

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 520**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12Q 1/533 (2006.01)
G01N 33/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2009 E 09733002 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2279413**

54 Título: **Métodos, anticuerpos y kits para la detección de líquido cefalorraquídeo en una muestra**

30 Prioridad:

14.04.2008 US 102091

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

19.11.2015

73 Titular/es:

**STONY BROOK ANAESTHESIOLOGY, U.F.P.C.
(100.0%)**

**Suny, Stony Brook, HSC, L4 060
Stony Brook, NY 11794-8480, US**

72 Inventor/es:

PENTYALA, SRINIVAS, N.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 551 520 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

Métodos, anticuerpos y kits para la detección de líquido cefalorraquídeo en una muestra

5 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

En el presente documento se divulgan composiciones y métodos para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo (LCR) en una muestra, en particular para el análisis de la proteína de LCR sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina (L-PGDS).

10

ANTECEDENTES

El bloqueo neuronal se asocia con muchas complicaciones. Entre las complicaciones más temidas está la penetración accidental, desapercibida de compartimentos del sistema nervioso que contienen líquido cefalorraquídeo (LCR). Si la punción en el LCR no se advierte inmediatamente, o si se diagnostica incorrectamente, la posterior administración de fármacos puede conducir a la parálisis o a la muerte. A pesar de su uso generalizado durante la cirugía, el parto y en el alivio del dolor, los métodos actuales para detectar LCR durante y después de un bloqueo neuronal son poco fiables, costosos y requieren mucho tiempo.

15

20

Los pacientes sometidos a anestesia epidural y analgesia están en particular riesgo de una punción con aguja dentro del LCR. El espacio epidural se identifica antes del bloqueo mediante la pérdida de resistencia a la inyección de aire con la jeringa, o de soluciones acuosas conteniendo sal o azúcar. La colocación de la aguja en el espacio epidural es seguida por la inyección de fármacos disueltos en soluciones acuosas conteniendo azúcar o sal en incrementos seriados. Si el bloqueo epidural se va a mantener durante un intervalo prolongado, puede ensartarse un catéter a través de la aguja para la inyección continua e intermitente de soluciones conteniendo fármacos. Dado que la penetración de la duramadre y la entrada no intencionada dentro del LCR es posible en cualquier etapa, se constatan de forma rutinaria el drenaje pasivo de LCR en la aguja y en el catéter, y el aspirado antes de cada manipulación y administración de fármacos para constatar retorno de fluido. Si el LCR está presente (una situación denominada "punción húmeda" (*Wet Tap*)), para evitar que haya bloqueo raquídeo en lugar de epidural tras la inyección del fármaco, puede necesitarse el reposicionamiento de la aguja o el catéter.

25

30

Aunque la identificación inequívoca de LCR drenado o aspirado es esencial para la realización segura de la anestesia epidural, los cuidadores a menudo no están seguros acerca del origen del fluido que puede estar presente. El LCR es claro y acuoso, por lo tanto se asemeja estrechamente a soluciones que contienen azúcar o sal y a mezclas de fármacos. En el pasado, los esfuerzos para discriminar el LCR de fluidos inyectados o acumulados se basaban en propiedades físicas tales como temperatura o precipitación *in vitro* con segundos compuestos, o en la medición de posibles constituyentes químicos del fluido en cuestión, tales como glucosa, proteína o niveles iónicos. Sin embargo, estos métodos son raramente útiles y poco utilizados debido a la mezcla de la muestra, a la variabilidad en la precisión del ensayo y a los umbrales de ensayo inconsistentes.

35

40

Actualmente, la medición de la transferrina beta-2 en una muestra es el único ensayo de laboratorio en alcanzar una práctica clínica capaz de la discriminación inequívoca de LCR, pero su uso se obstaculiza en muchos aspectos. Se debe proporcionar cada muestra en un elevado volumen, requiriéndose tanto como 1-2 ml de muestra/prueba. El plazo de respuesta para que los resultados lleguen al personal sanitario es de hasta cuatro días. Puesto que es necesaria la electroforesis de inmunofijación para detectar la transferrina beta-2, la prueba es cara (230-300 \$/muestra), y acarrea múltiples costes añadidos por la manipulación de la muestra de ensayo, archivo, envío y almacenamiento. Por otra parte, se requieren habilidades técnicas especiales y técnicos experimentados para asegurar la precisión y la fiabilidad del ensayo, obligando a que laboratorios de la especialidad realicen los ensayos de la transferrina Beta-2. El documento EP0913405 describe un anticuerpo monoclonal que reconoce de forma específica L-PGDS, un hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal, los métodos para la detección mediante dicho anticuerpo monoclonal de L-PGDS o enfermedades, y un kit para la detección de L-PGDS que contiene dicho anticuerpo monoclonal.

45

50

Claramente, hay una gran necesidad de un método rápido, robusto, eficiente en costos y preciso para identificar sin ambigüedades LCR en muestras obtenidas en la cabecera del paciente durante o después del bloqueo neuronal.

55

SUMARIO

En el presente documento se divulgan composiciones y métodos para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra, en particular para el análisis de la proteína de LCR sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina (L-PGDS). Se divulgan en el presente documento pruebas para el análisis de L-PGDS indicando la presencia o la ausencia de LCR en una muestra.

60

En una realización, incluido en el presente documento hay un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a VQPNFQPKFLGC (SEC ID N°: 1). También se incluye un hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal.

65

En otra realización, incluido en el presente documento hay un dispositivo de inmunoensayo adecuado para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra que se sospecha que contiene líquido cefalorraquídeo, comprendiendo un soporte que comprende un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a VQPNFQPKFLGC (SEC ID N°: 1).

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la anatomía de la columna vertebral y la colocación de una punta de aguja dentro del espacio epidural. El LCR rodea y amortigua la médula espinal y el cono medular. La presencia de LCR en el drenaje o aspirado del catéter o la aguja indica la penetración de la membrana de la duramadre. Idénticos fármacos y dosificaciones administrados en los compartimentos epidural y raquídeo tienen cinéticas ampliamente divergentes (por ejemplo, el tiempo de inicio, en la duración de los efectos), y consecuencias psicológicas (por ejemplo, la extensión del bloqueo motor, sensorial y autonómico) debido a la distribución diferencial de los agentes farmacológicamente activos.

La Figura 2 muestra la detección mediada por anticuerpo de PGDS en LCR y otros fluidos corporales. La Figura 2A muestra la unión específica del anticuerpo anti-PGDS a PGDS de una fuente de LCR, y la ausencia de PGDS en muestras de otras fuentes. La Figura 2B muestra la detección de PGDS con el anticuerpo anti-PGDS en muestras de LCR provenientes de 12 fuentes de ser humano diferentes. La Figura 2C muestra la ausencia de PGDS en eluatos epidurales, y la detección de la presencia de PGDS en LCR, mediante la unión del anticuerpo anti-PGDS en muestras provenientes de 2 y 3 sujetos, respectivamente.

La Figura 3 muestra la detección in situ de PGDS mediada por anticuerpo anti-PGDS, en la cabecera del paciente, configurada como una varilla absorbente. La presencia de una banda indicadora de oro coloidal en la fase sólida después de la inmersión indica la presencia de LCR en la muestra de ensayo.

La Figura 4 representa una realización de un dispositivo; y

Las Figuras 5A y 5B representan el mecanismo de acción de un dispositivo.

Las Figuras 6-8 muestran los resultados de las representaciones de antigenicidad para L-PGDS.

La Figura 9 muestra una exploración por transferencia puntual de la reactividad con L-PGDS recombinante de los clones de hibridoma.

La Figura 10 muestra muestras de PGDS recombinante y LCR transferidas a una membrana de PVDF utilizando un aparato de transferencia puntual y sondeadas con líquido ascítico de hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales anti L-PGDS.

La Figura 11 muestra una transferencia puntual ilustrando la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-L-PGDS con L-PGDS natural y desnaturalizada.

La Figura 12 muestra muestras obtenidas durante procedimientos epidurales en las que se evaluó la presencia de L-PGDS mediante el sondeo con un anticuerpo monoclonal contra L-PGDS, como se divulga en el presente documento.

15

20

25

30

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al péptido VQPNFQPKFLGC (SEC ID N°: 1); hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales; dispositivos y kits comprendiendo los anticuerpos monoclonales, y métodos de uso de los mismos. Los anticuerpos son particularmente útiles en la detección de filtraciones de LCR en muestras que se sospecha que contienen LCR. Especialmente, los anticuerpos que se divulgan en el presente documento son reactivos con L-PGDS natural, es decir plegada, por lo tanto son adecuados para pruebas que incluyen la detección de la proteína natural tales como ensayos de flujo lateral.

El LCR es un líquido claro similar en apariencia al agua y en composición al plasma. El LCR hace boyantes y protege al cerebro y a la médula espinal. Los eventos clínicos, quirúrgicos y accidentales pueden provocar que el LCR traspase sus barreras fisiológicas. Las filtraciones de LCR pueden producirse con la colocación de agujas y catéteres para anestesia y analgesia, traumatismo, fracturas craneales, procedimientos quirúrgicos intracraneales, infección, hidrocefalia, malformaciones congénitas, neoplasias, y rinorrea espontánea, y otorrea.

El riesgo de punción de la duramadre y de entrada en el LCR es particularmente alto en anestesia y analgesia epidural. Los opioides epidurales y anestésicos locales son los más comúnmente inyectados en la región lumbar o torácica. La aguja para el bloqueo neuronal epidural pasa entre las vértebras de la columna vertebral dentro del espacio epidural. El espacio epidural normalmente carece de fluidos, y la distancia que lo atraviesa es pequeña (FIG. 1). Si se avanza con la aguja epidural demasiado lejos, esta perforará la duramadre, que contiene la médula espinal, los nervios raquídeos y el LCR. Un orificio en la duramadre puede permitir la filtración del LCR dentro del espacio espinal provocando cefaleas severas. En pacientes con presión intracraneal aumentada, la punción accidental de la duramadre hecha durante la localización del espacio epidural expone a la herniación cerebelar o tentorial debido a la pérdida de LCR. Otras complicaciones serias incluyen parálisis permanente, paro cardíaco y muerte.

El bloqueo raquídeo derivado de la administración de fármacos no deseada en el LCR es de gran preocupación para los anestesiólogos. Esta administración puede producirse si la medicación destinada al espacio epidural se administra erróneamente en el líquido cefalorraquídeo, provocando hipertensión súbita y profunda, parálisis de las extremidades inferiores, ventilación deteriorada y trastornos del ritmo cardíaco. Para prevenir y diagnosticar estas

65

afecciones, el anestesiólogo evalúa cuidadosamente y observa la reacción del paciente para ensayar dosis de anestésicos o de los fármacos analgésicos. Sin embargo, en el momento actual, no hay un método rápido y fiable para evaluar la incidencia de la punción de la duramadre y la filtración de LCR durante procedimientos tales como éstos, que se realizan por miles cada día.

El método óptimo para detectar la punción de la duramadre es ensayar la presencia o la ausencia de LCR. El análisis químico de glucosa, proteína, potasio o sodio en el fluido es poco fiable como medio para determinar si el fluido es LCR. Los estudios radiográficos son exitosos sólo de forma intermitente en demostrar filtraciones de LCR pequeñas o tardías, son engorrosos, costosos, llevan mucho tiempo, y acarrear riesgos de exposición a la radiación y a colorantes radioisotópicos. La electroforesis de fluidos de una fuente sospechosa de LCR, combinada con inmunofijación para detectar a la proteína constituyente de LCR transferrina Beta-2 ha mostrado ser un método de detección de LCR específico y generalmente aceptado. Sin embargo, la prueba de la transferrina Beta-2 necesita la coordinación de múltiples etapas de adquisición y manipulación, es prohibitivamente largo para su uso durante y después del bloqueo neuronal (4 días), y es cara (300 \$/prueba).

La sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina (L-PGDS), también denominada proteína Beta-traza, se secreta en el LCR después de la producción en el plexo coroideo, leptomeninges, y oligodendrocitos del sistema nervioso central. La L-PGDS cataliza la isomerización de la prostaglandina H2 a prostaglandina D2 (PGD), la que sirve como un componente endógeno promotor del sueño. En comparación con la transferrina, para la cual sólo la isoforma beta-2 es específica del LCR, la estructura completa de L-PGDS es específica del LCR. De esta forma, L-PGDS es preferida para su uso como un indicador rápido y específico de la presencia o la ausencia de LCR.

Experimentos realizados durante el transcurso del desarrollo de las composiciones y métodos divulgados demostraron que L-PGDS es un marcador fiable de LCR, y es menos caro y lleva menos tiempo que los métodos convencionales. En el presente documento se proporcionan métodos y kits nuevos para la detección rápida de LCR en muestras obtenidas antes, durante y después del bloqueo neuronal. El uso de los métodos y composiciones divulgados en el presente documento asegura una realización más segura del bloqueo neuronal, y reduce la incidencia y severidad de las complicaciones que ponen la vida en peligro.

Se divulga en el presente documento un método para la detección de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende proporcionar una muestra que se sospecha que contiene líquido cefalorraquídeo, y detectar la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en dicha muestra. Se pueden detectar uno o más compuestos adicionales, solos o en combinación con la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina, tal como la transferrina beta-2. El sujeto puede tener otorrea espontánea, rinorrea o puede haberse sometido a traumatismo o cirugía. El sujeto puede estar sometido, o haberse sometido, a bloqueo neuronal.

