

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 320**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2004 PCT/GB2004/050012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2005 WO05029088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2004 E 04787496 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 1664795**

54 Título: **Método de diagnóstico para trastornos relacionados con el daño cerebral**

30 Prioridad:

20.09.2003 GB 0322063
23.06.2004 GB 0414089
27.08.2004 GB 0419068

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2018

73 Titular/es:

ELECTROPHORETICS LIMITED (100.0%)
Hamilton House, Mabledon Place
London WC1H 9BB, GB

72 Inventor/es:

HOCHSTRASSER, DENIS FRANCOIS;
SANCHEZ, JEAN-CHARLES;
LESCUYER, PIERRE y
ALLARD, LAURE

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 657 320 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

Método de diagnóstico para trastornos relacionados con el daño cerebral

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método de diagnóstico para trastornos relacionados con el daño cerebral.

10

No está disponible actualmente ningún marcador biológico para el diagnóstico de rutina de trastornos relacionados con el daño cerebral, incluyendo enfermedades cerebrovasculares, demencia y neurodegenerativas. Esta invención se refiere al uso de líquido cefalorraquídeo de pacientes fallecidos como un modelo para el descubrimiento de marcadores de trastornos relacionados con el daño cerebral, y al uso de dichos marcadores en el diagnóstico.

15

Descripción de la técnica relacionada

Durante las últimas dos décadas, se han estudiado varios marcadores biológicos (biomarcadores) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el suero de pacientes con trastornos relacionados con el daño cerebral, incluyendo la creatina cinasa-BB [1], lactato deshidrogenasa [2], proteína básica de mielina [3], proteína S100 [4], enolasa neuroespecífica (NSE) [5], proteína ácida fibrilar glial [6] y tau [7]. La mayoría de ellos no han demostrado indicadores útiles de la extensión del daño cerebral y predictores precisos del estado clínico y el resultado funcional. De hecho, el valor diagnóstico de los biomarcadores para los trastornos relacionados con el daño cerebral se ha visto obstaculizado por su aparición tardía y un pico tardío después del evento de daño, su poca sensibilidad y

20

25

especificidad, y la limitada comprensión de los mecanismos que gobiernan la liberación de estas moléculas en el LCR y finalmente en la sangre. Como resultado de estas limitaciones, el uso de biomarcadores de trastornos relacionados con el daño cerebral actualmente se limita a los entornos de investigación y ninguno se ha recomendado para una evaluación de rutina [8].

30

El documento WO 01/42793 se refiere a un ensayo de diagnóstico para ictus en el que la concentración de proteína de unión a ácidos grasos del cerebro o del corazón (H-FABP o B-FABP) se determina por ELISA en una muestra de fluido corporal. El documento también divulga que H-FABP y B-FABP son marcadores para ictus.

35

El documento WO 01/67108 divulga que H-FABP y B-FABP son marcadores para encefalopatías espongiiformes transmisibles y también divulga ensayos de diagnóstico para cualquiera de estos marcadores mediante ELISA usando un anticuerpo anti-H-FABP o B-FABP. Además, el documento menciona la medición de B y H-FABP mediante ELISA de tipo sándwich utilizando una placa de microtitulación recubierta con FABP anti-humano que detecta todas las isoformas.

40

Guillaume et al. [13] divulga el uso de H-FABP como un marcador de diagnóstico de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD).

Idealmente, un biomarcador para el diagnóstico, la supervisión y el pronóstico de los trastornos relacionados con el daño cerebral debe incluir al menos las siguientes características: (1) debe ser específico del cerebro; (2) debido a las dificultades obvias para obtener muestras de LCR en pacientes, la detección en suero es altamente deseable; (3) debería aparecer muy temprano; (4) su nivel máximo, alternativamente el área bajo la curva de concentraciones secuenciales, debe reflejar el grado de daño cerebral; finalmente, (5) debería ser indicativo de un resultado funcional. Se demuestran aquí nuevos biomarcadores de trastornos relacionados con el daño cerebral y se proporciona una comparación con S100 y NSE, las dos moléculas, que se han evaluado de forma más exhaustiva para este propósito.

45

50

Se ha descrito cómo las proteínas se han identificado como nuevos biomarcadores de diagnóstico para trastornos relacionados con el daño cerebral usando un análisis basado en proteómica del LCR de pacientes fallecidos como un modelo de daño cerebral masivo. Y se informa como un ejemplo de los resultados obtenidos después de que los niveles séricos de FABP se han determinado secuencialmente usando un ensayo ELISA en pacientes con ictus agudo, en comparación con S100 y NSE. Se ha descrito un ensayo de diagnóstico para ictus usando FABP en el documento WO 01/42793. El uso de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención se puede validar de una manera similar.

55

De acuerdo con una primera divulgación del documento, se describen composiciones que comprenden polipéptidos para los cuales se encontró un nivel aumentado en el líquido cefalorraquídeo de pacientes fallecidos en comparación con el líquido cefalorraquídeo de donantes sanos. De acuerdo con esta misma divulgación, se divulgan composiciones que comprenden anticuerpos que se derivan de los polipéptidos anteriores.

5

De acuerdo con un primer objeto de la invención, se proporcionan métodos que utilizan las composiciones en el diagnóstico y el pronóstico de trastornos relacionados con el daño cerebral.

El presente documento describe lo siguiente:

10

1. Un método de diagnóstico de un trastorno relacionado con el daño cerebral o la posibilidad del mismo en un sujeto sospechoso de padecerlo, que comprende detectar al menos un polipéptido, o una variante o mutante del mismo, seleccionado de A-FABP, E-FABP, B-FABP, PGP 9.5, GFAP, prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, glutatión S transferasa P, catepsina D, proteína DJ-1, peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (ciclofilina A) en una muestra de fluido corporal tomada del sujeto.

15

2. Un método de acuerdo con el punto 1, en el que el polipéptido está contenido diferencialmente en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral y sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral, y el método incluye determinar si la concentración de polipéptido en la muestra es consistente con un diagnóstico de trastorno relacionado con el daño cerebral.

20

3. Un método de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que se usa un anticuerpo contra el polipéptido en la detección o la determinación de la concentración.

4. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 3, en el que el fluido corporal es líquido cefalorraquídeo, plasma, suero, sangre, lágrimas, orina o saliva.

25

5. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 4, en el que el polipéptido está presente en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral y no está presente en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral, por lo que la presencia del polipéptido en una muestra de fluido corporal es indicativa de un trastorno relacionado con el daño cerebral.

30

6. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 4, en el que el polipéptido no está presente en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral y está presente en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral, por lo que la no presencia del polipéptido en una muestra de fluido corporal es indicativa de un trastorno relacionado con el daño cerebral.

