabeza estaba doblada de modo que la protuberancia occipital externa en el cuello resultaba prominente, y se realizó una incisión en la línea media dorsal sobre las vértebras cervicales y el occipucio. La membrana atlanto-occipital fue expuesta mediante una disección roma, y una aguja 25G unida a un tubo de polietileno se hizo bajar con cuidado hacia la cisterna magna. Se recogieron aproximadamente 0,1 a 0,15 ml de CSF de cada rata. Después de recoger el CSF, los animales se retiraron del marco estereotáctico y se sacrificaron inmediatamente por decapitación.

Después las cortezas ipsilateral y contralateral (al sitio del impacto) se diseccionaron con rapidez, se enjuagaron en PBS enfriado en hielo, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las cortezas debajo de las craneotomías se cortaron al nivel de la materia blanca y se extendieron aproximadamente 4 mm lateralmente y aproximadamente 7 mm rostrocaudalmente. Las muestras de CSF se centrifugaron a 4000 g durante 4 min a 4 °C para eliminar cualquier eritrocito contaminante. El CSF limpio y las muestras de tejido congelado se conservaron a -80 °C hasta que estuvieran listas para usar. Las cortezas se homogeneizaron en un tubo de vidrio con una mano de mortero Dounce de TEFLON en 15 volúmenes de tampón de lisis de detergente triple enfriado en hielo (Hepes 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, IGEPAL 40 al 1,0%, ácido desoxicólico al 0,5%, pH 7,5) que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas de amplio espectro (Roche Molecular Biochemicals, n.º de catálogo 1-836-145).

Las muestras de CSF humano se obtuvieron con el consentimiento informado de sujetos humanos que padecen TBI, y de pacientes control sin TBI, que tienen hidrocefalia.

ELISA sandwich

Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales de conejo específicos antibiomarcadores se produjeron en el laboratorio. Para determinar la reactividad y la especificidad de los anticuerpos, un panel de tejidos se sondó mediante una transferencia Western. Se empleó un ELISA indirecto con la proteína biomarcadora recombinante unida a la placa de ELISA para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos utilizadas en el ensayo. Este ensayo determina una concentración robusta de antibiomarcador para ser utilizada en el ensayo. Se revistieron los pocillos de una microplaca de 96 pocillos con 50 ng/pocillo, y los anticuerpos antibiomarcador de conejo y ratón se diluyeron en serie comenzando con una dilución 1:250 hasta 1:10.000 para determinar la concentración óptima para utilizar en el ensayo. Se empleó un anticuerpo de detección secundario anti-conejo (o ratón) marcado con peroxidasa de rábano (HRP) y Ultra-TMB como sustrato de detección para evaluar los resultados.

Tras determinar la concentración de anticuerpo para la señal máxima, se determina el límite máximo de detección del ELISA indirecto para cada anticuerpo. Se revisten microplacas de 96 pocillos con una concentración desde 50 ng/pocillo diluida en serie hasta < 1 pg/pocillo. Para la detección, los anticuerpos se diluyen hasta la concentración determinada anteriormente. Esto proporciona un intervalo de sensibilidad para los ensayos ELISA de biomarcadores y determina el anticuerpo que se debe escoger para la captura y el anticuerpo de detección.

Optimización y potenciación de la señal en el ELISA sandwich: El anticuerpo de detección está marcado directamente con HRP para evitar la reactividad cruzada y para poder potenciar la señal con el sistema de amplificación, que es muy sensible. Este formato se emplea para detectar todos los biomarcadores. Los pocillos de la placa de 96 pocillos se revisten con concentraciones saturantes del anticuerpo purificado (aproximadamente 250 ng/pocillo), la concentración del antígeno del biomarcador varía de 50 ng a < 1 pg/pocillo, y el anticuerpo de detección se encuentra a la concentración determinada anteriormente. Inicialmente, el complejo se detecta con un anticuerpo secundario marcado con HRP para confirmar el formato de ELISA SW, y el sistema de detección es reemplazado por el anticuerpo de detección marcado con HRP.

Se emplean curvas patrón de los biomarcadores y las muestras de animales control y lesionados. Esto también determina el paralelismo entre las muestras de suero y la curva patrón. Las muestras de suero se siembran con una dilución en serie de cada biomarcador, similar a la curva patrón. Los resultados paralelos son iguales al 80-100% de recuperación. Si cualquiera de las concentraciones altas de suero presentan sustancias que interfieren, se determina la dilución mínima requerida para eliminar la interferencia. El ensayo se emplea para evaluar los niveles de biomarcadores en el suero de los animales lesionados que presentan lesiones de diferentes magnitudes seguidas a lo largo del tiempo.

El ELISA se ha desarrollado y optimizado como un ELISA con formato de 96 pocillos convencional que es específico para los biomarcadores y la sensibilidad en el intervalo medido en CSF y suero de rata y humano. Se emplearon anticuerpos que reconocen la proteína UCH-L1 con alta especificidad y sensibilidad (figuras 3 y 4) como anticuerpos de captura y detección. El anticuerpo de detección se marca con peroxidasa de rábano (HRP) y se realiza el revelado colorimétrico utilizando Ultra-TMB.