Se divulga en el presente documento un método en el cual la cantidad de sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina se correlaciona con un valor conocido para determinar la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en la muestra. La presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra comprende determinar la cantidad de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en la muestra. La sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina puede estar presente a una concentración de menos de aproximadamente 2,0 mg/l, o a una concentración de entre aproximadamente 2,0 mg/l y aproximadamente 6,0 mg/l, o a una concentración de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 10,0 mg/l, o a una concentración mayor de aproximadamente 10,0 mg/l.

También se divulga en el presente documento un método para determinar la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende determinar la proporción entre la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en el suero, y la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra. La proporción puede ser de menos de 10, o de entre 10 y 20, o mayor de 20.

En el presente documento se divulga adicionalmente un método para la detección de líquido cefalorraquídeo en una muestra, en el que la muestra se obtiene a partir de una apertura superficial del cuerpo, o a partir de una aguja en el cuerpo. Como alternativa, la muestra fluye libremente o es aspirada. La muestra se obtiene a partir de un catéter y puede fluir libre del catéter o aspirarse a partir de un catéter. La muestra se puede obtener a intervalos seriados durante el tiempo que el catéter esté en su sitio. La muestra puede obtenerse antes de la colocación del catéter o después de la colocación del catéter.

La muestra se puede obtener antes de la administración de líquido, o después de la administración de líquido. La muestra se puede obtener antes o después de la administración de un fármaco.

El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede estar sometiéndose a cirugía. El sujeto puede estar sometiéndose a tratamiento del dolor agudo. El sujeto puede estar sometiéndose a tratamiento del dolor después de una cirugía. El sujeto puede estar sometiéndose a tratamiento del dolor después de un traumatismo. El sujeto puede estar sometiéndose a tratamiento del dolor durante el parto y el alumbramiento. El sujeto puede estar sometiéndose a tratamiento del dolor crónico. El dolor puede comprender dolor maligno. El dolor puede comprender dolor no maligno.

También se divulga en el presente documento un método para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra de un sujeto sometido a bloqueo neuronal, en el que el bloqueo neuronal comprende analgesia regional. La analgesia regional puede comprender analgesia raquídea. La analgesia raquídea puede comprender una dosis única de fármaco. La analgesia raquídea puede ser continua a través de un catéter. La analgesia regional puede comprender analgesia epidural. La analgesia epidural puede comprender una dosis única de fármaco. La analgesia epidural puede ser continua a través de un catéter. La analgesia regional puede ser analgesia raquídea y epidural combinadas. La analgesia regional puede comprender el bloqueo de un nervio periférico. La analgesia regional puede comprender un bloqueo del plexo neural. La analgesia regional puede comprender un sistema implantado de administración de fármacos. La analgesia regional puede comprender un estimulador nervioso.

En el presente documento se divulga un método para la detección de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende proporcionar una muestra de un sujeto, y detectar la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en dicha muestra utilizando un método adecuado. En algunas realizaciones, la detección comprende la unión diferencial de anticuerpo. En una realización específica, la detección comprende un inmunoensayo *in situ*. En una realización, la detección comprende un inmunoensayo *in situ* utilizando un marcador de oro coloidal. En otras realizaciones, la unión diferencial de anticuerpo comprende una transferencia de Western. En otras realizaciones más, la unión diferencial de anticuerpo comprende una prueba nefelométrica. La presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra se detecta mediante una prueba cromatográfica. La presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra se detecta mediante una prueba enzimática. La presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra se detecta mediante una prueba espectroscópica. El método forma parte de la invención cuando la muestra se pone en contacto con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2.

Se divulga adicionalmente un kit que comprende un reactivo para la detección de la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra antes, durante o después de un bloqueo neuronal. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para el uso del kit para la detección de la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra. Las instrucciones pueden comprender instrucciones requeridas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para kits de diagnóstico *in vitro*. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para el diagnóstico de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra basándose en la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en dicha muestra. El reactivo puede comprender uno o más anticuerpos. El reactivo puede comprender una o más enzimas, inhibidores de enzimas o activadores de enzimas. El reactivo puede comprender uno o más compuestos cromatográficos. El reactivo puede comprender uno o más compuestos utilizados para preparar la muestra para prueba espectroscópica. El kit puede comprender material de referencia comparativo para interpretar la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina de acuerdo a la intensidad, espectro de color u otros atributos físicos de un indicador. El kit de acuerdo con la reivindicación 8 forma parte de la invención.

Por lo tanto, en un aspecto, en el presente documento se divulga un método para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende las etapas de: (1) proporcionar una muestra de un sujeto; (2) analizar la presencia o la ausencia en la muestra de sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina; y (3) correlacionar la presencia o la ausencia de sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina con la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en la muestra.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un dispositivo para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende: una membrana absorbente que comprende una zona de muestra que comprende un primer anticuerpo monoclonal contra sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina; una zona de ensayo que comprende un segundo anticuerpo monoclonal o policlonal contra la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina inmovilizado en la membrana; y una zona de control que comprende un anticuerpo de control. El dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 4 y 6 forma parte de la invención.

Definiciones

A continuación se definirán un número de términos para facilitar la comprensión de la divulgación.

Según se usa en el presente documento, el término "sujeto" abarca a seres humanos y a animales, estén o no hospitalizados.

Según se usa en el presente documento, el término "L-PGDS" o la expresión "sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina" se usan con referencia a una proteína específica que se secreta en el LCR después de su producción en el plexo coroideo, leptomeninges, y oligodendrocitos del sistema nervioso central, que cataliza la isomerización de la prostaglandina H2 a prostaglandina D2, y que se correlaciona con la presencia o la ausencia de LCR. La definición anterior de L-PGDS sirve para distinguir esta proteína de PGDS tipo hematopoyético.

- 5 Según se usa en el presente documento, "bloqueo neural" se refiere a la administración de agonistas y antagonistas de receptores celulares, en directa proximidad a las estructuras neuronales diana, a efectos de interferir con la transmisión neuronal. El bloqueo neural incluye, pero sin limitación, anestesia regional (por ejemplo, anestesia raquídea, epidural, periférica o de plexo), y analgesia regional (por ejemplo, analgesia raquídea, epidural, periférica o plexal).
- Según se usa en el presente documento, la expresión "sometiéndose" se usa en referencia a ser sujeto a bloqueo neural.
- 10 Según se usa en el presente documento, la expresión "dolor maligno" se refiere a dolor derivado de un origen canceroso o neoplásico que incluye presión, isquemia, necrosis, obstrucción y otras consecuencias del emplazamiento y crecimiento del tumor.
- 15 Según se usa en el presente documento, la expresión "dolor no maligno" se refiere a dolor derivado de causas distintas que cáncer.
- Según se usa en el presente documento, la expresión "analgesia regional" se usa en referencia a bloqueo neural para referirse a agentes y procedimientos usados para reducir o eliminar el dolor en una región del cuerpo sin interferencia directa con la conciencia.
- 20 Según se usa en el presente documento, el término "continuo" se usa en referencia al bloqueo neural en el que los fármacos se infunden sin interrupción a través de un catéter al sitio de acción deseado.
- 25 Según se usa en el presente documento, el término "raquídeo" se usa en referencia al bloqueo neural para referirse a la administración de un fármaco o fármacos por debajo de la duramadre y en el líquido cefalorraquídeo.
- Según se usa en el presente documento, el término "epidural" se usa en referencia al bloqueo neural para referirse a la administración de un fármaco o fármacos en el espacio epidural externo a la membrana dural del sistema nervioso.
- 30 Según se usa en el presente documento, el término "periférico" se usa en referencia al bloqueo neural para referirse a la administración de un fármaco o fármacos, directamente en la proximidad de un nervio periférico externo al sistema nervioso central.
- 35 Según se usa en el presente documento, el término "plexo" se usa en referencia al bloqueo neural en referencia a la administración de un fármaco o fármacos directamente en la proximidad de un plexo nervioso externo al sistema nervioso central.
- Según se usa en el presente documento, la expresión "sistema implantado de administración de fármacos" se usa para referirse a un dispositivo intravascular en el organismo capaz de proporcionar uno o más fármacos al sistema nervioso (por ejemplo, a través de un catéter) bien como una infusión continua o en respuesta a la demanda del paciente.
- 40 Según se usa en el presente documento, la expresión "estimulador nervioso" se usa en referencia a un dispositivo intravascular en el organismo capaz de proporcionar corriente eléctrica o voltaje constante o intermitente, para el alivio del dolor maligno y del no maligno.
- 45 Cuando en el presente documento se hace referencia a una "secuencia de aminoácidos" se refiere a una secuencia de aminoácidos de una molécula proteica de origen natural, "secuencia de aminoácidos" y expresiones similares, tales como "polipéptido" o "proteína" no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia completa, natural, asociada con la molécula proteica indicada.
- 50 Los términos "fragmento" o "parte" como se usan en el presente documento se refieren a un polipéptido que tiene una deleción amino terminal y/o carboxilo terminal en comparación con la proteína natural, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de ADNc de longitud completa. Típicamente, los fragmentos son al menos de 4 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos de 20 aminoácidos de longitud, usualmente al menos de 50 aminoácidos de longitud, o más largos, y se extienden a lo largo de la parte del polipéptido necesaria para la unión intramolecular de las composiciones con sus diversos ligandos y/o sustratos.
- 55 Según se usa en el presente documento, los términos "purificado" o "para purificar" se refieren a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos contra L-PGDS se purifican mediante la eliminación de proteínas contaminantes que no son inmunoglobulinas; también se purifican mediante la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a L-PGDS. La eliminación de proteínas que no son inmunoglobulinas y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a L-PGDS, lo que da como resultado un aumento en el porcentaje de las inmunoglobulinas reactivas a L-PGDS en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes de L-
- 60
- 65

5 PGDS se expresan en células hospedadoras bacterianas y los polipéptidos se purifican mediante la eliminación de proteínas de la célula hospedadora; aumentándose por lo tanto el porcentaje de polipéptidos recombinantes de L-PGDS en la muestra. La expresión “molécula de ADN recombinante” según se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que se comprende de segmentos de ADN unidos juntos por medio de técnicas de biología molecular.

La expresión “proteína recombinante” o “polipéptido recombinante” según se usa en el presente documento se refiere a una molécula proteica que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante.

10 La expresión “proteína natural” según se usa en el presente documento indica la forma funcional de una proteína, que también recibe el nombre de la proteína en su estado plegado tridimensional. Una proteína natural puede producirse mediante medios recombinantes o puede aislarse a partir de una fuente de origen natural.

15 La expresión “transferencia de Western” se refiere al análisis de proteínas(s) (o polipéptidos) inmovilizadas sobre un soporte tal como nitrocelulosa o una membrana. Las proteínas se procesan en geles de acrilamida para separar las proteínas, seguido de la transferencia de la proteína desde el gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Después se exponen las proteínas inmovilizadas a anticuerpos con reactividad contra un antígeno de interés. La unión de los anticuerpos se puede detectar mediante diversos métodos, incluyendo el uso de anticuerpos radiomarcados.

20 La expresión “determinante antigénico”, según se usa en el presente documento, se refiere a esa parte de un antígeno que hace contacto con un anticuerpo particular (es decir, un epítipo). Cuando una proteína o fragmento de una proteína se usa para inmunizar a un animal hospedador, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen de forma específica a una dada región o a una estructura tridimensional en la proteína; estas regiones o estructuras reciben el nombre de determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el “inmunógeno” utilizado para producir una respuesta inmunitaria) en la unión a un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo monoclonal se une de forma específica a un determinante antigénico en la superficie de la proteína natural, es decir, un determinante antigénico en la superficie accesible a disolvente de la proteína.

30 Según se usa en el presente documento, la expresión “prueba nefelométrica” se usa para referirse a una prueba desarrollada por Dade Behring (Liederbach, Alemania), que consiste de partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos policlonales de conejo contra PGDS de ser humano, purificados por inmunoafinidad. El aumento en la dispersión de luz provocada por aglutinación se mide mediante absorción de luz láser.

35 El término “muestra” según se usa en el presente documento se usa su sentido más amplio. Una muestra que se sospecha que contiene una proteína puede comprender una célula o estar libre de células, una parte de un tejido, un extracto conteniendo una o más proteínas, o fluidos corporales. Una muestra “de flujo libre” se refiere al drenaje pasivo de fluido corporal a partir de una aguja, catéter u otro instrumento que penetra un compartimento corporal. En una realización, una muestra es una muestra que se sospecha que contiene líquido cefalorraquídeo.

40 Según se usa en el presente documento, el término “respuesta”, cuando se usa en referencia a una prueba, se refiere a la generación de una señal detectable (por ejemplo, la acumulación de una proteína indicadora, el aumento de la concentración iónica, y la acumulación de un producto químico detectable).