35

7. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 6, en el que se determina una pluralidad de péptidos en la muestra.

8. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 7, en el que el polipéptido está sujeto diferencialmente a una modificación postraducciona en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral y sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral, y el método incluye detectar la modificación postraducciona del polipéptido en la muestra y determinar si esto es coherente con un diagnóstico de un trastorno relacionado con el daño cerebral.

40

9. Un método de acuerdo con 8, en el que la modificación postraducciona comprende N-glucosilación.

10. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 9, en el que el trastorno relacionado con el daño cerebral es ictus y el polipéptido es un homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina.

45

11. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 9, en el que el trastorno relacionado con el daño cerebral es ictus y el polipéptido es una subunidad reguladora de unión a ARN.

12. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 9, en el que el trastorno relacionado con el daño cerebral es ictus y el polipéptido es nucleósido difosfato cinasa A.

50

13. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 10 a 12, en el que dos o más marcadores seleccionados de anticuerpos contra el homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, la subunidad reguladora de unión a ARN, el nucleósido difosfato cinasa A se usan en un único pocillo de una placa de microtitulación ELISA.

14. Un método de acuerdo con el punto 13, en el que los tres marcadores se usan en un solo pocillo.

55

15. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 10 a 12, en el que dos o más polipéptidos seleccionados de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, la subunidad reguladora de unión a ARN, y el nucleósido difosfato cinasa A se ensayan por separado, y se usa un algoritmo predictivo para el diagnóstico.

16. Uso de un polipéptido, o una variante o mutante del mismo, seleccionado de A-FABP, E-FABP, B-

FABP, PGP 9.5, GFAP, prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, glutatión S transferasa P, catepsina D, proteína DJ-1, peroxirredoxina 5 y peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (ciclofilina A), o una combinación de dichos polipéptidos, para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas relacionadas con trastornos relacionados con el daño cerebral.

17. Uso de acuerdo con el punto 16, en el que el polipéptido está contenido de forma diferencial en un líquido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral y sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral.

18. Uso para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas, relacionadas con trastornos relacionados con el daño cerebral, de un material que reconoce, se une a, o tiene afinidad por un polipéptido, o una variante o mutante del mismo, seleccionado de A-FABP, E-FABP, B-FABP, PGP 9.5, GFAP, prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, glutatión S transferasa P, catepsina D, proteína DJ-1, peroxirredoxina 5 y peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (ciclofilina A).

19. Uso de acuerdo con el punto 18 de una combinación de materiales, cada uno de los cuales respectivamente reconoce, se une a, o tiene afinidad por un polipéptido, o una variante o mutante del mismo, seleccionado de A-FABP, E-FABP, B-FABP, PGP 9.5, GFAP, prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, glutatión S transferasa P, catepsina D, proteína DJ-1, peroxirredoxina 5 y peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (ciclofilina A).

20. Uso de acuerdo con el punto 18 o 19, en el que el material o cada material es un anticuerpo o chip de anticuerpo.

21. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra A-FABP.

22. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra E-FABP.

23. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra PGP 9.5.

24. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra GFAP.

25. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Prostaglandina D sintasa.

26. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Neuromodulina.

27. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra el Neurofilamento L.

28. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Calcifosina.

29. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra la subunidad reguladora de unión a ARN.

30. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra el homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina.

31. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra el nucleósido difosfato cinasa A.

32. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Glutatión S transferasa P.

33. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Catepsina D.

34. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra proteína DJ-1.

35. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Peroxirredoxina 5.

36. Uso de acuerdo con el punto 20, en el que el material es un anticuerpo contra Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A).

37. Un dispositivo de ensayo para su uso en el diagnóstico de trastornos relacionados con el daño cerebral, que comprende un sustrato sólido que tiene una ubicación que contiene un material que reconoce, se une a o tiene afinidad por un polipéptido, o una variante o mutante del mismo, seleccionado de A-FABP, E-FABP, H-FABP, B-FABP, PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, Glutatión S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A).

38. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con el punto 37, en el que el sustrato sólido tiene una pluralidad de ubicaciones, conteniendo cada una respectivamente un material que reconoce, se une a o tiene afinidad por un polipéptido, o una variante o mutante del mismo, seleccionado de A-FABP, E-FABP, H-FABP, B-FABP, PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, Glutatión S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A).

39. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con el punto 37 o 38, en el que el material es un anticuerpo o chip de anticuerpo.

40. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con el punto 39, que tiene una ubicación direccionable única para cada anticuerpo, para permitir de este modo una lectura de ensayo para cada polipéptido individual o para cualquier combinación de polipéptidos.
- 5 41. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra A-FABP.
42. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra E-FABP.
43. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra PGP 9.5.
- 10 44. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra GFAP.
45. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Prostaglandina D sintasa.
46. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Neuromodulina.
- 15 47. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Neurofilamento L.
48. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Calcifosina.
- 20 49. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra subunidad reguladora de unión a ARN.
50. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina.
51. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra nucleósido difosfato cinasa A.
- 25 52. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Glutatión S transferasa P.
53. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Catepsina D.
- 30 54. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra proteína DJ-1.
55. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Peroxirredoxina 5.
- 35 56. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 40, incluyendo un anticuerpo contra Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A).
57. Un kit para su uso en el diagnóstico de trastornos relacionados con el daño cerebral, que comprende un dispositivo de ensayo de acuerdo con cualquiera del punto 37 a 56, y medios para detectar la cantidad de uno o más de los polipéptidos en una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto.

40 La presente invención proporciona:

1. Un método de diagnóstico de un trastorno relacionado con el daño cerebral seleccionado de traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio y demencia vascular o la posibilidad de los mismos, en un sujeto que se sospecha que padece el mismo, o de pronóstico o seguimiento terapéutico de dicho trastorno relacionado con el daño cerebral en un sujeto, que comprende detectar H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de la subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina y nucleósido difosfato cinasa A, o variantes o mutantes respectivas del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, en una muestra de fluido corporal tomada del sujeto, en el que dicha H-FABP y al menos un polipéptido adicional o dicha variante o mutante, están presentes en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral en una mayor cantidad en comparación con el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral, por lo que una mayor cantidad de dicha H-FABP y al menos un polipéptido adicional o dicha variante o mutante, en la muestra de fluido corporal es indicativa de dicho trastorno relacionado con daño cerebral.
- 45 2. Un método de acuerdo con el punto 1, en el que los anticuerpos contra dicha H-FABP y al menos un polipéptido adicional se usan en la detección.
- 50 3. Un método de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que el fluido corporal es líquido cefalorraquídeo, plasma, suero o sangre.
- 55

4. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 3, que comprende detectar al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A), o una variante o mutante del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas.
5. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 4, en el que el trastorno relacionado con el daño cerebral es ictus y los polipéptidos adicionales comprenden al menos dos polipéptidos seleccionados del homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, subunidad reguladora de unión a ARN y nucleósido difosfato cinasa A.
6. Un método de acuerdo con el punto 5, en el que dos o más anticuerpos contra el homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, subunidad reguladora de unión a ARN, nucleósido difosfato cinasa A y H-FABP se usan en un único pocillo de una placa de microtitulación ELISA, y preferiblemente se usan anticuerpos contra los cuatro marcadores en un único pocillo.
7. Un método de acuerdo con el punto 5 u 6, en el que dos o más polipéptidos seleccionados de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, la subunidad reguladora de unión a ARN, el nucleósido difosfato cinasa A y H-FABP se ensayan por separado, y se usa un algoritmo predictivo para el diagnóstico.
8. Uso de H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de la subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina y nucleósido difosfato cinasa A, o variantes o mutantes respectivos del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, y opcionalmente al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A), o una variante o mutante del mismo que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, para aplicaciones de diagnóstico o pronóstico relacionadas con trastornos relacionados con el daño cerebral seleccionados de traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio y demencia vascular.
9. Uso para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico, en relación con trastornos relacionados con el daño cerebral seleccionados de traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio y demencia vascular, de anticuerpos contra H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina and nucleósido difosfato cinasa A, o variante o mutantes respectivas del mismo que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, y opcionalmente al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A), o una variante o mutante del mismo que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas.
10. Un método de acuerdo con cualquiera del punto 1 a 9, en el que se usa un dispositivo de ensayo que comprende un sustrato sólido que tiene una ubicación que contiene anticuerpos contra dicha H-FABP y dicho al menos un polipéptido adicional, o dichas variantes o mutantes del mismo.
11. Un método de acuerdo con el punto 10, en el que el dispositivo de ensayo tiene una ubicación direccionable única para cada anticuerpo, para permitir de este modo una lectura de ensayo para cada polipéptido individual o para cualquier combinación de polipéptidos.

Los nuevos marcadores usados en la presente invención son como se indican a continuación:

A-FABP (P15090), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.1):

ICDAFVGTWKLVSSENFDYMKVEVGVGFATRKYVAGMAKPNMIISVNGDVITIKSESTFKNTEISFILG
QEFDEVTADDRKVKSTITLDGGVLVHVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVVECVMKGVSTRVYERA
131

E-FABP (Q01469), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.2):

1MATVQQLLEGRWRLVDSKGFDEYMKELGVGIALRKMAMAKPDCIITCDGKNLTIKTESTLKTTF
SCTLGKFEETTADGRKTQVCNFTDGALVQHQEWGKESTITRKLKDGKLVVECVMMNNVTCTRIY
EKVE 135

PGP 9.5 (P09936), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.3):

1 MQLKPMIENP EMLNKVLSRL GVAGQWRFVD VLGLEEEESLG SVPAPACALL LLFPLTAQHE 60
 NFRKKQIEEL KGQEVSPKVY FMKQTIGNSC GTIGLIHAVA NNQDKLGFED GSVLKQFLSE 120
 TEKMSPEDRA KCFEKNIAIQ AAHDAVAQEG QCRVDDKVN FHFILFNNVDG HLYELDGRMP 180
 FPNVHGASSE DTLKDAAKV CREFTEREQG EVRFSVAVALC KAA 223

GFAP (P14136), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.4):

1 MERRRITSAA RRSYVSSGEM MVGGLAPGRR LGPGTRLSLA RMPPLPTRV DFSLAGALNA 60
 GFKETRASER AEMMELNDRF ASYIEKVRFL EQQNKALAAE LNQLRAKEPT KLADVYQAE 120
 RELRLRLDQL TANSARLEVE RDNLAQDLAT VRQKLQDET NLRLEAENLA AYRQEADEAT 180
 LARLDLERKI ESLEEEIRFL RKIHEEEVRE LQEQLARQQV HVELDVAKPD LTAALKEIRT 240
 QYEAMASSNM HEABEWYRSK FADLTDAAAR NAELLRQAKH EANDYRRQLQ SLTCDLES LR 300
 GTNESLERQM REQBERHVRE AASYQEALAR LEEEGQSLKD EMARHLQEYQ DLLNVKLALD 360
 IELATYRKLK EGEENRITIP VQTFSNLQIR ETSLDTKSVS EGHKRNIVV KTVEMRDGEV 420
 IKESKQEHKD VM 432

5

Prostaglandina D sintasa (P41222), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.5):

23 APEAQVSV QPNFQQDKFL GRWFSAGLAS NSSWLREKKA 60
 ALSMCKSVVA PATDGGNLNT STFLRKNQCE TRTMLLPAG SLGYSYSRSP HWGSTYSVSV 120
 VETDYDQYAL LYSQGSKGP GEDFRMATLYS RTQTPRAELK EKFTAFCKAQ GFTEDTIVFL 180
 PQTDKCMTEQ

Neuromodulina (P17677), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.6):

1 MLCCMRRTKQ VEKNDDDDQKI EQDGKPEDK AHKAATKIQA SFRGHITRKK LKGEKKDDVQ 60
 AAEBANKKD EAPVADGVEK KGEGTTTAEA APATGSKPDE PGKAGETPSE EKKGEGDAAT 120
 EQAAPQAPAS SEBKAGSAET ESATKASTDN SPSSKAEDAP AKEBPQADV PAAVTAATAAT 180
 TPAAEADAAA ATAQPPTETG ESSQAENIE AVDETKPKES ARQDEGKBBE PEADQEHA 238

10

Neurofilamento L (P07196), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.7):

1 SFSYEPYYS TSYKRRYVET PRVHISVRSG YSTARSAYSS YSAPVSSLS VRRSYSSSSG 60
 SLMPLENLD LSQVA AISND LKSIRTQEKA QLQDLNDRFA SFIERVHELE QQNKVLEAEL 120
 LVLRQKHSEP SRFRALYEQE IRDLRLAAED ATTNEKQALR GEREEGLEET LRNLQARYEE 180
 EVLSREDAEG RLMERRKGAD EAALARAEL KRIDSLMDEI SFLKKVHBBE IAE LQAQIQY 240
 AQISVEMDVT KPDLSAALKD IRAQYKLA KNMQNAEBWF KSRFTVLTES AAKNTDAVRA 300
 AKDEVSESR LLKAKTLEIE ACRGMNEALE KQLQELEDKQ NADISAMQDT INKLENELRT 360
 TKSEMARYLK EYQDLLNVKM ALDIEIAAYR KLEGEETRL SFTSVGSITS GYSQSSQVFG 420
 RSAYGGLQTS SYLMSTRSFP SYTSHVQEE QTEVEETIEA SKAEEAKDEP PSEGEAE EEE 480
 KDKEBAE EEE AABEBEAAKE ESEEAKE EEE GGE GEEGEEET KEAEBEKKV EGAGEEQA AK 540
 KKD 543