Validación de UCH-L1 como biomarcador para TBI

Utilizando muestras de rata y de ser humano obtenidas en the University of Florida (Gainesville, FL, y Banyan Biomarkers, Alachua, FL) se ha confirmado que UCH-L1 es un biomarcador fiable y sensible para TBI. Las muestras de CSF y suero de rata se obtuvieron de animales que habían recibido una lesión cerebral experimental mediante un impacto cortical controlado. Los niveles de UCH-L1 en CSF y suero (figura 9) fueron significativamente mayores en los animales con lesión cerebral que en los controles no lesionados o con lesión simulada. De forma similar, pueden medirse unos niveles elevados de UCH-L1 en el suero de pacientes humanos con lesiones cerebrales, pero están por debajo del nivel de detección del ensayo en personas sanas normales (figura 9).

Electroforesis en gel y análisis de inmunotransferencia del CSF

Se determinaron las concentraciones de proteínas del CSF mediante ensayos de microproteínas del ácido bicinchonínico (Pierce Inc., Rockford, IL) con patrones de albúmina. Se prepararon muestras equilibradas en proteínas para una electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en un tampón de carga en dos veces que contiene Tris 0,25 M (pH 6,8), DTT 0,2 M, SDS al 8%, azul de bromofenol al 0,02%, y glicerol al 20% en H₂O destilada. Las muestras se calentaron durante 2 min a 90 °C y se centrifugaron durante 1 min a 10.000 en una microcentrífuga a temperatura ambiente. Se resolvieron de 20 a 40 microgramos de proteína por carril mediante SDS-PAGE en geles de Tris al 6,5%/glicina durante 1 hora a 200 V. Después de la electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron lateralmente a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) en un tampón de transferencia que contiene glicina 400 mM y Tris 0,025 M (pH 8,9) con metanol al 5% a un voltaje constante de 125 V durante 2 horas a 4 °C. Las transferencias se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en leche desnatada al 5% en TBST (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%, azida de sodio al 0,02%).

Las inmunotransferencias que contienen proteínas de CSF o cerebrales se sondaron con anticuerpos primarios específicos anti-proteínas neurales (por ejemplo, anti-UCH-L1, anti-alfa-sinucleína y anti-p24). Después de una incubación durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios en leche desnatada al 5% en TBST, las transferencias se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en leche desnatada al 5% que contenía IgG anti-conejo de cabra (1:3000) o IgG anti-ratón de cabra (dilución 1:10.000) conjugada con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Se utilizaron reactivos de revelado colorimétrico basados en la fosfatasa alcalina (sustrato BCIP-NBT) o de quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham) para visualizar el inmunomarcaje sobre una película quimioluminiscente Kodak Biomax ML.

Evaluación de la liberación de proteínas neurales

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotransferencia: Al final de un experimento, las células se recolectaron de 5 pocillos de cultivo idénticos y se introdujeron en tubos de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron a 3000 g durante 5 min. El medio se retiró y las células sedimentadas se enjuagaron con 1x DPBS. Las células se lisaron en tampón de homogeneización enfriado en hielo [PIPES 20 mM (pH 7,6), EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, DTT 1 mM, PMFS 0,5 mM, leupeptina 50 µg/ml, y 10 µg/ml de cada uno de AEBSF, aprotinina, pepstatina, TLCK y TPCK] durante 30 min, y se sometieron a cizallamiento a través de una jeringa de 1,0 ml con una aguja de calibre 25, durante 15 veces. Se ensayó el contenido en proteínas de las muestras mediante el método Micro BCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU).

Para la electroforesis de proteínas, se prepararon cantidades iguales de proteínas totales (30 µg) en un tampón de carga en dos veces que contenía Tris 0,25 M (pH 6,8), DTT 0,2 M, SDS al 8%, azul de bromofenol al 0,02%, y glicerol al 20%, y se calentó a 95 °C durante 10 min. Las muestras se resolvieron en una cámara de electroforesis vertical utilizando un gel de apilamiento al 4% en un gel de resolución de acrilamida al 7% durante 1 hora a 200 V. Para la inmunotransferencia, las proteínas separadas se transfirieron lateralmente a membranas de nitrocelulosa (0,45 µM) utilizando un tampón de transferencia que consiste en glicina 0,192 M y Tris 0,025 M (pH 8,3) con metanol al 10% a un voltaje constante (100 V) durante 1 hora a 4 °C. Las transferencias se bloquearon durante la noche en leche desnatada al 5% en Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, y Tween-20 al 0,005% a 4 °C. Se empleó azul de Coomassie y rojo de Panceau (Sigma, St. Louis, MO) para teñir los geles y las membranas de nitrocelulosa (respectivamente) para confirmar que se cargaron cantidades iguales de proteína en cada carril.