45 Según se usa en el presente documento, la expresión “instrucciones para usar dicho kit para dicha detección de la presencia o la ausencia del polipéptido de L-PGDS en dicha muestra biológica” incluye instrucciones para el uso de reactivos contenidos en el kit para la detección de polipéptidos de L-PGDS. Las instrucciones pueden comprender adicionalmente la declaración del uso pretendido requerida por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) en el marcaje de productos de diagnóstico *in vitro*. La FDA clasifica al diagnóstico *in vitro* como dispositivos médicos y requiere que ellos se aprueben a través del procedimiento 510(k). La información requerida en una solicitud con arreglo al 510(k) incluye: 1) El nombre del producto de diagnóstico *in vitro*, incluyendo el nombre o denominación comercial, el nombre común o habitual, y el nombre de clasificación del dispositivo; 2) El uso pretendido del producto; 3) el número de registro del establecimiento, si es aplicable, del dueño u operario que presenta la presentación 510(k); la clase en la que el producto de diagnóstico *in vitro* se localizó bajo la sección 513 del Acto FD&C, si se conoce, su panel apropiado, o, si el dueño u operario determina que el dispositivo no se clasifica bajo tal sección, una declaración de esa determinación y las bases para la determinación de que el producto de diagnóstico *in vitro* no se clasifica así; 4) las etiquetas, el etiquetado y las publicidades propuestas suficientes para describir el producto de diagnóstico *in vitro*, su uso pretendido, y las direcciones de uso. Cuando sea aplicable, deberían proporcionarse fotografías o dibujos de ingeniería; 5) una declaración indicando que el dispositivo es similar a y/o diferente de otros productos de diagnóstico *in vitro* de tipo comparable en la distribución comercial en los Estados Unidos, acompañado de datos que apoyan la declaración; 6) un sumario 510(k) de los datos de seguridad y eficacia sobre los que se basa la determinación de equivalencia sustancial; o una declaración de que la información de seguridad y eficacia 510(k) apoyando el hallazgo de la FDA de equivalencia sustancial se hará disponible a cualquier persona dentro de los 30 días de una solicitud por escrito; 7) una declaración de que el solicitante cree, hasta donde sabe, que todos los datos y la información presentada en la notificación previa a la

comercialización son veraces y precisos, y que no se omite ningún hecho material; 8) cualquier información adicional con respecto al producto de diagnóstico *in vitro* requerida que sea necesaria para la FDA para hacer una determinación de equivalencia sustancial. Hay disponible información adicional en la página web de internet de la FDA de los Estados Unidos.

5 Según se usa en el presente documento, la expresión "apertura superficial" se refiere a una apertura natural o adquirida en la superficie del cuerpo.

10 Como se indica anteriormente, en el presente documento se divulga un método para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende las etapas de: (1) proporcionar una muestra de un sujeto; (2) analizar en la muestra la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina (L-PGDS); y (3) correlacionar la presencia o la ausencia de la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina con la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en la muestra. Cada una de estas etapas se explica con más detalles más adelante.

15 Como se indica anteriormente, se define muestra en su sentido más amplio e incluye extractos celulares o extractos libres sin células, una parte de un tejido, un extracto conteniendo una o más proteínas, o fluidos corporales. La muestra puede obtenerse de sujetos mediante drenaje pasivo de fluido corporal de una jeringa, catéter u otro instrumento que penetra un compartimento corporal.

20 Detección de la proteína L-PGDS

25 Como se describe anteriormente, se ha desarrollado un nuevo método de detección o análisis de la presencia o la ausencia de LCR. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para detección de L-PGDS en una muestra de un sujeto, incluyendo sujetos sometidos o habiéndose sometido a bloqueo neural. Se usa un método adecuado para detectar o analizar polipéptidos de L-PGDS. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un método cromatográfico en el que la presencia de L-PGDS produce un cambio de color detectable. También se divulga un método enzimático en el que se utiliza que la presencia de L-PGDS inicia una activación enzimática detectable. La presencia de L-PGDS se detecta mediante absorción atómica o espectroscopia de emisión atómica. 30 También se divulga un anticuerpo monoclonal específico contra un epítipo de superficie de L-PGDS, tal como VQPNFQQDKFLGR. El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 y 2 se utiliza en los métodos de la invención.

35 En ciertas realizaciones, la proteína L-PGDS (que también recibe el nombre de "isomerasa D de prostaglandina H2", y de "proteína beta-traza") es una glucoproteína con una masa molecular de aproximadamente 26 kDa (EC 5.3.99.2) que pertenece a la familia de las lipocalinas de proteínas secretoras. En realizaciones preferidas la proteína L-PGDS cataliza la isomerización de PGH₂ para producir PGD₂. En realizaciones adicionales el ADNc de L-PGDS de ser humano codifica 190 restos de aminoácidos con un péptido señal N-terminal de 22 restos de aminoácidos. La proteína L-PGDS es la isoforma "tipo cerebral" con N-glucosilación de cadenas de oligosacáridos específica de cerebro. 40

45 Los anticuerpos monoclonales proporcionados en el presente documento detectan L-PGDS (en su forma natural o desnaturalizada) en cada muestra de LCR ensayada (especificidad del 100 %). De acuerdo con informes publicados, L-PGDS está en una concentración en LCR de 8000 ng/1000 µl. Los ensayos de laboratorio muestran que los anticuerpos monoclonales divulgados en el presente documento pueden detectar esta proteína marcadora en una concentración tan baja como 2-4 ng, indicando la alta sensibilidad de los anticuerpos.

50 De acuerdo con la invención, el anticuerpo monoclonal aislado de la invención se usa para determinar si una muestra contiene L-PGDS, indicando la presencia o la ausencia de LCR (véase más adelante Generación de anticuerpos contra L-PGDS). La unión del anticuerpo se detecta mediante técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (prueba inmunoabsorbente ligada a enzima), inmunoensayos tipo "sándwich", pruebas inmunoradiométricas, reacciones de precipitación de difusión en gel, pruebas de inmunodifusión, inmunoensayo *in situ* (usando, por ejemplo, marcadores de oro coloidal, enzimáticos o radioisótopos), transferencias de Western, reacciones de precipitación, pruebas de aglutinación (por ejemplo, pruebas de aglutinación en gel, pruebas de hemoaglutinación, etc.), pruebas de fijación del complemento, pruebas de inmunofluorescencia, pruebas de proteína A, y pruebas de inmunoelectroforesis, etc. 55

60 En una realización, la unión del anticuerpo se detecta mediante la detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos métodos en la técnica para la detectar unión en un inmunoensayo.

65 En algunas realizaciones, se utiliza una prueba de detección automatizada. Los métodos para la automatización de inmunoensayos incluyen aquellos escritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.885.530, 4.981.785, 6.159.750 y 5.358.691. En algunas realizaciones, el análisis y presentación de los resultados también se automatiza. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un programa informático que genera un valor que se correlaciona con la

presencia de PGDS y la probabilidad de que LCR esté presente en una muestra, basándose en el resultado del inmunoensayo.

En otras realizaciones, el inmunoensayo es como se describe en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.599.677 y 5.672.480.

Generación de anticuerpos contra L-PGDS

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos aislados o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab y fragmentos Fab₂). Los anticuerpos pueden generarse para permitir la detección de la proteína L-PGDS. Los anticuerpos se preparan utilizando diversos inmunógenos. El inmunógeno puede ser un péptido de L-PGDS de ser humano para generar anticuerpos que reconozcan L-PGDS de ser humano. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena única, fragmentos Fab, bibliotecas de expresión de Fab, o recombinantes (por ejemplo, quiméricos, humanizados, etc.), siempre que estos puedan reconocer la proteína. Los anticuerpos pueden producirse mediante el uso de una proteína o péptido como el antígeno, de acuerdo a un proceso convencional de preparación de anticuerpo o antisuero.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica se pueden usar para la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra PGDS. Para la producción de un anticuerpo, diversos animales hospedadores pueden inmunizarse mediante inyección con el péptido correspondiente al epitopo de L-PGDS incluyendo, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, oveja, cabras, etc. En una realización específica, el péptido se conjuga a un transportador inmunogénico (por ejemplo, toxoide diftérico, albúmina de suero bovino (BSA), o hemocianina de lapa californiana (KLH)). Dependiendo de la especie hospedadora, diversos adyuvantes pueden utilizarse para incrementar la respuesta inmunológica incluyendo, pero sin limitación, el de Freud (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes de ser humano potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*).

Par la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia L-PGDS, se contempla que encontrará uso en el presente documento una técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo (véase por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Estas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B de ser humano (véase por ejemplo, Kozbor *et al.*, *Immunol. Tod.*, 4:72, 1983), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales de ser humano (Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies y Cáncer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96, 1985).

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en animales libres de gérmenes, utilizando tecnología tal como la descrita en el documento PCT/US90/02545). Además, se contempla que se generarán anticuerpos de ser humano mediante hibridomas de ser humano (Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030 [1983]) o mediante la transformación *in vitro* de células B de ser humano con el virus EBV (Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77-96 [1985]).

Además, se contempla que las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (patente de los Estados Unidos n.º 4.946.778) encontrarán uso en la producción de anticuerpos de cadena única específicos contra L-PGDS. También pueden utilizarse las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse *et al.* *Science* 246:1275-1281, 1989), para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por L-PGDS.

En una realización, el anticuerpo monoclonal es específico para la proteína L-PGDS natural. Dicho anticuerpo monoclonal es preferido para el uso en un dispositivo de flujo lateral. Sin embargo, la estructura cristalina de L-PGDS no está disponible públicamente. En una realización, para identificar la superficie de L-PGDS se emplea un programa-bioinformático llamado "Antigenicity Plot", en el que la secuencia proteica de L-PGDS es sujeta a análisis de antigenicidad, y se analiza el posicionamiento de superficie de las secuencias peptídicas altamente antigénicas resultantes mediante la generación de una estructura 3D virtual de la L-PGDS. Se siguen varios criterios para determinar los fragmentos peptídicos de PGDS que probablemente son antigénicos. Estas reglas se estipulan también para aumentar la probabilidad de que un anticuerpo reconozca la proteína natural. Las predicciones se basan en la aparición de restos aminocídicos en epítopos segmentarios conocidos de forma experimental. Se siguen los siguientes criterios para determinar la mejor probabilidad de antigenicidad de un péptido de L-PGDS de generar anticuerpos que puedan detectar la proteína natural: (1) péptidos localizados en regiones accesibles a disolvente y que contienen tanto restos hidrófobos como hidrófilos; (2) péptidos situados en bucles largos que conectan motivos estructurales secundarios, evitando péptidos localizados en regiones helicoidales; (3) péptidos que están en la regiones N y C-terminales de la proteína, dado que las regiones N y C-terminales de las proteínas son normalmente accesibles a disolvente y desestructuradas, los anticuerpos contra esas regiones probablemente también reconozcan la proteína natural; (4) ambos extremos N y C-terminales están abiertos en el estado natural; (6) la presencia de otros restos de aminoácidos que son hidrófilos, más cercanos a la secuencia peptídica; (7) el área de la

superficie de la secuencia es accesible en la estructura; y (8) la estructura de la secuencia es propia de la proteína de interés y tiene una baja probabilidad de similaridad con otras secuencias de otras proteínas (como se analiza mediante búsqueda "BLAST"). Los péptidos altamente antigénicos de L-PGDS se identificaron basándose en la aplicación rigurosa de los criterios anteriores, para obtener una secuencia peptídica que se ajuste o se acerque a los criterios mencionados anteriormente, es decir, VQPNFQQDKFLGR.

En otras realizaciones, se contemplan anticuerpos recombinantes para L-PGDS, o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos recombinantes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos humanizados y quiméricos. En la técnica se conocen métodos para generar anticuerpos recombinantes (véase por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 6.180.370 y 6.277.969 y "Monoclonal Antibodies" H. Zola, BIOS Scientific Publishers Limited 2000. Springer-Verlag New York, Inc., N.Y.).

Se contempla que una técnica adecuada para producir fragmentos de anticuerpos, encontrará uso en la generación de fragmentos de anticuerpos que contengan el idiotipo (región de unión al antígeno) de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin limitación: el fragmento F(ab')₂ que puede producirse mediante la digestión de la molécula de anticuerpo con pepsina; los fragmentos Fab' que pueden generarse mediante la reducción de los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂, y los fragmentos Fab que pueden generarse mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, se contempla que la exploración del anticuerpo deseado se llevará a cabo mediante técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (prueba inmunoabsorbente ligada a enzima), inmunoensayos tipo "sándwich", pruebas inmunoradiométricas, reacciones de precipitación de difusión en gel, pruebas de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (por ejemplo, utilizando marcadores de oro coloidal, enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencias de Western, reacciones de precipitación, pruebas de aglutinación (por ejemplo, pruebas de aglutinación en gel, pruebas de hemoaglutinación, etc.), pruebas de fijación del complemento, pruebas de inmunofluorescencia, pruebas de proteína A y pruebas de inmunoelectroforesis, etc.

En una realización, la unión del anticuerpo se detecta mediante la detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo a un anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos medios en la técnica para la detección de la unión en un inmunoensayo, y están dentro del alcance de la presente divulgación. El péptido inmunogénico puede proporcionarse libre de la molécula transportadora usada en cualquier protocolo de inmunización. Por ejemplo, si el péptido se conjugó a KLH, éste se puede conjugar a BSA en una prueba de exploración, o usarse directamente).