15

Calcifosina (Q13938), que tiene la secuencia (SEQ ID NO.8):

1 MDAVDATMEK LRAQCLSRGA SGIQLARFF RQLDRDGSRS LDADEFRQGL AKLGLVLDQA 60
 EAEGVCRKWD RNSGTL DLE EFLRALRPPM SQAREAVIAA AFAKLD RSGD GVVTVDDL RG 120
 VYSGRAHPKV RSGEWTEDEV LRRFLDNFDS SEKDGQVTLA BFQDYYS GVS ASMNTDEEFV 180
 AMMTSAWQL 189

Subunidad reguladora de unión a ARN (014805), también denominada RNA-BP, que tiene la secuencia (SEQ ID NO.9):

1 MASKRALVIL AKGAEEMETV IPVDVMRRAG IKVTVAGLAG KDPVQCSR DV VICPDASLED 60
 AKKEGPDYDVV VLPGGNLGAQ NLSESA AVKE ILKEQENRKG LIAAICAGPT ALLAHEIGFG 120
 SKVTTHTPLAK DKMMNGGHYT YSENRVEKDG LILTSRGP GT SFEFALAIVE ALNGKEVAAQ 180
 VKAPLV LKD 189

20

Homólogo de proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina (Q92890), también denominado UFD1 o LTFDP1, que tiene la secuencia (SEQ ID NO.10):

1 MFSFNMFDPH IPRVFNQNRFS TQYRCFSVSM LAGPNDRSDV EKGGGKIIMPP SALDQLSRLN 60
 ITYPMLFKLT NKNSDRMTHC GVLEFVADEG ICYLPHWMMQ NLLLEEDGLV QLETVNLQVA 120
 TYSKSKFCYL PHWMMQNLLL EEGGLVQVES VNLQVATYSK FQPQSPDFLD ITNPKAVLEN 180
 ALRNFACLTT GDVLAINYNE KIYELRVMET KPDKAVSIE CDMNVDFDAP LGYKEPERQV 240
 QHEESTEGEA DSHGYAGELG FRAFSGSGNR LDGKKKGVEP SPSPKPGDI KRGIPNYEFK 300
 LGKITFIRNS RPLVKKVEED EAGGRFVAFS GEGQSLRKKG RKP 343

5 Nucleósido difosfato cinasa A (P15531), también denominado NDK A, que tiene la secuencia (SEQ ID NO.11):

1 MANCERFIA IKPDGVQRGL VGEIHKRFEQ KGFRLVGLKF MQASEDLLKE HYVDLKDPRF 60
 FAGLVKYMHS GPVVAMVWEG LNVVKTGRVM LGETNPADSK PGTIRGDFCI QVGRNIIHGS 120
 DSVESAEKEI GLWFHPBELV DYTSCAQNWJ YE 152

Glutación S tranferasa P (P09211), que tiene la secuencia (SEQ ID NO. 12):

1 PPYTVVYFPV RGRCAALRML LADQGSWKE EVVTVETWQE GSLKASCLYG QLPKFQDGD 60
 TLYQSNLTLR HLGRTLGLYG KDQQAALVD MVNDGVEDLR CKYISLIYTN YEAGKDDYVK 120
 ALPGQLKPF E TLLSQNQGK TFIVGDQISF ADYNLLDLLL IHEVLAPGCL DAFPLLSAYV 180
 10 GRLSARPKLK AFLASPEYVN LPINGNGKQ 209

Catepsina D (P07339), que tiene la secuencia (SEQ ID NO. 13):

65 GPIPEV LKNYMDAQYY GEIGIGTPPQ CFTVVFDTGS SNLWVPSIHC KLLDIACWIH 120
 HKYNSDKSST YVKNGTSTFDI HYGSGSLSGY LSQDTVSVPC QSASSASALG GVKVERQVFG 180
 EATKQPGITF IAAKFDGILG MAYPRISVNN VLPVFDNLMQ QKLVDQNIFS FYLSRDPDAQ 240
 PGGELMLGGT DSKYYKGSLS YLNVTRKAYW QVHLDQVEVA SGLTLCKEGC EAVDVTGTSL 300
 MVGPVDEVRE LQKAIGAVPL IQGEYMIPCE KVSTLPAITL KLGKGYKLS PEDYTLKVSQ 360
 AGKTLCLSGF MGMTDIPPSG PLWILGDVFI GRYTYTFDRD NNRVGFABAA RL 412

15 Proteína DJ-1 (Q99497), que tiene la secuencia (SEQ ID NO. 14):

1 MASKRALVIL AKGAEEMETV IPVDVMRRAG IKVTYAGLAG KDPVQCSRVD VICPDASLED 60
 AKKEGPDYDVV VLPGGNLGAQ NLSESAAVKE ILKEQENRKG LIAAICAGPT ALLAHEIGCG 120
 SKVTTHPLAK DKMMNGGHYT YSENRVEKDG LILTSRPGPT SFEFALAIVE ALNGKEVAAQ 180
 VKAPLVKLD 189

Peroxisredoxina 5 (P30044), que tiene la secuencia (SEQ ID NO. 15):

1 MGLAGVICALR RSAGYILVGG AGGQSAAAAA RRCSEGEWAS GGVRFSFRAA AAMAPIKVG 60
 AIPAVEVFEG EPGNKVNLAELFKGKKGVLFGVPGAFTPGC SKTHLPGFVE QAEALKAKGV 120
 QVVAACLSVND AFVTGEWGRA HKAEGKVRLL ADPTGAFGKE TDLLDDSLV SIFGNRRLKR
 20 180FSMVVDGIV KALNVEPDGT GLTCSLAPNI ISQL 214

20 Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A) (P05092), que tiene la secuencia (SEQ ID NO. 16):

1 VNPTVFFDIA VDGEPLGRVS FELFADKVPK TAENFRALST GEKGFYKGS CFHRIIPGFM 60
 CQGGDFTRHN GTGGKSIYGE KFEDENFILK HTGPGILSMA NAGPNTNGSQ FFICTAKTEW 120
 LDGKHVVFVK VKEGMNIVEA MERFGSRNGK TSKKITIADC GQLE 164

Los polipéptidos útiles en la presente invención no están restringidos a las secuencias anteriores, e incluyen 15 variantes y mutantes de los mismos. Una variante se define como una variación de origen natural en la secuencia de un polipéptido que tiene un alto grado de homología con la secuencia dada, y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas. Un mutante se define como una variante creada artificialmente. Un alto grado de homología se define como al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 95 %, y mucho más preferiblemente al menos un 99 % de homología. Las variantes pueden tener lugar dentro de una única especie o

entre diferentes especies. Las secuencias anteriores son de origen humano, pero la invención incluye el uso de los polipéptidos correspondientes de otras especies de mamíferos, por ejemplo, bovinos.