Las inmunotransferencias se sondaron tal como se describe a continuación con un anticuerpo primario (por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-UCH-L1 generado en ratones (Chemicon), un anticuerpo monoclonal anti-alfa-sinucleína generado en ratones (Chemicon), un anticuerpo monoclonal anti-p24 generado en ratones (Becton Dickson Bioscience)). Después de la incubación con el anticuerpo primario (1:2000) durante 2 horas a temperatura ambiente, las transferencias se incubaron en IgG anti-ratón de oveja conjugada con peroxidasa durante 1 hora (1:10.000). Se emplearon reactivos de quimioluminiscencia (ECL, Amersham) para visualizar el inmunomarcaje en Hyperfilm (Hyperfilm ECL, Amersham).

Análisis estadísticos

Se realizó la evaluación cuantitativa de los niveles de proteínas detectados por la inmunotransferencia mediante un barrido densitométrico por ordenador (ImageJ-NIH). Los datos se adquirieron como valores densitométricos integrados y se transformaron en porcentajes de los niveles densitométricos obtenidos de barridos de animales con

lesión simulada visualizados sobre la misma transferencia. Los datos se evaluaron mediante una regresión lineal de mínimos cuadrados, seguido de un ANOVA. Todos los valores se ofrecen como la media \pm MEE. Las diferencias se consideran significativas si $p < 0,05$.

5 **Ejemplo 1: Detección de las proteínas neurales UCH-L1, p24, y alfa-sinucleína en CSF de roedores después de TBI**

10 Se indujo una TBI en roedores como se describió anteriormente. Después de la TBI o una operación simulada, o de las ratas que quedan intactas, se recogieron muestras de CSF y se analizaron para la presencia de tres nuevos biomarcadores de proteínas neurales (por ejemplo, UCH-L1 (figura 3), p24 (figura 4) y alfa-sinucleína (figura 5)). Los resultados, que aparecen en las figuras 3-5, demuestran una acumulación independiente o concurrente de UCH-L1 (véase la figura 3), p24 (véase la figura 4) y alfa-sinucleína (véase la figura 5), en el CSF de roedores después de la TBI. Se observó una cantidad significativamente menor de estas proteínas neurales en las ratas control con lesión simulada e intactas. Cada carril en las transferencias representa un animal diferente. La sensibilidad de este ensayo permite la detección de diferencias entre animales, lo cual resulta valioso para la predicción del resultado. Los resultados de este estudio demuestran que, después de una TBI, las proteínas neurales acumuladas en el CSF pueden ser detectadas con facilidad en niveles suficientes con transferencias Western o con otros inmunoensayos, tales como ELISA.

15 **Ejemplo 2: Detección de las proteínas neurales UCH-L1 y p24 en CSF de TBI humano**

20 Se analizó la acumulación de nuevos marcadores neurales (UCH-L1 y p24) en muestras de CSF humano recogido 24 hr después de una TBI de cinco pacientes que sufrieron una TBI grave y cinco controles neurológicos (hidrocefalia de presión normal). Al igual que en los modelos de roedores de TBI, las proteínas neurales estudiadas (UCH-L1 y p24) fueron abundantes en las muestras de CSF de TBI. Los niveles de estas proteínas neurales son mucho mayores en los pacientes TBI que en los pacientes control (por ejemplo, UCH-L 1 (figura 6), p24 (figura 7)). Estos datos demuestran que, después de una TBI, las proteínas neurales acumuladas en el CSF humano pueden ser detectadas con facilidad en niveles suficientes con transferencias Western o con otros inmunoensayos, tales como ELISA.

25 Otras realizaciones

Se entenderá que aunque la invención ha sido descrita junto con su descripción detallada, la anterior descripción pretende ser ilustrativa y no limita el alcance de la invención, que es definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