Los anticuerpos anteriores pueden usarse en métodos conocidos en la técnica relativos a la localización y estructura de L-PGDS (por ejemplo, para transferencia de Western), midiendo los niveles de la misma en muestras biológicas apropiadas, etc. Los anticuerpos pueden utilizarse para detectar L-PGDS en una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica puede ser un fluido biológico, tal como, pero sin limitación, sangre, suero, plasma, fluido intersticial, orina, y líquido cefalorraquídeo.

Después, puede ensayarse directamente la presencia de L-PGDS de ser humano en las muestras biológicas, utilizando una estrategia (por ejemplo, ELISA o radioinmunoensayo) y un formato (por ejemplo, micropocillos, varilla (por ejemplo, como se describe en la publicación de la patente internacional WO 93/03367)), apropiados, etc. De forma alternativa, las proteínas en la muestra pueden separarse por tamaño (por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), con y sin dodecil sulfato sódico (SDS)), y la presencia de L-PGDS detectarse mediante inmunotransferencia (transferencia de Western). Las técnicas de inmunotransferencia generalmente son más eficaces con anticuerpos generados contra un péptido que corresponde a un epítipo de una proteína y, por lo tanto, son particularmente adecuadas para la presente divulgación.

La etapa de correlación mencionada anteriormente puede implementarse cualitativa o cuantitativamente, por ejemplo en una prueba fluorofórica o colorimétrica. Puesto que la sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina se encuentra en líquido cefalorraquídeo, en el método y el dispositivo cualquier indicación de sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina en una muestra puede correlacionarse directamente con la presencia de líquido cefalorraquídeo en esa muestra.

Kits y dispositivos para analizar la presencia o la ausencia de LCR

También se proporcionan kits y dispositivos para determinar si una muestra contiene L-PGDS. Los kits y dispositivos de diagnóstico se producen en una diversidad de modos. En la presente invención los reactivos comprenden al anticuerpo monoclonal aislado de la invención que preferencialmente se une a proteínas L-PGDS. También se divulgan kits y dispositivos que contienen al menos un reactivo para detectar de forma específica una proteína L-PGDS. Los kits y dispositivos tratados anteriormente pueden contener múltiples reactivos para la detección de la proteína L-PGDS.

En algunas realizaciones, el kit o dispositivo contiene instrucciones para determinar si la muestra contiene L-PGDS. En realizaciones específicas, las instrucciones especifican que la presencia o la ausencia de LCR se determina mediante la detección de la presencia o la ausencia de L-PGDS en una muestra del sujeto, donde los sujetos se están sometiendo o se han sometido a bloqueo neural.

5 La presencia o la ausencia de una L-PGDS en una muestra puede usarse para hacer decisiones terapéuticas u otras decisiones médicas. Por ejemplo, decidir si se utiliza el catéter existente en su sitio o si se reemplaza el catéter durante o después del bloqueo neuronal, puede basarse en la presencia o la ausencia de LCR conteniendo L-PGDS en una muestra obtenida del catéter.

10 En algunas realizaciones, los kits y dispositivos incluyen reactivos complementarios tales como agentes tamponadores, reactivos estabilizadores de proteínas, y sistemas de producción de señal (por ejemplo, sistemas de generación de fluorescencia tales como sistemas FRET. El kit o dispositivo de ensayo está envasado en una manera adecuada, típicamente con los elementos en un único recipiente o diversos recipientes según sea necesario, junto con una hoja de instrucciones para llevar a cabo el ensayo. En algunas realizaciones, los kits o dispositivos también incluyen una muestra de control positivo. En realizaciones adicionales, el kit o dispositivo contiene material de referencia comparativo para interpretar la presencia o la ausencia de sintetasa de prostaglandina D2 de acuerdo a la intensidad, espectro de color, u otros atributos físicos, como un indicador.

15 20 Es de gran importancia la necesidad de un ensayo de diagnóstico rápido, reproducible, sensible y simple, que pueda usarse en la atención sanitaria para el diagnóstico de filtraciones de LCR. Dicho ensayo tiene la ventaja obvia sobre los ensayos de laboratorio existentes, es decir, electroforesis de inmunofijación, prueba inmunoabsorbente ligada a enzima (ELISA) e inmunotransferencia, de que puede realizarse al lado del paciente inmediatamente, dando un resultado en algunos minutos de tiempo, en lugar de en varios días cuando la muestra se envía para análisis a un laboratorio. Un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral puede utilizarse para preparar un kit diagnóstico para la detección de LCR en fluidos biológicos.

25 30 En una realización, un inmunoensayo adecuado para la detección de LCR en una muestra comprende un anticuerpo monoclonal que específicamente interactúa con L-PGDS natural, tal como aquellos divulgados en el presente documento. En una realización específica, un dispositivo para la detección de LCR en una muestra comprende una región de muestra que comprende un indicador móvil adecuado para la unión a L-PGDS, en comunicación fluida con una región de detección que comprende un indicador fijo adecuado para la unión a L-PGDS, en el que el indicador móvil, el indicador fijo, o ambos, comprenden un anticuerpo monoclonal de la invención. En otra realización, el dispositivo también comprende una región de control, en comunicación fluida con la región de muestra y la región de detección, donde la región de control comprende un control positivo.

35 40 En una realización, un dispositivo de ensayo incluye una tira reactiva, de forma opcional con un módulo de ensayo plástico (FIG.4). Los anticuerpos están unidos a tres zonas diferentes sobre la membrana; una zona de muestra (M) que contiene un primer anticuerpo monoclonal para sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina; una zona de ensayo (E) que contiene un segundo anticuerpo monoclonal o policlonal para sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina inmovilizado a la membrana; y una zona de control (C), que contiene, por ejemplo, un anticuerpo de conejo anti-ratón inmovilizado. El primer anticuerpo monoclonal en la zona de muestra (M) puede conjugarse a una partícula móvil, por ejemplo, una partícula de látex coloreado o una partícula de oro. De forma alternativa, el primer anticuerpo monoclonal se conjuga a un indicador cromofórico, tal como una molécula fluorescente o etiqueta (por ejemplo proteína verde fluorescente (GFP), Alexa, y Texas Red).

45 50 El dispositivo se implementa utilizando un ensayo inmunocromatográfico basado en el uso de dos anticuerpos monoclonales. Como se muestra en las FIGS. 5A y 5B, la muestra se añade a la zona M, y si PGDS está presente, se une al primer anticuerpo monoclonal para formar un complejo PGDS-conjugado. Este complejo migra cromatográficamente sobre la membrana y, cuando alcanza al anticuerpo inmovilizado en la zona E, tiene lugar la aglutinación y se forma una banda de color azul.

55 60 Brevemente y en una realización, el primer anticuerpo monoclonal se conjuga a una partícula móvil, por ejemplo, esferas de oro o de látex. Estas esferas tienen color intrínseco rojo (para oro) o pueden venir en diferentes colores si se usan esferas de látex. Cuando la muestra se aplica en la "zona M", el indicador, si L-PGDS está presente en la muestra, se une a el primer anticuerpo monoclonal conjugado a las esferas y después, debido a la capa absorbente de flujo lateral sobre la que las esferas se localizan, el complejo (esferas+anticuerpo+L-PGDS si está presente en la muestra) migra lateralmente. Una vez que el complejo alcanza la "zona E" donde el segundo anticuerpo se encuentra inmovilizado sobre la tira, el indicador que ahora migra con el complejo, se une al segundo anticuerpo inmovilizado. Como el segundo anticuerpo se encuentra estacionario/fijo/inmovilizado, el complejo en su totalidad queda atrapado y, como el complejo ahora contiene esferas coloreadas, la línea inmovilizada de la zona E se ilumina de acuerdo con las esferas que se están utilizando (rojo para oro o diferentes colores {como azul} si se usan esferas de látex). El exceso de muestra formando complejo migra hasta el extremo de la tira y en la "zona C" el primer anticuerpo conjugado a las esferas queda atrapado mediante un anticuerpo de conejo anti-ratón inmovilizado/fijo/estacionario y da una línea coloreada indicando que el ensayo está completo. Así, una banda coloreada indica un resultado positivo (FIG. 5A). Que no haya banda en la zona E es significativo de un resultado

negativo (FIG. 5B). El anticuerpo policlonal inmovilizado en la zona C se unirá al conjugado de látex tanto con las muestras positivas como negativas. Esta banda azul asegura una realización correcta del ensayo.

En la práctica, los kits y dispositivos se utilizan en una diversidad de contextos clínicos para determinar la presencia de LCR en una muestra, incluyendo fracturas craneales, filtraciones de LCR después de diversas cirugías, tales como cirugía endonasal endoscópica, neurocirugía, colocación de catéter epidural, hipotensión hipocraneal espontánea, hipotensión intracraneal inducida por carbunco, o trastornos asociados con filtraciones de LCR, tales como rinorrea y otorrea, hidrocefalia, neoplasias intracraneales, malformaciones neurales congénitas, y similares.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos y procedimientos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones y aspectos de la presente divulgación.

Metodología

Los eluatos epidurales y las muestras de LCR se obtuvieron de pacientes de la unidad de maternidad del Hospital Universitario Stony Brook SUNY. Los fluidos corporales se obtuvieron de los laboratorios de hematología y química del Hospital Universitario Stony Brook SUNY. Se analizó la PGDF en las muestras con el uso de un anticuerpo policlonal específico para PGDS lipocalina (CAYMAN CHEMICAL CO. Ann Arbor Mich.).

Eluatos epidurales

Después de la firma del consentimiento informado (aprobado por el CRI: Comité de Revisión Institucional), y el permiso del obstetra tratante, se colocó un catéter epidural y se dosificó con medicaciones epidurales de rutina (3 cc de lidocaína al 1,5 %, con epinefrina 1:200000; y 10 cc de bupivacaína al 0,125 % con 50 µg de fentanilo). Después se colocó al paciente una infusión epidural continua de bupivacaína al 0,0625 % con 1,6 µg/cc de fentanilo a 10 cc/h. Para el propósito de esta investigación, el catéter epidural se aspiró dos veces entre una u cuatro horas después de la colocación epidural. La presencia de LCR en el fluido aspirado se ensayó mediante inmunotransferencia de PGDS.

Líquido cefalorraquídeo

Después de la firma del consentimiento informado (aprobado por el CRI) y del permiso de su obstetra, pacientes con colocación anestésica raquídea de rutina para cesárea electiva, se ofrecieron voluntariamente para donar un pequeño volumen de líquido cefalorraquídeo. Después de colocar en el espacio subaracnoideo una aguja medular pencañ de 25 G, 1 ml de LCR se aspiró antes de la inyección de los medicamentos destinados a la anestesia. Así, el LCR que normalmente se desecha o se inyecta otra vez en el paciente, se utilizó para evaluar la presencia de PGDS mediante inmunotransferencia.

Fluidos corporales

Otros fluidos corporales que se ensayaron en este estudio se obtuvieron de los Laboratorios Clínicos del Hospital Universitario Stony Brook SUNY, N.Y. Estas muestras de fluido corporal rutinariamente se desechan después del análisis clínico de los fluidos que requiere el médico tratante. En lugar de destruirlas, estas muestras se tomaron con la aprobación del CRI para la evaluación de la presencia del marcador PGDS de LCR, mediante inmunotransferencia.

Inmunotransferencia

Las muestras (5-20 µl) de LCR, y fluidos corporales de otras fuentes, fueron sujeto de SDS-PAGE y se electrotransfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5 % en TBS, y se sondearon con anticuerpo anti-sintetasa de prostaglandina D2 (anti-PGDS) (CAYMAN CHEMICAL CO. Ann Arbor Mich.), seguido de un anticuerpo secundario marcado con HRP. Después, se revelaron las transferencias por quimioluminiscencia potenciada (ECL-Amersham).

Ejemplo 1

El anticuerpo policlonal anti-L-PGDS detecta de forma fiable y específica la presencia de L-PGDS en LCR en la inmunotransferencia, y su ausencia en otros fluidos corporales (FIG. 2A). Volúmenes de muestra tan pequeños como 5 µl son adecuados para el análisis preciso.

Ejemplo 2

El anticuerpo policlonal anti-L-PGDS detecta de forma fiable L-PGDS en muestras de LCR de 12 fuentes de ser humano distintas, indicando que la detección de L-PGDS en LCR mediada por anticuerpo, es específica de antígeno pero no es específica de paciente (FIG. 2B).

5 Ejemplo 3

El anticuerpo policlonal anti-L-PGDS discrimina de forma fiable aspirados de fluido de diferentes compartimentos corporales. Se observó una fuerte unión anti-L-PGDS en muestras de fluido de fuentes medulares, mientras que no se observó unión a L-PGDS en eluatos de catéteres en el espacio epidural (FIG. 2C).

10 Estos resultados indican que la presencia o la ausencia de L-PGDS en muestras de fluido corporal predice de forma fiable y específica la fuente del fluido, y de esta forma discrimina el origen del compartimento entre el fluido raquídeo, epidural, y de otros fluidos corporales.