Los trastornos relacionados con el daño cerebral en el contexto de la presente invención incluyen los siguientes:

5 traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio y demencia vascular. Otros trastornos relacionados con el daño cerebral descritos en el documento incluyen degeneración ganglionar corticobasal, encefalitis, epilepsia, síndrome de Landau-Kleffner, hidrocefalia, pseudotumor cerebral, enfermedades talámicas, meningitis, mielitis, trastornos del movimiento, temblor esencial, enfermedades de la médula espinal, siringomielia, enfermedad de Alzheimer (inicio temprano), enfermedad

10 de Alzheimer (inicio tardío), demencia multiinfarto, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, Parkinson, síndromes de Parkinson, demencia frontotemporal, degeneración corticobasal, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad con cuerpos de Lewy, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Dandy-Walker, ataxia de Friedreich, enfermedad de Machado-Joseph, migraña, esquizofrenia, trastornos del estado de ánimo y depresión. También se incluyen trastornos correspondientes en

15 mamíferos no humanos, tales como encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE), por ejemplo, encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) en ganado o tembladera de las ovejas.

H-FABP (P05413) y B-FABP (015540) también son útiles en el presente documento para el diagnóstico de trastornos relacionados con el daño cerebral o la posibilidad de los mismos, especialmente aquellos distintos de

20 ictus y CJD.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de un ensayo para H-FABP (medidos en unidades de DO en el eje vertical) para tres grupos de pacientes: un grupo control, un grupo con infarto agudo de miocardio (AMI) y un grupo con ictus agudo;

25 la figura 2 muestra los resultados de la determinación secuencial de los niveles de H-FABP (medidos en unidades de DO en el eje vertical) para el grupo de pacientes con ictus en diferentes intervalos de tiempo después del ictus;

30 la figura 3 muestra porciones de mapas 2-DE para LCR sano y post-mortem, con flechas dirigidas hacia arriba que indican puntos correspondientes a la subunidad reguladora de unión a ARN o la proteína DJ-1. Se muestran las ampliaciones de mapas 2-DE de LCR sano y LCR de fallecidos. Se cargaron cuarenta y cinco μg de proteína en un gel de IPG (pH 3,5-10 NL, 18 cm). La segunda dimensión fue un gel de placa de gradiente vertical (9-16 % de T). El gel estaba teñido de plata. Los puntos correspondientes a la subunidad reguladora de unión a ARN o a la proteína DJ-1 están indicados por flechas dirigidas hacia arriba (de color rojo);

35 la figura 4 muestra porciones de mapas 2-DE para LCR sano y post mortem, indicando las flechas de la derecha puntos correspondientes a peroxirredoxina 5. Se muestran las ampliaciones de mapas 2-DE de LCR sano y LCR de fallecidos. Se cargaron cuarenta y cinco μg de proteína en un gel de IPG (pH 3,5-10 NL, 18 cm). La segunda dimensión fue un gel de placa de gradiente vertical (9-16 % de T). El gel estaba teñido de plata. El punto correspondiente a Peroxirredoxina 5 está indicado por las flechas de la derecha (de color rojo);

40 la figura 5 muestra porciones de mapas 2-DE para LCR sano y post-mortem, indicando el par de flechas de la derecha puntos correspondientes a peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (ciclofilina A). Se muestran las ampliaciones de mapas 2-DE de LCR sano y LCR de fallecidos. Se cargaron cuarenta y cinco μg de proteína en un gel de IPG (pH 3,5-10 NL, 18 cm). La segunda dimensión fue un gel de placa de gradiente vertical (9-16 % de T). El gel estaba teñido de plata. Los puntos correspondientes a la Ciclofilina A están indicados por el par de flechas (de color rojo) de la derecha;

45 la figura 6 muestra los valores de intensidad de ELISA para polipéptidos marcadores obtenidos en un estudio de pacientes con ictus;

50 la figura 7 muestra la detección de UFD1 en muestras de plasma de dicho estudio;

la figura 8 es una curva ROC de UFD1 a partir de los datos en la figura 7;

la figura 9 muestra la detección de UFD1 correspondiente a la figura 7;

55 la figura 10 muestra la detección de RNA-BP en muestras de plasma de dicho estudio;

la figura 11 es una curva ROC de RNA-BP a partir de los datos en la figura 10;

la figura 12 muestra la detección de RNA-BP correspondiente a la figura 10;

la figura 13 muestra la detección de NDK A en muestras de plasma de dicho estudio;

la figura 14 es una curva ROC de NDK A a partir de los datos en la figura 13;

la figura 15 muestra la detección de NDK A correspondiente a la figura 13;

la figura 16 muestra porciones de mapas 2-DE para LCR sano y post mortem que indican los niveles de prostaglandina D sintasa;

la figura 17 muestra las intensidades puntuales de prostaglandina D2 sintasa en geles mini-2-DE preparados con LCR de un paciente con CJD y un paciente sano como control;

5 la figura 18 muestra los valores de intensidad de ELISA para H-FABP obtenidos en un estudio de pacientes con ictus y un grupo de control;

la figura 19 muestra las intensidades puntuales de UFDP-1 en geles mini-2-DE preparados con LCR de un control y un paciente fallecido;

10 la figura 20 muestra la concentración en plasma de UFDP1 medida por ELISA para dos cohortes de pacientes con ictus y controles de Ginebra y de Estados Unidos;

la figura 21 muestra las intensidades puntuales de RNA-BP en geles mini-2-DE preparados con LCR de un control y un paciente fallecido;

la figura 22 muestra la concentración en plasma de RNA-BP medida mediante ELISA para tres estudios de controles y pacientes con ictus;

15 la figura 23 muestra las intensidades puntuales de NDKA en geles mini-2-DE preparados con LCR de un control y un paciente fallecido;

la figura 24 muestra la concentración en plasma de NDKA medida por ELISA para dos cohortes de pacientes con ictus y controles procedentes de Ginebra y de Estados Unidos;

20 la figura 25a muestra el tiempo de inicio de los síntomas, mostrando la concentración del marcador de ictus (SM) para UFDP1, RNA-BP y NDKA, en cada caso respectivamente para los controles, pacientes con ictus a menos de 3 horas desde el momento del ictus, y pacientes con ictus en más de 3 horas desde el momento del ictus;