30

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* para detectar una lesión neural o un trastorno neuronal en un sujeto, que comprende:
 analizar una muestra de un fluido corporal procedente de un sujeto, o una fracción de dicha muestra, para detectar una cantidad de un biomarcador de proteínas asociado con la lesión neural o el trastorno neuronal, en el que dicho biomarcador de proteína es ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1).
- 2.- El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de analizar una muestra del fluido para al menos otro biomarcador de proteínas asociado con la lesión neural y/o el trastorno neuronal.
- 3.- El método de la reivindicación 2, en el que dicho al menos otro biomarcador de proteínas es un biomarcador de proteínas diferente con relación a dicho primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en: p-24, alfa-sinucleína, beta-sinucleína, proteína asociada a microtúbulos, sinaptofisina-1, subunidades del receptor de NMDA, vimentina, sinaptotagmina, sinaptojanina-2, sinapsina2, CRMP1, 2, anfifisina-1, PSD95, PSD-93, proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CAMPK)-alfa, beta, gamma, proteína básica de mielina (MBP), proteína de proteolípidos de mielina (PLP), proteína específica de oligodendrocitos de mielina (MOSP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína asociada a mielina (MAG), NF-H, NF-L, NF-M, BIII-tubulina-1 y sus combinaciones.
- 4.- El método de la reivindicación 2, en el que dicho al menos otro biomarcador de proteínas es un biomarcador de proteínas diferente con relación a dicho primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en: proteína de membrana vesicular p-24, alfa-sinucleína, beta-sinucleína, sinaptofisina-1, subunidades del receptor de NMDA y sus combinaciones.
- 5.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad disminuye con la recuperación del sujeto de la lesión neural y/o del trastorno neuronal.
- 6.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad de dicho biomarcador de proteínas está relacionada con la gravedad de la lesión neural o del trastorno neuronal.
- 7.- El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además analizar una segunda muestra del fluido corporal o del tejido que está en contacto con el tejido neural del sujeto para determinar una cantidad en la segunda muestra de dicho biomarcador de proteínas, en el que la cantidad de productos de la degradación en dicha cantidad en la segunda muestra es mayor o menor que la cantidad de la muestra.
- 8.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la lesión neural o el trastorno neuronal es una lesión de células neurales subcelular o una lesión cerebral traumática (TBI).
- 9.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en CSF, sangre, plasma sanguíneo, suero y orina.
- 10.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho biomarcador de proteínas o al menos uno de dichos otros biomarcadores de proteínas se detecta utilizando un inmunoensayo.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el que el inmunoensayo es un ELISA.
- 12.- El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además inmovilizar dicho al menos un biomarcador de proteínas sobre una matriz de biochip y someterlo a una ionización de láser para detectar el peso molecular de un biomarcador.
- 13.- El método de la reivindicación 12, que comprende además comparar el peso molecular frente a un umbral de intensidad que está normalizado frente a la corriente iónica total.
- 14.- El método de la reivindicación 12, en el que la superficie de la matriz de biochip comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: un anticuerpo, un ácido nucleico, una proteína, péptidos, sondas de aminoácidos, y un banco de presentación de fagos.