15 Ejemplo 4: Clonado de L-PGDS en un vector de expresión bacteriano

El plásmido pDNR-LIB (125-225 ng) conteniendo el gen de L-PGDS se incubó con el vector aceptor pLB-ProTet-6.times.HN (aproximadamente 200 ng) en una reacción de Recombinasa Cre (20 µl). Las reacciones se finalizaron y después se utilizaron para transformar células bacterianas competentes DH5-alfa y BL21, que después se sembraron en placas de agar con Caldo de Luria (LB) conteniendo cloranfenicol 30 µg/ml y sacarosa al 7 %. El gen de L-PGDS se clonó también en un vector pet15b con una etiqueta His en el extremo C-terminal y se utilizó para transformar células bacterianas DH5-alfa y BL21. El ADN plasmídico se extrajo de las colonias seleccionadas, se linealizó con enzima de restricción y se procesó en un gel de agarosa.

25 Ejemplo 5: Purificación de L-PGDSr mediante cromatografía de afinidad.

La fracción citosólica de *E. coli*-BL21 (transfectadas con el vector Pro-Tet R o con el vector pet 15b hospedando al gen de L-PGDS) se extrajo en buffer de extracción Sigma Lytic II, y la muestra se aplicó a la columna de afinidad BD-TALON His-Arg o a la columna Niquel-NTA, y la PGDSr unida se eluyó con imidazol. Las muestras fueron sujeto de SDS-PAGE, y se inmunotransfirieron con anticuerpo PGDS.

Ejemplo 5a: Mapeo de la superficie expuesta a disolvente de L-PGDS

35 L-PGDS tiene la secuencia dada en SEC ID N°: 2. No hay disponible de forma pública una estructura cristalina de L-PGDS, por lo que se abordaron estudios para determinar la superficie expuesta a disolvente de L-PGDS de tal manera que pudiesen generarse anticuerpos contra la proteína natural, es decir, plegada.

El "Índice de Antigenicidad" para L-PGDS procede de la aplicación de la secuencia de L-PGDS a los Diagramas Hidropáticos de Hopp y Woods (la FIG. 6 es un diagrama hidrófobo y la FIG. 7 es un diagrama hidrófilo). La FIG. 8 representa el diagrama hidrófilo con la secuencia de L-PGDS que se analizó mediante el Índice Antigénico. La FIG. 8 es la misma que la FIG. 7 con los ejes X e Y graduados apropiadamente para identificar las secuencias de aminoácidos (eje X) y el número de índice antigénico (eje Y).

45 SINTETASA DE PROSTAGLANDINA TIPO LIPOCALINA:

MATHHTLWMGLALLGVLGDLQAAPAEQVSVQPNFQQDKFLGRWFSAGLAS
NSSWLREKKAALSMCKSVVAPATDGGLNLTSTFLRKNQCETRTMLLQPAG
SLGSYSYRSPHWGSTYSVSVVETDYDQYALLYSQGSKGPGEDFRMATLYS
RTQTPRAELKEKFTAFCQAQGFTEDTIVFLPQTDKCMTEQ
 (SEC ID N°: 2)

Los péptidos de alto índice antigénico potenciales se dan en la tabla a continuación.

50

SEC ID N°:	Péptidos altamente antigénicos potenciales de L-PGDS como se deriva del diagrama de índice antigénico
3	30 - VQPNFQQDKFLGR - 42
4	50 - NSSWLREK - 58
5	80 - PATDGGLNLT - 90
6	115 - TYSVSVVETDY - 125
7	131 - LYSQSKGPGED - 142
8	148 - YSRTQTPRAELK - 160
9	176 - TIVFLPQT - 183

Comparando los diagramas hidrófobos e hidrófilos y siguiendo de forma precisa los criterios para las secuencias más específicas, que pueden ser únicas para identificar L-PGDS natural, se seleccionó a la secuencia 30-42 para preparar un antígeno para inocular en ratones. Las moléculas más pequeñas que 12 kDa podrían no producir una respuesta inmunitaria. Para generar una respuesta inmunitaria y anticuerpos de alta calidad contra moléculas pequeñas, normalmente se realiza una conjugación a proteínas transportadoras más grandes. Se eligió como proteína transportadora a la hemocianina de lapa californiana (KLH). En comparación con proteínas transportadoras tales como albúmina de suero bovino (BSA), KLH es útil dado que no hay reactividad con los reactivos bloqueantes de ELISA o transferencias de Western.

Se pueden usar diversos métodos químicos para la preparación de inmunógeno tales como acoplamiento a través de grupos sulfhidrilos y la reacción de carbodiimida. Se puede usar el método químico de la maleimida para acoplar un grupo sulfhidrilo libre de un resto de cisteína del péptido a la proteína transportadora. En un péptido, múltiples cisteínas muy probablemente formarán uniones de sulfuro, que deben reducirse antes de que tenga lugar el método químico de conjugación. Los péptidos de L-PGDS seleccionados (sec 30-42) afortunadamente no tienen múltiples restos de cisteína. Desafortunadamente, esta secuencia peptídica no tiene ningún resto de cisteína y, por lo tanto, se decidió unir un resto de cisteína al extremo N-terminal o C-terminal del péptido, para el enlace a la proteína transportadora. En general, la cisteína debería añadirse en el extremo de menor importancia. Por ejemplo, si el péptido representa la secuencia N-terminal de una proteína, la cisteína debería añadirse al extremo C-terminal. Para una secuencia interna, la cisteína puede añadirse al extremo N-terminal o al extremo C-terminal. Como la primera secuencia peptídica en la lista de péptidos altamente antigénicos procedía del extremo N-terminal, un resto extra de cisteína se añadió al extremo C-terminal de la secuencia, de modo que la KLH pudiera conjugarse.

El primer péptido que se seleccionó utilizando el índice antigénico es de la secuencia 30-42. Para conjugar a KLH, el último residuo R (Arginina) se sustituyó con C (Cisteína) (véase más arriba para una explicación). Otra característica importante en la selección de un péptido altamente antigénico, es que el péptido sintetizado debe ser fácilmente soluble en un tampón acuoso para la conjugación y para el uso en pruebas biológicas. La secuencia peptídica que se seleccionó utilizando el índice antigénico mostró alta hidrofiliidad. Sin embargo, en el péptido que se seleccionó había de forma secuencial dos aminoácidos glutamina (Q). La glutamina provoca insolubilidad, ya que puede formar uniones hidrógeno entre cadenas peptídicas, y en el péptido que se seleccionó había dos glutaminas (Q-Q). La prolina no proporciona uniones hidrógeno, pero tiene una similitud espacial con un anillo de piranosa que la hace preferible. Esto también reduce la flexibilidad de los péptidos favoreciendo conformaciones existentes de mimotopos. Por lo tanto, el remplazo de Q con P hace polar al sitio de sustitución no polar eliminando los enlaces de hidrógeno en restos posteriores. La secuencia utilizada para inyectar ratones, con dos sustituciones para una síntesis fácil y para hacerla altamente antigénica es: VQPNFQPKFLGC (SEC ID N°: 1).

El péptido SEC ID N°: 1 tiene alta antigenicidad así como una posición en la superficie externa de la proteína natural, en vista de su hidrofiliidad. El péptido SEC ID N°:1 se seleccionó para generar varios hibridomas. En general, un determinante antigénico o epítipo único es de entre 5 y 8 aminoácidos, y por lo tanto un péptido más grande de 10 aminoácidos contendrá uno o más epítipos.

Ejemplo 6: Generación de anticuerpos monoclonales

Se generaron anticuerpos monoclonales contra L-PGDS utilizando el péptido de SEC ID N°:1. Se inmunizaron tres ratones con el péptido de L-PGDS SEC ID N°: 1 mediante cuatro inyecciones bisemanales y los sueros se ensayaron mediante ELISA. Se eligió un ratón para fusión en base a que tenía un título de anticuerpos contra el antígeno de 1:1000 y se lo revacunó otra vez con el antígeno, seguido cuatro días más tarde de fusión esplénica. Células esplénicas aisladas se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP2/O en una proporción de 10:1 células esplénicas:células de mieloma, sedimentándolas juntas a 1000 rpm durante 5 min en medio DMEM (Gibco) complementado con Clon Fetal I al 10 % (HyClone), aminoácidos no esenciales (Gibco) y penicilina y estreptomycin (Gibco). El sedimento se resuspendió en PEG 1500 al 35 % (Roche) en medio DMEM, y las células se centrifugaron inmediatamente a 1000 rpm durante 5 min. Se aspiró el PEG, y las células fusionadas se resuspendieron en medio DMEM glutamax (Gibco) complementado con Clon Fetal I al 15 %, NCTC 109 al 10 % (Gibco), aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin, hipoxantina 10^{-4} M, aminopterin 4×10^{-5} , timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M, y medio acondicionado de macrófago al 10 %, y se sembraron en 10 placas de 96 pocillos. El medio acondicionado de macrófagos se preparó como se describe (Rathejan *et al.*, 1985), con modificaciones (Sugasawara *et al.*, 1985). Brevemente, se cultivaron J774.A1 (Colección Americana de Cultivos Tipo) en un matraz rotativo en medio DMEM complementado con suero equino al 10 % (HyClone). Se añadieron lipopolisacáridos a 5 mg/ml (LPS de *E. coli* 055:B5, Cal Biochem) al cultivo rotativo, y las células se incubaron durante 20 h. Después, las células se recolectaron a 1000 rpm durante 10 min y se lavaron en medio volumen de PBS. Después de centrifugar durante 10 min a 1000 rpm, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado por Iscoves (IMDM, Gibco) sin suero equino y se transfirieron a un frasco rotativo. Después, las células se incubaron durante 48 h a 37 °C. El medio se recogió decantando las células a partir del medio, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Después se filtró el medio acondicionado de macrófagos y se reservó a 4 °C. Dos semanas después de la fusión, las células se exploraron mediante ELISA contra el péptido de L-PGDS conjugado a ovoalbúmina. El día anterior a la exploración, se retiró 0,1 ml de medio de cada pocillo de las diez placas de fusión de 96 pocillos, y se reemplazó con 0,1 ml de medio fresco por pocillo. Al día siguiente, los pocillos que mostraron una

respuesta positiva por ELISA y de crecimiento celular, se reexploraron mediante ELISA para confirmar la respuesta. Las células de los pocillos que mostraron una respuesta positiva en el reensayo se expandieron y crecieron hasta 30 ml en cultivo y 3 alícuotas de 10 ml se decantaron y resuspendieron en medio de congelación (dimetilsulfóxido al 10 %, Clon Fetal I al 90 %) para criopreservación. Las muestras positivas se exploraron mediante transferencia puntual contra LCR y L-PGDSr, y se eligieron clones para subclonado mediante dilución limitante. Los subclones se exploraron mediante ELISA y se eligieron subclones para estudios adicionales, se expandieron y se crecieron hasta un volumen de 1000 ml en DMEM complementado con suero fetal de ternero al 10 % y antibióticos, en matraces T-175. Los subclones se transfirieron a DMEM sin suero y se continuó la incubación durante tres días. El sobrenadante se recogió mediante decantación de las células a 1500 rpm durante 10 min, y se reservó a 4 °C.

Como un análisis inicial, a los diez a catorce días post fusión se ensayaron los clones de 4000 pocillos mediante ELISA. Los clones positivos se reensayaron mediante ELISA y además, se ensayaron en el plazo de dos a tres días mediante una segunda exploración, tal como transferencia puntual (FIG. 9). Muestras de L-PGDS recombinante y de LCR se transfirieron a una membrana PVDF utilizando un aparato de transferencia puntual, y se sondearon con líquido ascítico de hibridomas generados en el esquema de la producción de anticuerpos monoclonales (FIG. 10). El clon utilizado en estos estudios fue el clon 12. La L-PGDSr migró en LCR más alto que la proteína natural, porque la proteína recombinante tiene una etiqueta 6X His-Arg unida a su extremo N-terminal. Mediante modificación por ingeniería genética se introdujo en el conector un sitio de escisión de enteroquinasa para escisiones adicionales, si fuese necesario.

Después de la exploración, se identificaron varios clones que tienen la capacidad de identificar a la proteína natural de acuerdo con los resultados obtenidos mediante pruebas de transferencia puntual y ELISA. Para todo el trabajo, se designaron en el laboratorio dos clones como clon 12 y clon 45.

Ejemplo 7: Detección de PGDS natural y desnaturalizada en LCR.

Se transfirió LCR (10 µl) a PVDF utilizando un aparato de transferencia puntual de Bio-Rad (proteína natural) o se sometió a electroforesis y se transfirió a membrana de PVDF (proteína desnaturalizada), y se sondeó con un anticuerpo contra PGDS. La membrana se reveló mediante el uso del Kit de detección ECL. Los resultados indican la detección de proteína utilizando anticuerpos específicos contra L-PGDS (FIG. 11).

Ejemplo 8: Evaluación de la presencia de L-PGDS en muestras obtenidas durante procedimientos epidurales e identificación de "punciones húmedas" (*Wet Taps*) debidas a filtraciones de LCR

Se evaluó la presencia del marcador de LCR (L-PGDS) en muestras obtenidas durante procedimientos epidurales por especialistas clínicos colaboradores después de la aprobación del CRI. El estudio se ocultó hasta que las muestras se analizaron y se correlacionaron más tarde con las muestras designadas. Las muestras designadas como medulares mostraron una fuerte presencia del marcador de LCR, en tanto que las muestras designadas como epidurales estaban libres del marcador, excepto donde las muestras designadas como epidurales mostraron la presencia de L-PGDS, indicando una "punción húmeda" (*Wet Tap*) (FIG. 12). Cuando se realiza una epidural, la duramadre no se punza de forma intencional, dado que el catéter y la medicación inyectada se sitúan enteramente en el espacio epidural, por fuera de la duramadre. Sin embargo, en ocasiones, incluso en manos experimentadas, la aguja epidural va un poco demasiado lejos y se hace una perforación en la duramadre. Los anestesiólogos llaman a esto una "punción húmeda" (*Wet Tap*).