25 la figura 25b muestra datos del tipo de ictus, que muestran la concentración del marcador de ictus para UFDP1, RNA-BP y NDKA, en cada caso respectivamente para controles, pacientes con ictus hemorrágico, pacientes con ataque isquémico transitorio (TIA) y pacientes con ictus isquémico;

la figura 26 es un resumen de información para un panel de marcadores plasmáticos tempranos de ictus;

la figura 27 muestra los valores de intensidad de ELISA para una mezcla de UFD1, RNA-BP, NDKA y H-FABP en el mismo pocillo;

30 la figura 28 es una representación gráfica de combinaciones de dos de los cuatro biomarcadores de la figura 27, que muestran los valores de corte seleccionados para el diagnóstico;

las figuras 29A y 29B muestran información relacionada con 37 muestras de plasma de ictus y 37 de control emparejadas por edad y sexo en un estudio adicional. El diagnóstico (Diag) se muestra como I (ictus isquémico), H (ictus hemorrágico), TIA (ataque isquémico transitorio) o ctrl (control). También se muestran las concentraciones determinadas por ELISA de UFD1, RNA-BP y NDK A. Se realizó el análisis ELISA como se ha descrito previamente;

35 la figura 30 muestra los resultados de este estudio adicional para 37 muestras de plasma de ictus y 37 muestras de control ensayadas en Ginebra para UFD1. Datos de USA-1 (controles no emparejados por sexo y edad) para UFD1;

40 la figura 31 muestra los resultados de este estudio adicional para 37 muestras de plasma de ictus y 37 muestras de control ensayadas en Ginebra para RNA-BP. Datos de USA-1 (controles no emparejados por edad y sexo) y USA-2 (controles emparejados por edad y sexo) para RNA-BP;

la figura 32 muestra los resultados de un estudio a gran escala USA3 en 633 pacientes para RNA-BP;

la figura 33 muestra un análisis estadístico (Kruskal-Wallis) en USA-3 para RNA-BP;

45 la figura 34 muestra los resultados para 33 muestras de plasma de ictus y 33 muestras de control ensayadas en Ginebra para NDKA. Datos de USA-1 (controles no emparejados por edad y sexo) para NDK A;

la figura 35 muestra los resultados de un estudio a gran escala USA3 en 622 pacientes para NDKA;

la figura 36 muestra un análisis estadístico (Kruskal-Wallis) en USA-3 para NDKA;

50 la figura 37 muestra la concentración del marcador de ictus en función del inicio del tiempo de los síntomas (datos de Ginebra, 37 muestras de plasma nuevas de ictus y 37 de control);

la figura 38 muestra la concentración del marcador de ictus en función del tipo de ictus (hemorrágico, isquémico, TIA) usando datos de USA-1.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

55 La invención presentada aquí se dirige a métodos para detectar el aumento o reducción de los niveles de polipéptidos en fluidos corporales que incluyen componentes sanguíneos (por ejemplo, plasma o suero) o líquido cefalorraquídeo de pacientes afectados por un trastorno relacionado con daño cerebral, incluyendo enfermedades cerebrovasculares y demencia. Para este propósito, se pueden usar anticuerpos o cualquier método específico de

detección de polipéptidos.

Los anticuerpos contra los marcadores de proteínas de daño cerebral, en particular sus dominios de unión a proteínas, son adecuados como herramientas de detección. Los métodos moleculares biológicos y biotecnológicos se pueden usar para alterar y optimizar las propiedades del anticuerpo de dichas moléculas de una manera específica. Además de esto, los anticuerpos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, por medio de acetilación, carbamoylación, formilación, biotinylación, acilación o derivatización con polietilenglicol o polímeros hidrófilos, para aumentar su estabilidad.

10 H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina and nucleósido difosfato cinasa A se determinan en una muestra de fluido corporal, por ejemplo, usando un anticuerpo contra los mismos. En una realización, se determina al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A) en una muestra de fluido corporal, por ejemplo, usando un anticuerpo contra el mismo. El marcador se mide preferiblemente mediante un inmunoensayo, usando un anticuerpo específico contra el polipéptido y midiendo el alcance de la interacción antígeno (polipéptido)/anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo diseñado (quimérico). Los anticuerpos contra los polipéptidos son conocidos y están disponibles en el mercado. Además, el método habitual de Köhler-Milstein puede usarse para generar anticuerpos. Menos preferiblemente, el anticuerpo puede ser policlonal. En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpos" incluye fragmentos de unión de anticuerpos, tales como fragmentos monocatenarios o Fab.

Se puede usar cualquier método conocido de inmunoensayo. En un ensayo sándwich, un anticuerpo (por ejemplo, policlonal) contra el polipéptido se une a la fase sólida tal como un pocillo de una placa de microtitulación de plástico, y se incuba con la muestra y con un segundo anticuerpo marcado específico para el polipéptido a detectar. Como alternativa, se puede usar un ensayo de captura de anticuerpos (también denominado "inmunoensayo indirecto"). Aquí, se permite que la muestra de ensayo se una a una fase sólida, y luego se añade el anticuerpo anti-polipéptido (policlonal o monoclonal) y se permite que se una. Si se usa un anticuerpo policlonal en este contexto, deseablemente debe ser uno que muestre una baja reactividad cruzada con otras formas de polipéptido. Después de lavar el material no unido, la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida se determina usando un segundo anticuerpo marcado, anti- contra el primero.

Se puede realizar un ensayo directo usando un anticuerpo anti-polipéptido marcado. Se deja que la muestra de ensayo se una a la fase sólida y se añade el anticuerpo anti-polipéptido. Después de lavar el material no unido, se determina la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida. El anticuerpo se puede marcar directamente en lugar de a través de un segundo anticuerpo.

En otra realización, se puede realizar un ensayo de competición entre la muestra y un polipéptido marcado o un péptido derivado del mismo, estando estos dos antígenos compitiendo por una cantidad limitada de anticuerpo anti-polipéptido unido a un soporte sólido. El polipéptido o péptido marcado puede preincubarse con el anticuerpo en la fase sólida, por lo que el polipéptido en la muestra desplaza parte del polipéptido o péptido del mismo unido al anticuerpo.

En otra realización más, se permite que los dos antígenos compitan en una sola co-incubación con el anticuerpo. Después de eliminar el antígeno no unido del soporte mediante lavado, se determina la cantidad de marcador unido al soporte y la cantidad de proteína en la muestra se mide por referencia a las curvas de valoración estándar establecidas previamente.

En todo momento, el marcador es preferiblemente una enzima. El sustrato para la enzima puede ser de formación de color, fluorescente, quimioluminiscente o electroquímico, y puede ser soluble o precipitar. Como alternativa, el marcador puede ser un radioisótopo o fluorescente, por ejemplo, usando fluoresceína conjugada.