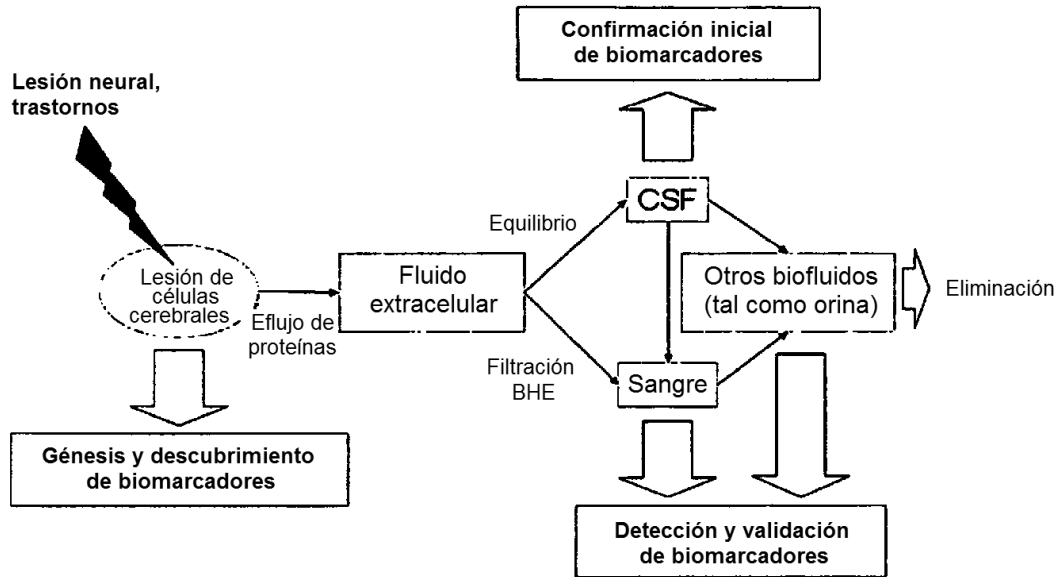


FIGURA 1

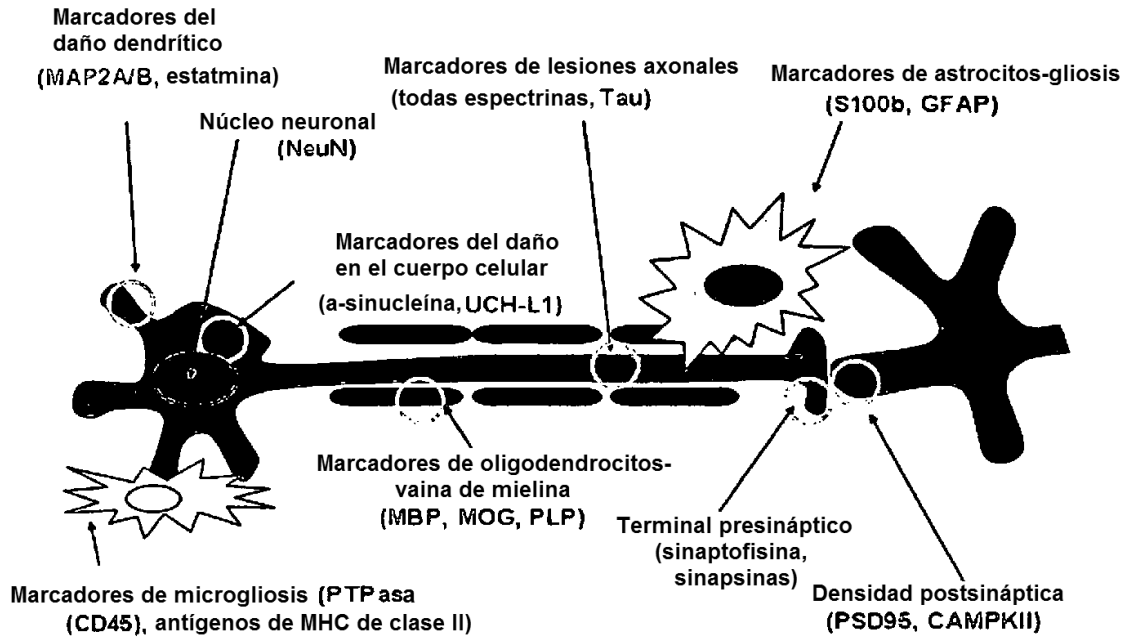


FIGURA 2

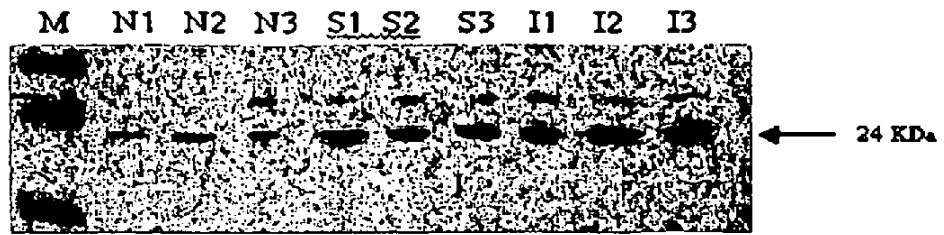


FIGURA 3A

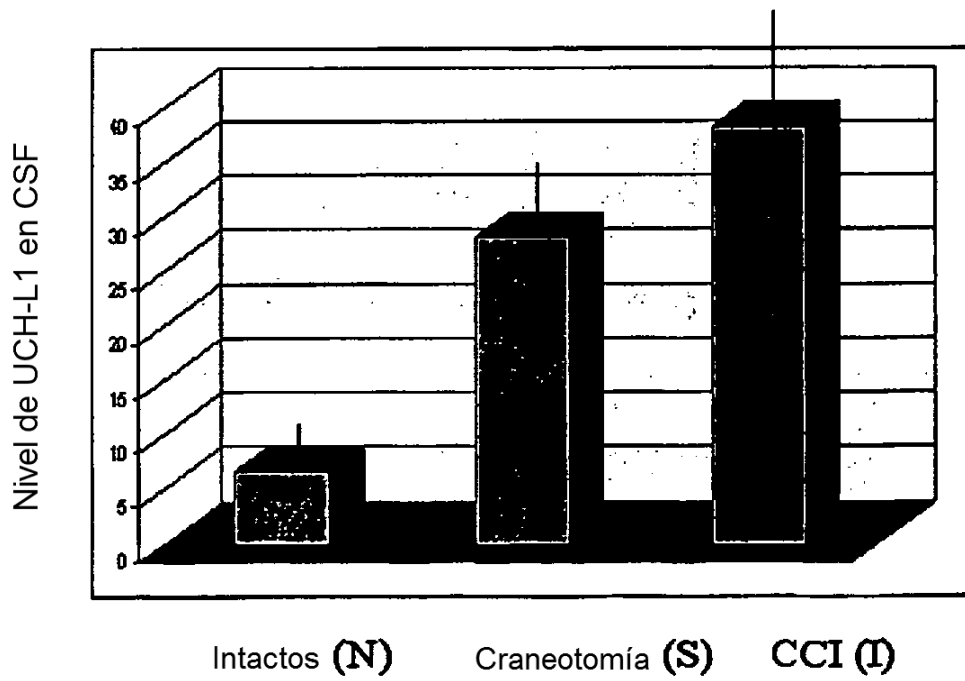


FIGURA 3B