Ejemplo 9: Cambio de escala y purificación de la proteína recombinante y de las IgGs

Para la purificación de la proteína recombinante y de los anticuerpos a partir de los subclones seleccionados se utilizarán técnicas de cromatografía de afinidad.

1. Purificación a gran escala de L-PGDSr

Células de *E. coli* BL-21PRO, transformadas con el vector de expresión, Pro-Tet6X-HN hospedando el gen etiquetado L-PGDSHN o con el vector pet15b hospedando al gen L-PGDS etiquetado con His se crecieron en caldo Super. La inducción de la expresión de proteínas se puede realizar a 20-23 °C añadiendo 8 ml de anidrotetraciclina 100 mM a un cultivo bacteriano de 800 ml, cuando la densidad celular (A_{600}) alcanzó 0.6-0.7. Las células bacterianas pueden resuspenderse en buffer de unión (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, e imidazol 1 mM, pH 7.9), seguido de sonicación. La L-PGDS recombinante etiquetada se purifica utilizando resina TALON o Ni-NTA, de acuerdo al protocolo del fabricante (BD Life Sciences, Franklin Lakes, N.J., o ClonTech, Mountain View, Calif.). Después de la centrifugación (39000 X g), los extractos celulares se incuban con 300 µl (volumen de lecho) de resina TALON o Ni-NTA a 4 °C durante 1-2 h. Las esferas se lavan tres veces con 10 ml de tampón de lavado (igual que el tampón de unión excepto en que contiene imidazol 10 mM). Las proteínas pueden eluirse con 300-500 µl de buffer de elución (igual que el tampón de unión excepto en que contiene imidazol 100 mM). Las muestras eluidas se analizan mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia, como se describe anteriormente. La proteína purificada se puede concentrar a 1-2 mg por ml

utilizando un microconcentrador (Amicon), y estas muestras utilizarse usarse para determinar la especificidad de los anticuerpos seleccionados ya sea por ELISA o por Calorimetría de Titulación Isotérmica.

2. Producción de anticuerpo monoclonal a gran escala (líquido ascítico *in vitro*- "AIV")

Para la producción a gran escala de líquido ascítico *in Vitro*, se seleccionó una serie de clones positivos (por su capacidad de identificar tanto el antígeno natural como el desnaturalizado mediante métodos de ELISA, transferencia puntual e inmunotransferencia). Las células se crecieron hasta alta densidad en un recipiente dividido en compartimentos mediante una membrana CeLLine hecha por Integra Biosciences (Zurich, Suiza), utilizando medio sin suero, complementado con aditivos para potenciar la producción de anticuerpo.

3. Purificación de anticuerpos monoclonales

La purificación de anticuerpos monoclonales se puede llevar a cabo mediante cromatografía de afinidad en columnas de 1 ml de Proteína G-agarosa (Sigma) en Econocolumnas de 1x10 cm (Bio-Rad) como se describe (David Lane, 1999). Típicamente, 500 ml de sobrenadante conteniendo suero se diluyen con Tris-Cl 1 M, pH 8,8, a un volumen de 1/10. La muestra se procesa a través de la columna a un caudal de 0,8 ml/min controlado mediante la bomba peristáltica P-1 (Pharmacia LKB), seguido por lavados de 10 volúmenes de columna de Tris 0,1 M, pH 8,0 y 10 volúmenes de columna de Tris 10 mM, pH 8,0, a un caudal de 0,8 ml/min. El anticuerpo se eluye con fracciones de 0,5 ml de glicina 50 mM pH 3,0 en Tris 1 M pH 8,0, a un volumen 1/10. Las fracciones conteniendo el anticuerpo se identifican observando la densidad óptica a 280 nm y se confirma mediante SDS-PAGE, después se agrupan y se dializan contra PBS con dos cambios de tampón, durante una noche a 4° C. Los rendimientos de proteínas se determinan mediante la prueba de proteínas de Bradford (Bio-Rad).

Ejemplo 10: Caracterización y control de calidad de las IgGs purificadas.

Utilizando calorimetría de titulación isotérmica y ELISA, los anticuerpos se pueden caracterizar en virtud de sus isotermas de unión con la proteína recombinante.

1. Calorimetría de titulación isotérmica

Los métodos comúnmente empleados para analizar la calidad de producto del anticuerpo, tales como electroforesis o cromatografía, caracterizan la estructura molecular sin proporcionar información acerca de la actividad de unión. Esto es especialmente cierto en la evaluación de la variación entre lotes de la función del anticuerpo. La calorimetría de titulación isotérmica (CTI) ofrece un método mucho más simple y más preciso para el control de calidad y la caracterización de anticuerpos y productos de anticuerpos. La CTI puede usarse para medir de forma rápida y eficaz una amplia variedad de características físicas, tales como la afinidad del anticuerpo (K_a), el calor de la unión a antígeno (ΔH), y el número aparente de sitios de unión activos (n) en un anticuerpo o antígeno. Los cambios en la estructura (fragmentación, desnaturalización parcial, y modificación mediante agentes acoplantes, puede correlacionarse con cambios en la afinidad de unión. Además, los calores de unión pueden utilizarse como predictores de la reacción anticuerpo-antígeno tanto *in vitro* como *in vivo*.

En la CTI, una solución de un ligando (por ejemplo un receptor, un anticuerpo, etc.) se titula contra una solución de un compañero de unión a una temperatura constante. El calor liberado en su interacción (ΔH) se controla a lo largo del tiempo. Como las cantidades sucesivas del ligando se titulan dentro de la célula, la cantidad de calor absorbido o liberado está en directa proporción a la cantidad de unión que se produce. A medida que el sistema alcanza la saturación, la señal disminuye hasta que sólo se observan los calores de dilución. Después se obtiene una curva de unión a partir de un representación de los calores de cada inyección contra la proporción de ligando y compañero de unión en la célula. Se siguen protocolos estándar para determinar CEI la especificidad y sensibilidad de los anticuerpos purificados utilizando.

2. ELISA para la detección de antígeno.

Placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno se recubren a 4 °C durante una noche con antígeno recombinante purificado (L-PGDS) a 1 µg/ml (100 µl/pocillo) en tampón carbonato bicarbonato (pH 9,6). Las placas se lavan dos veces con PBST y después se bloquean con leche desnatada sin grasas al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), conteniendo Tween 20 al 0,05 % durante 1 h a 37 °C. Se añaden a los pocillos (100 µl/pocillo) los anticuerpos monoclonales, con diluciones diferentes en el sobrenadante de cultivo, y las placas se incuban durante 1,5 h a temperatura ambiente y durante 30 min a temperatura ambiente. Después, las placas se lavan cinco veces con PBST, se añaden 100 µl de anti-ratón HRPO (1:1000 en PBST) y las placas se incuban a 37 °C durante otros 30 min. Después de repetir la etapa de lavado como más arriba, la actividad enzimática se puede valorar mediante incubación durante 15 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Bio-Rad). Después de añadir 25 µl/pocillo de H₂SO₄ 2,5 N para detener la reacción, se puede medir la densidad óptica a 400 nm mediante un lector de microplacas automático.

Ejemplo 11: Dispositivo de flujo lateral para identificar LCR en muestras clínicas.

El dispositivo de la presente divulgación se implementa utilizando un ensayo inmunocromatográfico basado en el uso de dos anticuerpos monoclonales. El dispositivo de ensayo incluye una tira de ensayo (por ejemplo, 0,8 cm-6,2 cm) con un módulo de ensayo plástico (FIG. 4). Los anticuerpos se unen a tres zonas diferentes sobre la membrana; una zona de muestra (M), una zona de ensayo (E), y una zona control (C). Se une el Acm1-L-PGDS conjugado con partículas de látex a la zona M. El Acm2-L-PGDS se encuentra inmovilizado de forma permanente en la zona E, y el anticuerpo de conejo anti-ratón se inmoviliza en la zona C.

1. Conjugación del Acm1-L-PGDS a las partículas de látex.

En una realización, el dispositivo de la presente divulgación utiliza el anticuerpo monoclonal contra L-PGDS de la invención conjugado a una partícula móvil, tal como una partícula de látex (Magsphere Inc, Pasadena Calif.) o una partícula de oro (Bioassay Works, Ijamsville, Md.). De forma preferible las partículas de látex están teñidas en azul y se hacen de poliestireno en un diámetro de 0,3 mm. Las partículas de látex (50 ml, solución al 10 %) se lavan una vez en tampón de ácido morfolinoetanosulfónico-2 (MES) 50 mM, pH 5,5 a temperatura ambiente. El sedimento se resuspende en 600 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma), pH 7,4, y se mezcla con 300 mg del Acm1-L-PGDS. La suspensión se mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. La suspensión anticuerpo-látex se lava dos veces con tampón Tris (hidroximetil aminometano) 100 mM, pH 8,0, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,2 %. Se resuspende después el precipitado en 500 ml de tampón Tris y se reserva a 4 °C. La suspensión de conjugado (100 ml) se aplica mediante un sistema tipo aerógrafo automático (Bio-Dot Inc., Irvine, Calif.) sobre una capa de conjugado (0,5 cm-30 cm) y se seca durante 60 min a temperatura ambiente.

2. Inmovilización del Acm2-L-PGDS y de los anticuerpos de conejo anti-ratón.

Un segundo anticuerpo monoclonal contra L-PGDS (Acm2-PGDS) y un anticuerpo de conejo anti-ratón también se utiliza en el dispositivo de la presente divulgación. Se pueden aplicar el Acm2-L-PGDS y los anticuerpos de conejo anti-ratón con dos sistemas tipo aerógrafo automáticos (Bio-Dot), a una concentración de 5 mg/ml, como dos líneas distintas sobre la membrana de nylon (4 cm-30 cm), con un tamaño de poro de 5 mm adquirida de forma comercial. La membrana puede secarse durante 30 min y bloquearse con PBS (Sigma), pH 7,4, conteniendo caseína al 0,25 % durante 15 min en un agitador. La membrana se seca a 37 °C durante 60 min y se reserva en una bolsa sellada con desecante (Esfandiari y Klingeborn, 2000).

3. Procedimiento de ensayo

Haciendo referencia ahora a la FIG. 5, una pequeña cantidad de una mezcla conteniendo L-PGDS se añade a la zona M. Como se muestra en la FIG. 5A, la L-PGDS presente en la muestra se unirá al conjugado de látex y formará un complejo L-PGDS-conjugado, y migrará cromatográficamente sobre la membrana. Cuando el complejo alcanza al anticuerpo inmovilizado en la zona E, el complejo esfera-marcador-Acm1 queda atrapado sobre la "zona E" que se comprende de Acm2 inmovilizado y se forma una banda coloreada de azul. El resultado es una aglutinación del complejo antígeno-anticuerpo junto con el látex coloreado o las esferas de oro sobre la "zona E", lo que a su vez provoca que la línea coloreada aparezca debido al atrapamiento de las esferas. Una banda azul mostrada dentro de 3-5 min en la zona E indica un resultado positivo (FIG. 5A). La ausencia de banda en la zona E es significativa de un resultado negativo (FIG. 5B). El anticuerpo policlonal inmovilizado en la zona C se unirá al conjugado de látex, tanto con las muestras positivas como con las negativas. Esta banda azul asegura una realización correcta del ensayo.