La enzima puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, y se puede usar de forma conveniente colorimétricamente, por ejemplo, usando fosfato de p-nitrofenilo como un sustrato de formación de amarillo con fosfatasa alcalina.

Para un ensayo de quimioluminiscencia, el anticuerpo se puede marcar con un éster de acridinio o peroxidasa de rábano picante. Este último se usa en un ensayo quimioluminiscente mejorado (ECL). Aquí, el anticuerpo, marcado con peroxidasa de rábano picante, participa en una reacción quimioluminiscente con luminol, un sustrato de peróxido

y un compuesto, que mejora la intensidad y la duración de la luz emitida, típicamente, 4-yodofenol o ácido 4-hidroxicinámico.

Se puede usar un inmunoensayo amplificado tal como inmuno-PCR. En esta técnica, el anticuerpo se une covalentemente a una molécula de ADN arbitrario que comprende cebadores de PCR, por lo que el ADN con el anticuerpo unido a éste se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Véase E. R. Hendrickson et al., *Nucleic Acids Research* 1995; 23, 522-529 (1995) o T. Sano et al., en "Molecular Biology and Biotechnology" ed. Robert A. Meyers, VCH Publishers, Inc. (1995), páginas 458 - 460. La señal se lee como anteriormente.

10 En un procedimiento, se puede usar un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar el polipéptido.

El uso de un inmunoensayo turbidimétrico mejorado con micropartículas rápido, desarrollado para H-FABP en el caso de AMI, M. Robers et al., "Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction", *Clin. Chem.* 1998; 44: 1564-1567, disminuye significativamente el tiempo del ensayo. Por lo tanto, la automatización completa en un analizador de química clínica ampliamente utilizado, tal como el sistema COBAS™ MIRA Plus de Hoffmann-La Roche, descrito por M. Robers *et al.* anteriormente, o el sistema AxSYM™ de Abbott Laboratories, debe ser posible y aplicarse para el diagnóstico clínico de rutina de los trastornos relacionados con el daño cerebral.

20 Las concentraciones de polipéptido se pueden medir por otros medios que el inmunoensayo. Por ejemplo, la muestra se puede someter a electroforesis en gel 2D y se puede estimar la cantidad del polipéptido mediante exploración densitométrica del gel o de una transferencia del mismo. Sin embargo, es deseable realizar el ensayo de una manera rápida, para que el paciente pueda ser tratado con prontitud.

25 En principio, cualquier fluido corporal se puede usar para proporcionar una muestra para el diagnóstico, pero preferiblemente el fluido corporal es líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma, suero o sangre.

De acuerdo con la invención, puede hacerse un diagnóstico de trastornos relacionados con daño cerebral a partir de la determinación de H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina y nucleósido difosfato cinasa A, o variantes o mutantes respectivos del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas.

35 La invención también se refiere al uso de H-FABP y uno o más de los polipéptidos especificados que están contenidos diferencialmente en un fluido corporal de sujetos afectados por daño cerebral y sujetos no afectados por daño cerebral, para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico. Esto puede implicar la preparación y/o el uso de un anticuerpo que reconoce, se une a o tiene cierta afinidad al polipéptido mencionado anteriormente. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye antisuero policlonal, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos tales como Fab, y anticuerpos genéticamente modificados. Los anticuerpos pueden ser quiméricos o de una sola especie. La referencia anterior a las aplicaciones de "pronóstico" incluye hacer una determinación del curso probable de un trastorno relacionado con el daño cerebral, por ejemplo, midiendo la cantidad del polipéptido mencionado anteriormente en una muestra de fluido corporal. La referencia anterior a las aplicaciones de "seguimiento terapéutico" incluye hacer una determinación del curso probable de un trastorno relacionado con el daño cerebral, por ejemplo, midiendo la cantidad del polipéptido mencionado anteriormente en una muestra de fluido corporal (y evaluando su nivel en función del tratamiento, la recuperación de la discapacidad o no, el tamaño de las lesiones, etc.). La referencia anterior a las aplicaciones "terapéuticas" descritas en este documento incluye, por ejemplo, la preparación de materiales que reconocen, se unen a o tienen afinidad a los polipéptidos mencionados anteriormente, y que usan dichos materiales en terapia. Los materiales pueden en este caso modificarse, por ejemplo, combinando un anticuerpo con un fármaco, por lo que se dirige el fármaco a una región específica del paciente.

La referencia anterior a "presencia o ausencia" de un polipéptido debe entenderse que significa simplemente que existe una diferencia significativa en la cantidad de un polipéptido que se detecta en la muestra afectada y no afectada. Por lo tanto, la "ausencia" de un polipéptido en una muestra de ensayo puede incluir la posibilidad de que el polipéptido esté realmente presente, pero en una cantidad significativamente menor que en una muestra de ensayo comparativa. De acuerdo con la invención, se puede hacer un diagnóstico sobre la base de la presencia o ausencia de un polipéptido, y esto incluye la presencia de un polipéptido en una cantidad significativamente más baja o significativamente mayor con referencia a una muestra de ensayo comparativa.

Se debe entender que las referencias anteriores para "detectar" un polipéptido incluyen una referencia a composiciones y métodos para detectar modificaciones postraduccionales de los polipéptidos además de variaciones cuantitativas.

- 5 Como ejemplo, se han detectado diferencias en el patrón de modificaciones postraduccionales de la prostaglandina D sintasa entre LCR post-mortem y de control. También se detectaron diferencias similares entre el LCR de un paciente que padecía la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y el LCR de control. Esto se describe en el Ejemplo 5 a continuación. Por lo tanto, la invención incluye la detección de modificaciones postraduccionales en general, y la determinación de si dichas modificaciones de un polipéptido son consistentes con un diagnóstico de un trastorno
10 relacionado con el daño cerebral.

- Los kits y dispositivos de ensayo para su uso en el diagnóstico de trastornos relacionados con el daño cerebral también se describen en el documento. Estos pueden incluir uno o más anticuerpos contra un polipéptido seleccionado de A-FABP, E-FABP y cualquier otro FABP, es decir, H-FABP o B-FABP, PGP 9.5, GFAP,
15 prostaglandina D sintasa, neuromodulina, neurofilamento L, calcifosina, subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, nucleósido difosfato cinasa A, glutatión S transferasa P, catepsina D, proteína DJ-1, peroxirredoxina 5 y peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (ciclofilina A). Los anticuerpos se unirán a los polipéptidos apropiados en una muestra de fluido tomada de un paciente. Los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Preferiblemente, cada anticuerpo se coloca en una
20 ubicación direccionable única, para permitir de este modo la lectura del ensayo separada para cada polipéptido individual en la muestra, así como lecturas para cualquier combinación seleccionada de polipéptidos.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

25 EJEMPLO 1

Usando la separación por electroforesis en gel bidimensional (2-DE) de las proteínas del líquido cefalorraquídeo (LCR) y técnicas de espectrometría de masas, 15 polipéptidos nombrados en la Tabla 1 se encontraron elevados o
30 disminuidos en el LCR de pacientes fallecidos, utilizados como un modelo de daño cerebral masivo.