N: intactos; **S:** simulados; **I:** lesión

N1 N2 N3 S1 S2 S3 I1 I2 I3



N4 N5 S4 S5 I4 I5



FIGURA 4A

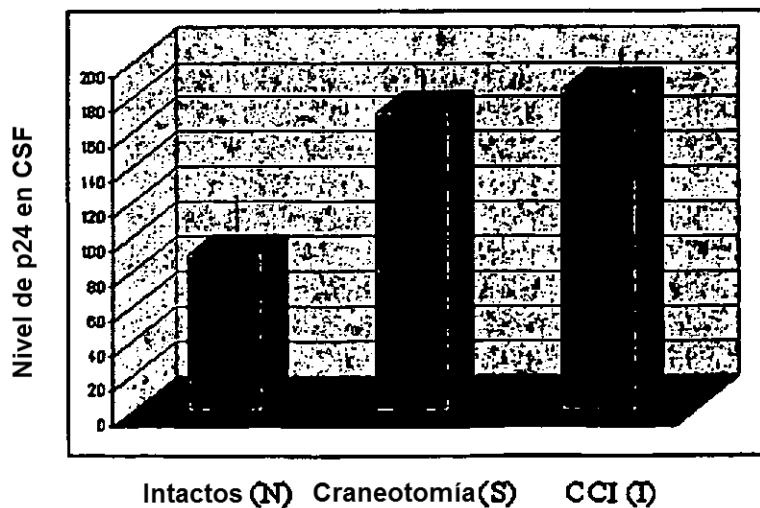


FIGURA 4B

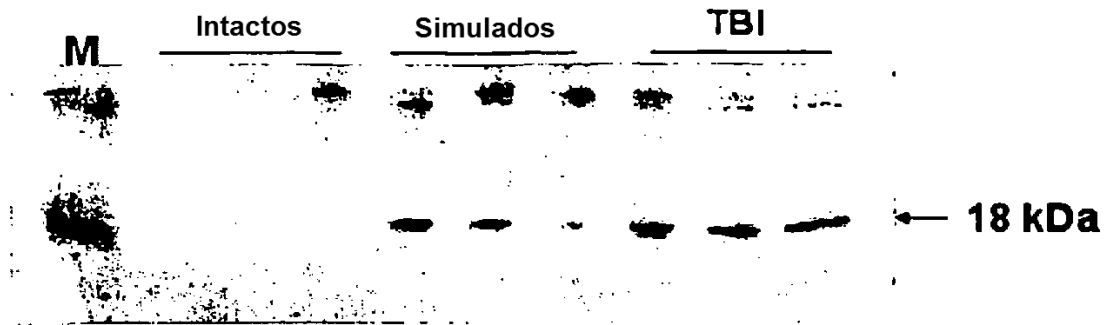


FIGURA 5A

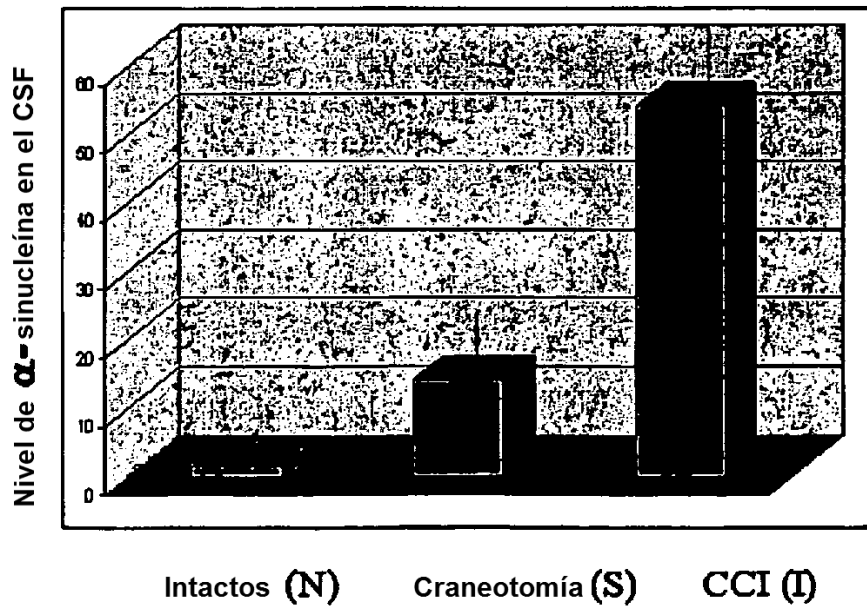