4. Uso del dispositivo de detección de LCR

El dispositivo de la presente divulgación puede utilizarse en una diversidad de contextos clínicos para determinar la presencia de líquido cefalorraquídeo (LCR) en una muestra. Los dispositivos podrían usarse para la detección de LCR en las siguientes condiciones (pero sin limitación):

- Filtraciones de LCR asociadas con traumatismo de craneal
- Filtraciones de LCR asociadas con conmoción cerebral
- Traumatismo corporal con implicación del SNC
- Fracturas craneales con filtración de LCR (basado de forma principal en fracturas craneales)
- Filtración de LCR después de cirugía endonasal endoscópica
- Filtración de LCR después de neurocirugía
- Filtración de LCR después de colocación de catéter epidural
- Hipotensión intracraneal espontánea después de filtración de LCR
- Hipotensión intracraneal inducida por carbunco con filtración de LCR
- Filtración de LCR asociada con rinorrea y otorrea
- Filtración de LCR asociada con hidrocefalia
- Filtración de LCR asociada con neoplasias intracraneales
- Filtración de LCR asociada con malformaciones neurales congénitas

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a VQPNFQPKFLGC.
- 5 2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal es reactivo con L-PGDS, sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina natural.
3. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2.
- 10 4. Un dispositivo de inmunoensayo adecuado para la detección de la presencia o la ausencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra que se sospecha que contiene líquido cefalorraquídeo, comprendiendo:
un soporte que comprende un primer anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 15 5. El dispositivo de inmunoensayo de la reivindicación 4, en el que el soporte comprende:
una región de muestra que comprende un indicador móvil adecuado para la unión de L-PGDS en comunicación fluida con una región de detección que comprende un indicador fijo adecuado para la unión a L-PGDS,
20 donde el indicador móvil, el indicador fijo, o ambos, comprenden el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
6. El dispositivo de inmunoensayo de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente una región de control en comunicación fluida con la región de muestra y la región de detección, donde la región de control comprende un control positivo.
- 25 7. El dispositivo de inmunoensayo de la reivindicación 4, en el que el soporte comprende:
una zona de muestra que comprende el primer anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2
30 donde el primer anticuerpo monoclonal no está fijo al soporte; una zona de ensayo que comprende un segundo anticuerpo monoclonal o policlonal contra sintetasa de prostaglandina D2 tipo lipocalina inmovilizado al soporte;
y
una zona de control que comprende un anticuerpo de control,
35 donde la zona de muestra, la zona de ensayo y la zona de control están en comunicación fluida.
8. Un kit que comprende:
el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2, y
40 las instrucciones para determinar si la muestra contiene L-PGDS.
9. Un método para detectar la presencia de líquido cefalorraquídeo en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2.
- 45 10. El método de la reivindicación 9 en el que la muestra es de un sujeto que se sospecha que tiene filtraciones de líquido cefalorraquídeo asociadas con traumatismo craneal, filtraciones de líquido cefalorraquídeo asociadas con conmoción cerebral, traumatismo corporal con implicación de líquido cefalorraquídeo, fracturas craneales con filtración de líquido cefalorraquídeo, filtración de líquido cefalorraquídeo después de cirugía endonasal endoscópica, filtración de líquido cefalorraquídeo después de neurocirugía, filtración de líquido cefalorraquídeo después de colocación de catéter epidural, hipotensión intracraneal espontánea después de filtración de líquido cefalorraquídeo,
50 hipotensión intracraneal inducida por carbunco con filtración de líquido cefalorraquídeo, filtración de líquido cefalorraquídeo asociada con rinorrea, filtración de líquido cefalorraquídeo asociada con otorrea, filtración de líquido cefalorraquídeo asociada con hidrocefalia, filtración de líquido cefalorraquídeo asociada con neoplasias intracraneales, o filtración de líquido cefalorraquídeo asociada con malformaciones neurales congénitas.