FIGURA 5B

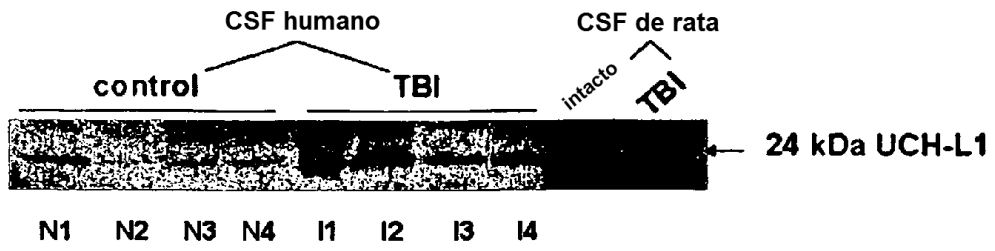


FIGURA 6A

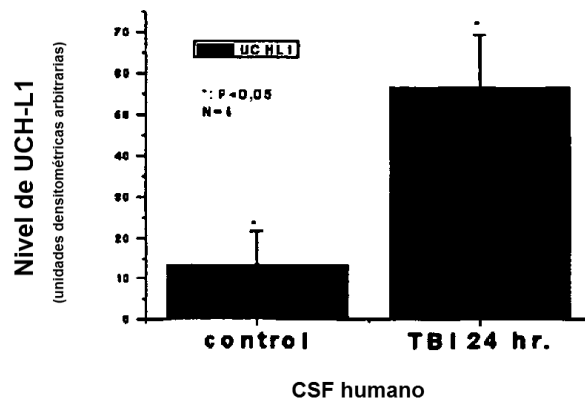


FIGURA 6B

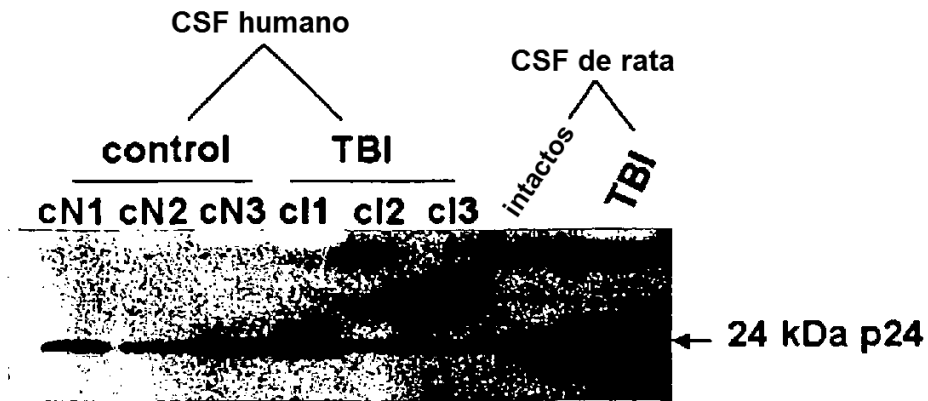


FIGURA 7A

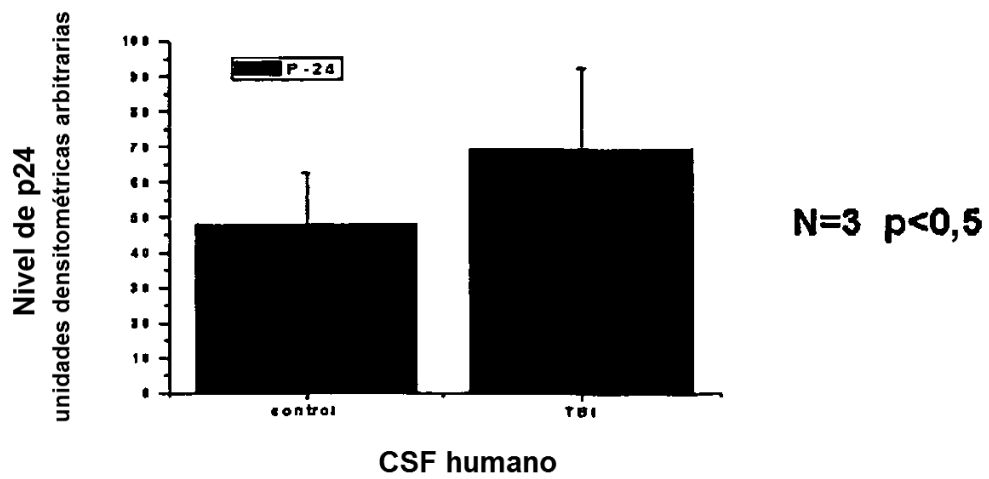