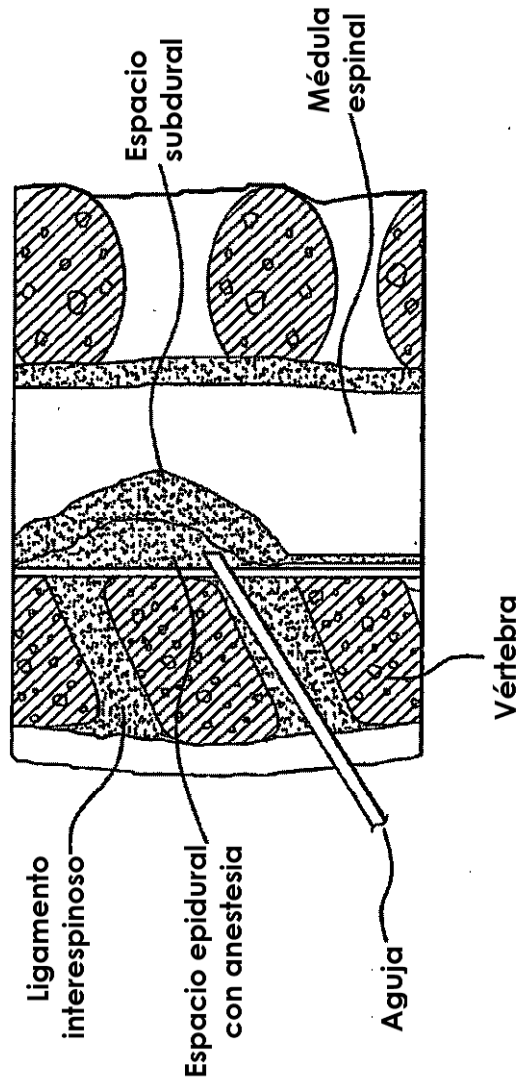


FIG.1

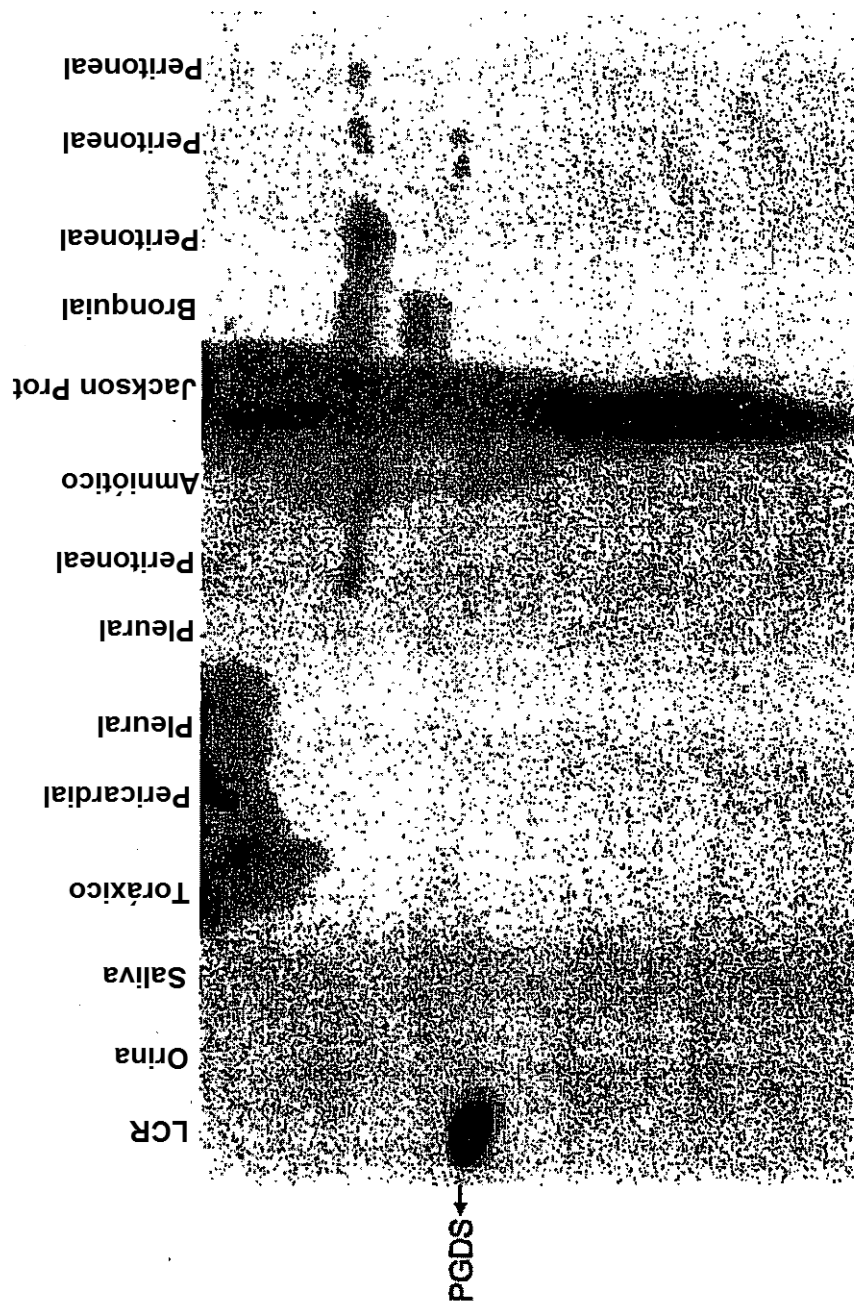


FIG.2A

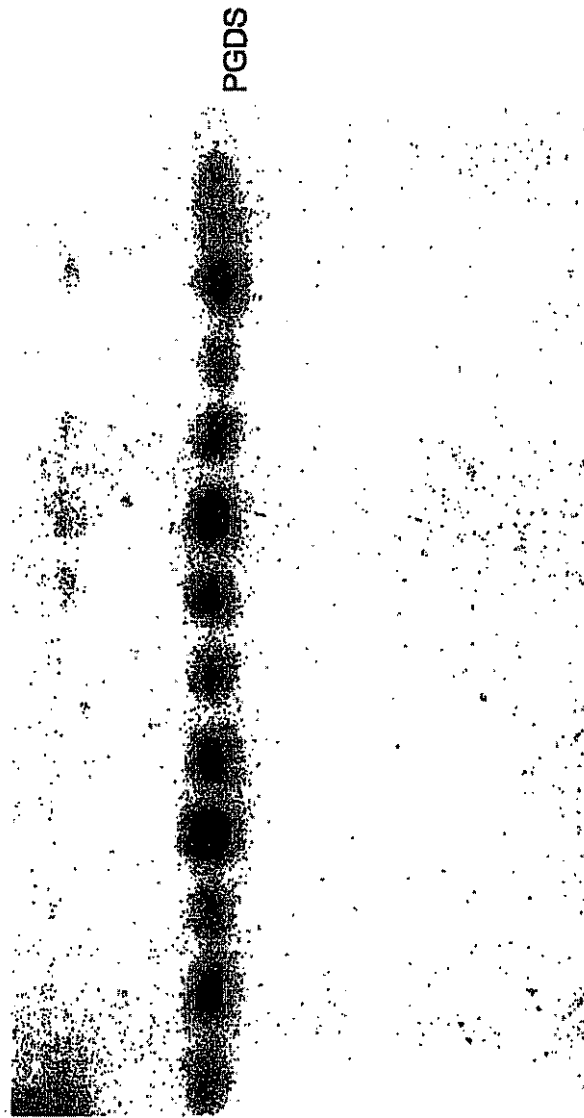


FIG.2B

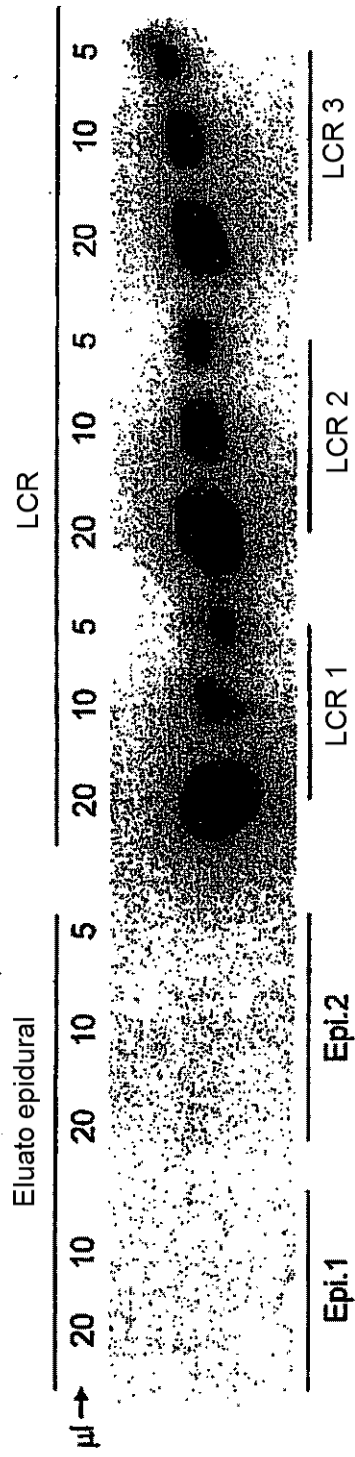


FIG.2C

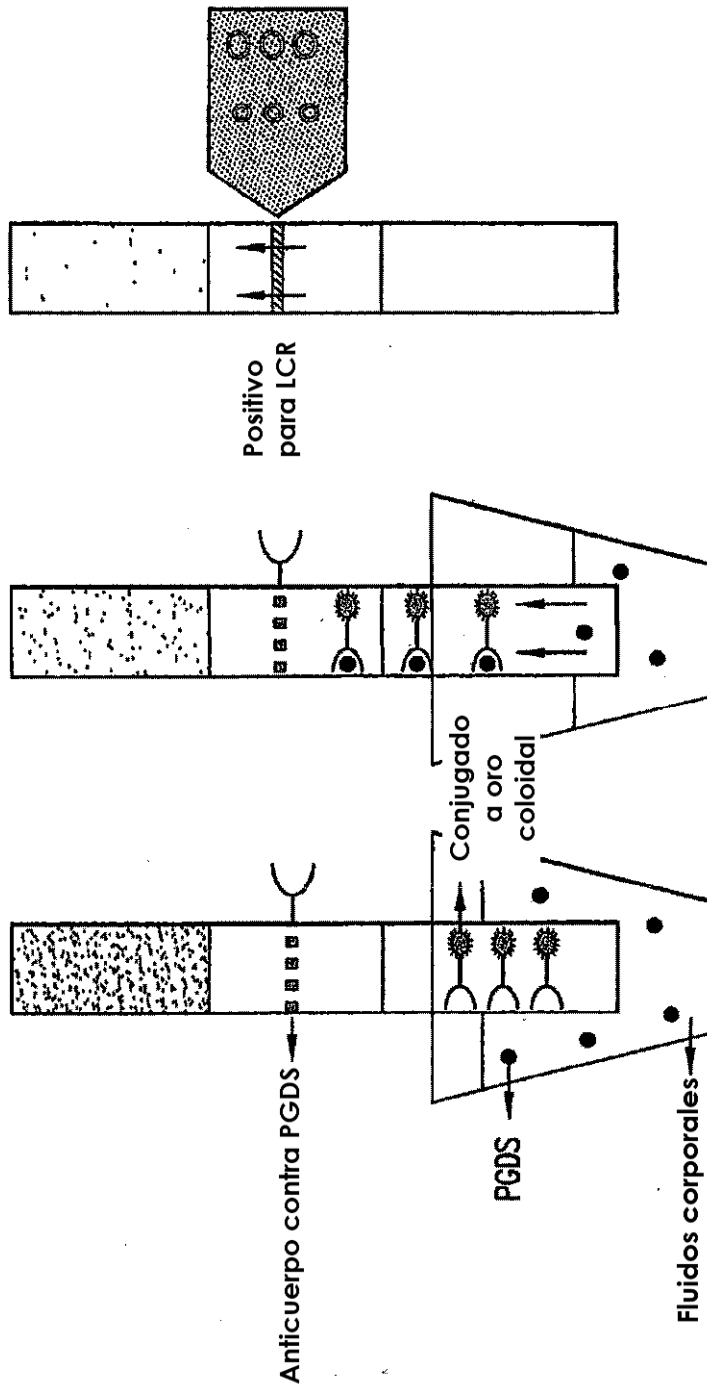


FIG.3

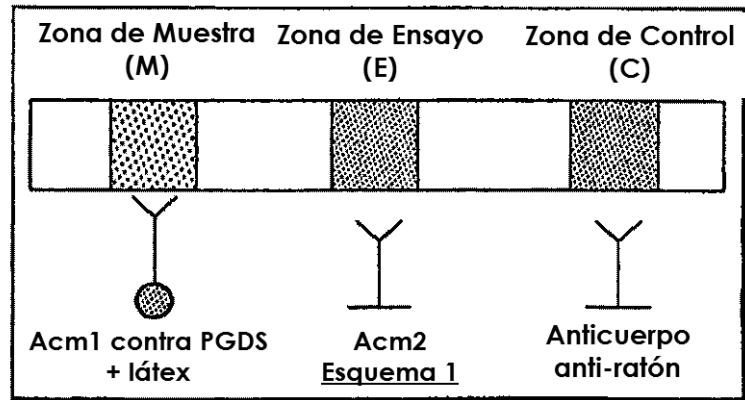


FIG.4

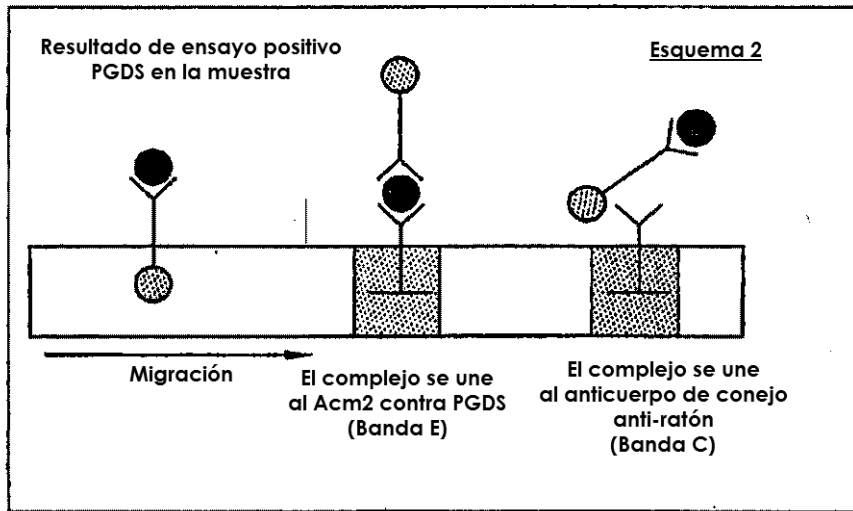


FIG.5A

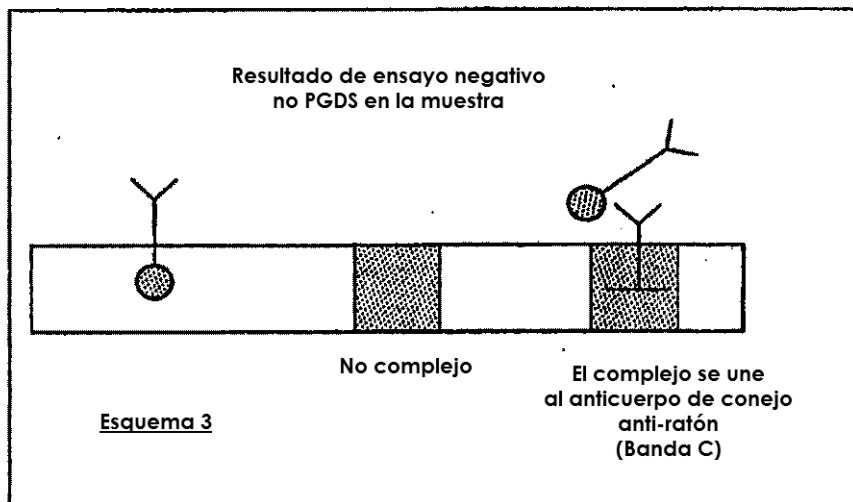


FIG.5B

FIG. 6

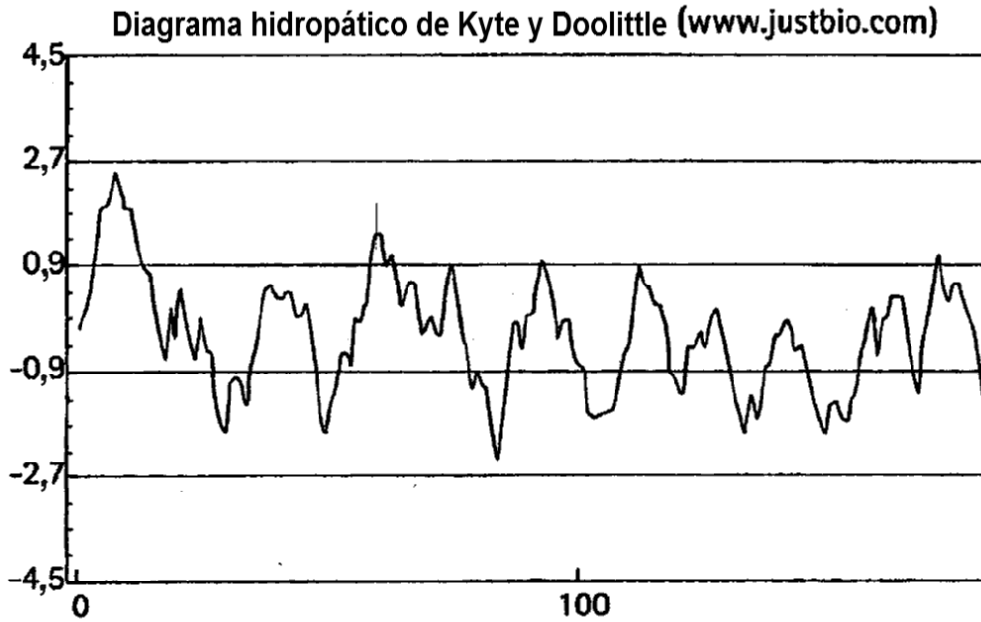


FIG. 7

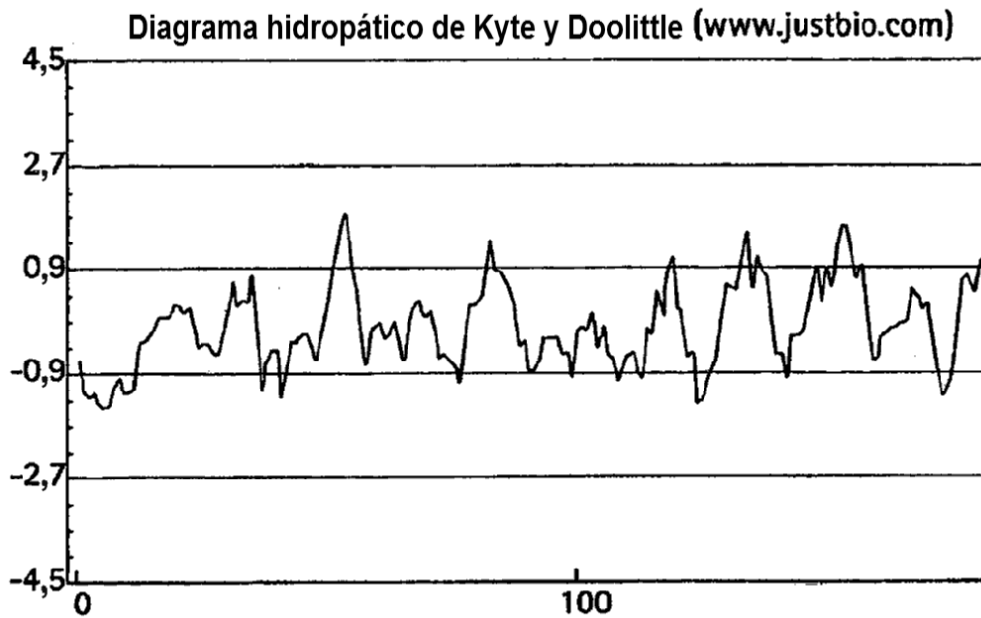


FIG. 8

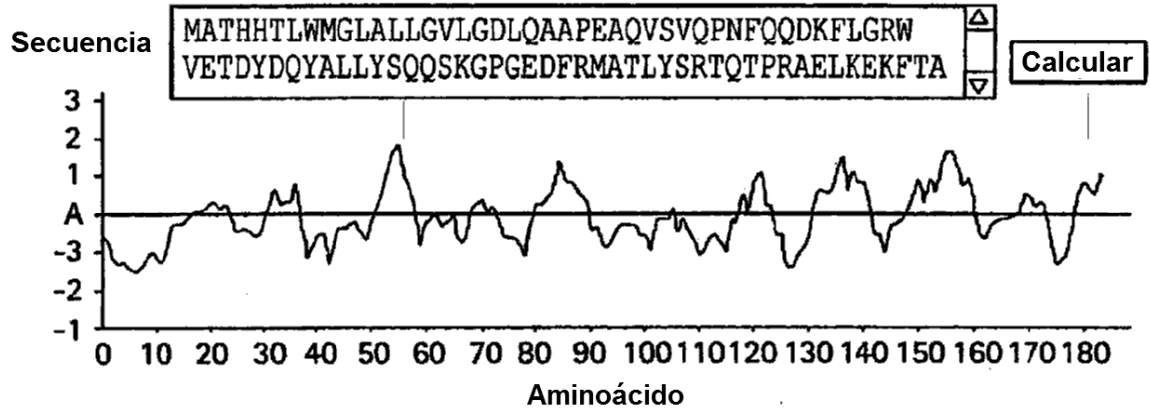


FIG. 9

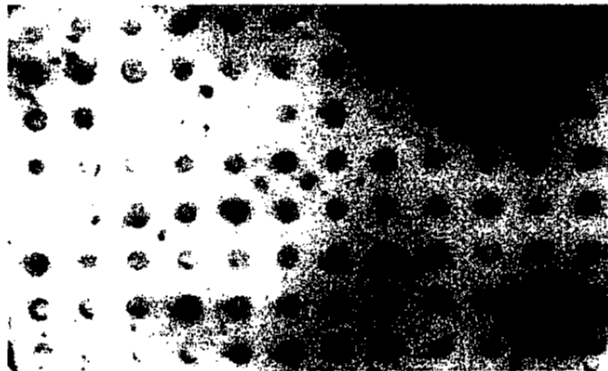


FIG. 10

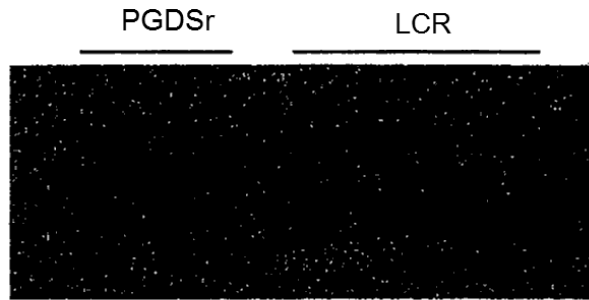


FIG. 11

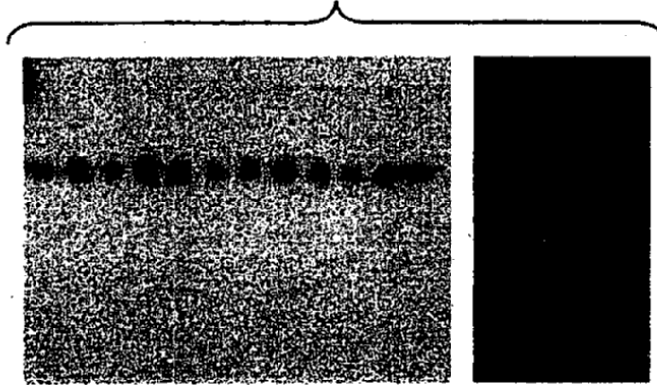


FIG. 12