FIGURA 7B

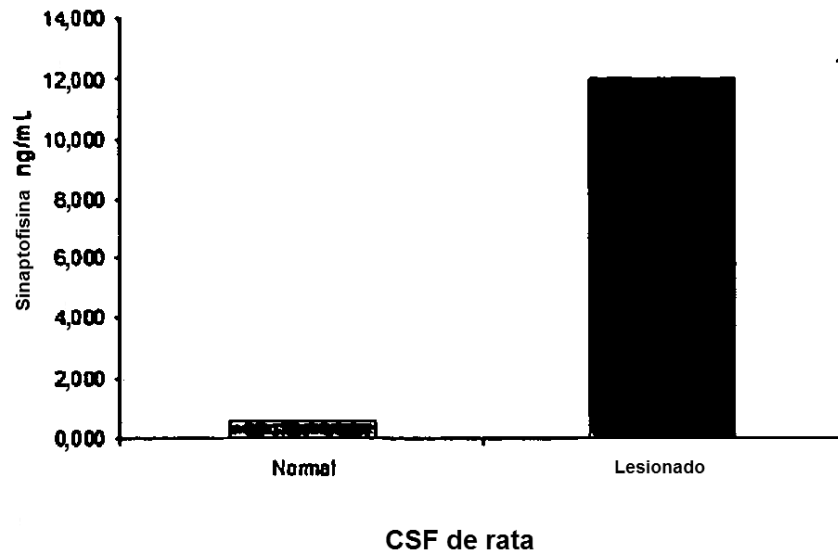


FIGURA 8A

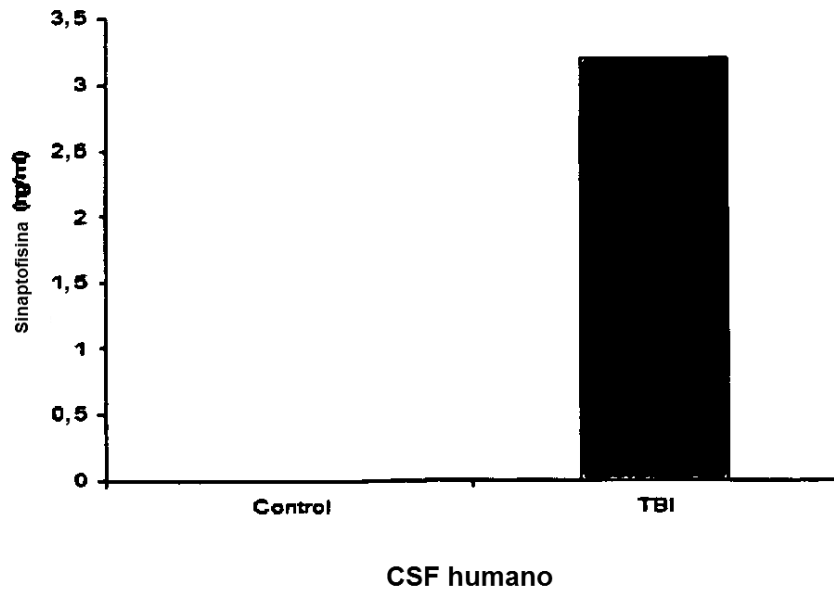


FIGURA 8B

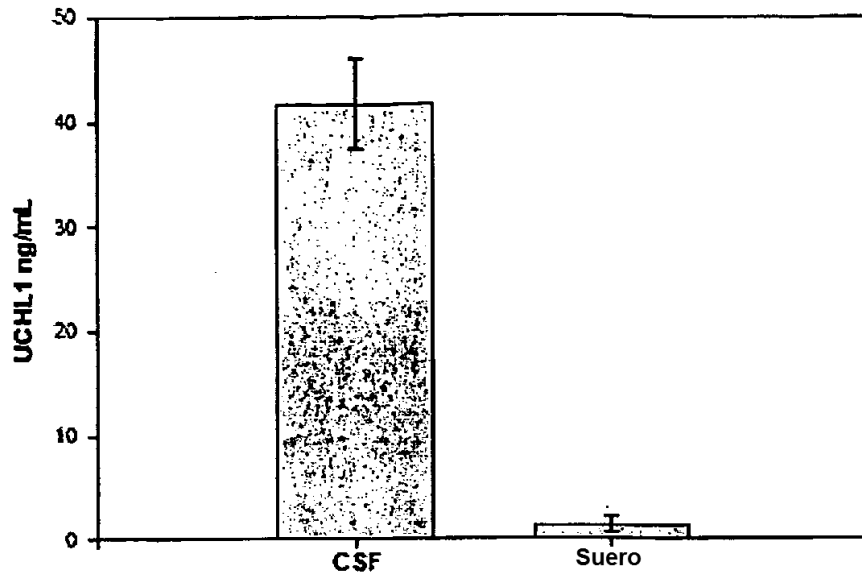


FIGURA 9A

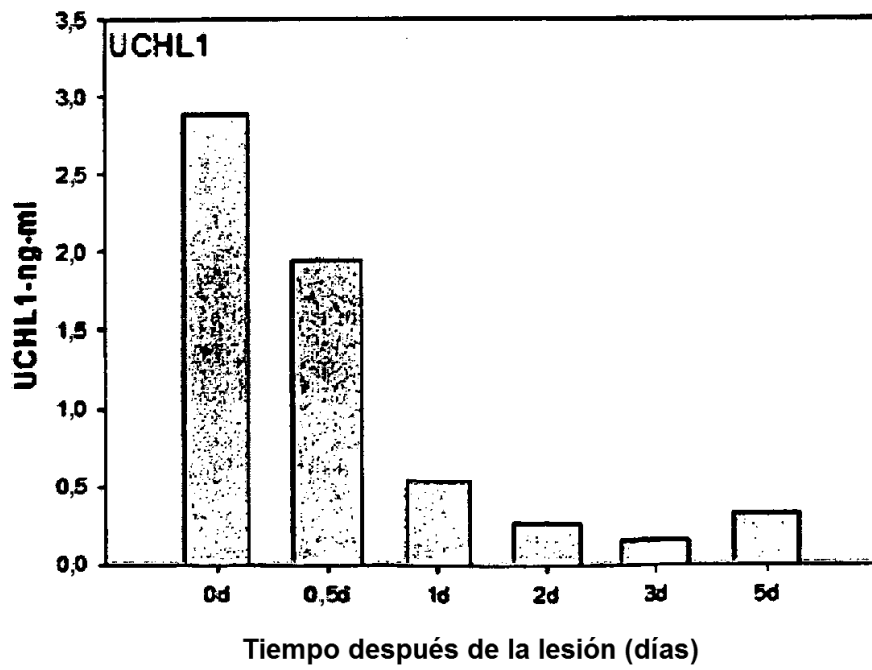


FIGURA 9B