30 Población de estudio y manejo de muestras

- Se utilizaron ocho muestras de LCR para el enfoque basado en proteómica con el objetivo de descubrir marcadores de trastornos relacionados con el daño cerebral. Cuatro de estas muestras se obtuvieron en la autopsia de pacientes
35 fallecidos 6 horas después de la muerte sin ninguna patología del sistema nervioso central. Se recogieron otros cuatro por punción lumbar de pacientes vivos que tenían un estudio neurológico para afecciones benignas no relacionadas con el daño cerebral (cefalea atípica y parálisis idiopática del nervio facial periférico). Las muestras de LCR se centrifugaron inmediatamente después de la recolección, se dividieron en alícuotas, se congelaron a -80 °C y se almacenaron hasta el análisis.

40 LCR 2-DE

- Todos los reactivos y aparatos usados se han descrito en detalle en otra parte [9]. Se mezclaron 250 µl de LCR con 500 µl de acetona enfriada con hielo (-20 °C) y se centrifugaron a 10000 g a 4 °C durante 10 minutos. El sedimento
45 se mezcló con 10 µl de una solución que contenía SDS al 10 % (p/v) y DTE al 2,3 % (p/v). La muestra se calentó a 95 °C durante 5 minutos y luego se diluyó a 60 µl con una solución que contenía urea 8 M, CHAPS al 4 % (p/v), Tris 40 mM, DTE 65 mM y una traza de azul de bromofenol. La muestra de LCR diluida final completa correspondiente a 45 µg se cargó en una copa en el extremo catódico de las tiras de IPG. El 2-DE se realizó como se ha descrito anteriormente [10]. En resumen, la primera separación proteica dimensional se realizó usando un IPG comercial no
50 lineal de 18 cm de pH 3,5 a 10 de Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia). La segunda separación dimensional se realizó en geles de placas de gradiente vertical fabricados *in house* (9-16 % de T, 2,6 % de C). Después, los geles analíticos se tiñeron con tinción de plata amoniacal [11]. Los geles se escanearon usando un densitómetro láser (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). El análisis de imagen informática 2-DE se realizó con el paquete de software MELANIE 3 [12].

55 Identificación por espectrometría de masas

Se encontraron puntos expresados diferencialmente a través de la comparación de geles analíticos de LCR de fallecidos frente a LCR sano (n = 4). Se analizaron los puntos de interés mediante la huella de masa peptídica

usando un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (PerSeptive Biosystems Voyager STR MALDI-TOF-MS, Framingham, MA, Estados Unidos) [10] y se identificaron a través de una base de datos usando la herramienta PeptIdent (<http://www.expasy.ch/sprot/peptident.html>).

5

Tabla 1:

| | |
|---|--------|
| A-FABP | P15090 |
| E-FABP | Q01469 |
| PGP 9.5 | P09936 |
| GFAP | P14136 |
| Prostaglandina D sintasa | P41222 |
| Neuromodulina | P17677 |
| Neurofilamento L | P07196 |
| Calcifosina | Q13938 |
| Subunidad reguladora de unión a ARN | O14805 |
| Homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina | Q92890 |
| Nucleósido difosfato cinasa A | P15531 |
| Glutación S transferasa P | P09211 |
| Catepsina D | P07339 |
| H-FABP | P05413 |
| B-FABP | O15540 |

EJEMPLO 2

Usando la separación por electroforesis en gel bidimensional (2-DE) de las proteínas del líquido cefalorraquídeo (LCR) y técnicas de espectrometría de masas, se encontró FABP elevado en el LCR de pacientes fallecidos, utilizado como un modelo de daño cerebral masivo. Dado que H-FABP, una forma de FABP presente en muchos órganos, también se localiza en el cerebro, se desarrolló un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar H-FABP en muestras de plasma de ictus frente a control. Sin embargo, siendo también H-FABP un marcador de infarto agudo de miocardio (AMI), los niveles de troponina I y creatina cinasa MB (CK-MB) se ensayaron al mismo tiempo para excluir cualquier daño concomitante al corazón. Los niveles de NSE y S100B se ensayaron simultáneamente.

Población de estudio y manejo de muestras

La población usada para la evaluación en plasma de los diversos marcadores detallados a continuación incluyó un total de 64 pacientes estudiados prospectivamente (Tabla 2) distribuidos equitativamente en tres grupos: (1) un grupo de control que incluía 14 hombres y 8 mujeres de 65 años (intervalos: 34-86 años) sin afección periférica o del sistema nervioso central conocida; (2) un grupo de pacientes con infarto agudo de miocardio (grupo AMI), incluyendo 14 hombres y 6 mujeres de 65 años (intervalos: 29 a 90 años); el diagnóstico de AMI se estableció en todos los casos mediante modificaciones típicas de electrocardiografía y niveles elevados de CK-MB (por encima de un valor de corte de 9,3 ng/ml) y de troponina I (por encima de un valor de corte de 2 ng/ml); (3) un grupo de pacientes con ictus agudo (grupo Ictus), incluyendo 14 hombres y 8 mujeres de 65 años (intervalos: 30 a 87 años); el diagnóstico de ictus fue establecido por un neurólogo cualificado y se basó en la aparición repentina de un déficit neurológico focal y la posterior delineación de una lesión compatible con los síntomas en imágenes cerebrales de TC o RM, con la excepción de los ataques isquémicos transitorios (TIA) donde una lesión visible no fue requerida para el diagnóstico. El grupo Ictus se separó de acuerdo con el tipo de ictus (isquemia o hemorragia), la ubicación de la lesión (tronco encefálico o hemisferio) y la evolución clínica a lo largo del tiempo (TIA cuando la recuperación completa se produjo en 24 horas o el ictus establecido cuando el déficit neurológico todavía estaba presente después de 24 horas).

35

Tabla 2

| Grupo | Control | AMI | Ictus | Ictus | | | | | |
|-------------|---------|-----|-------|-------------|------------|----------------|------------|------|-----|
| | | | | Diagnóstico | | Ubicación | | Tipo | |
| | | | | Isquemia | Hemorragia | Tallo cerebral | Hemisferio | TIA | CVA |
| Diagnóstico | | | | | | | | | |
| Número | 22 | 20 | 22 | | | | | | |
| Ictus | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|----|---|---|----|---|----|--|--|
| H-FABP | | | | | | | | | | | |
| DO >0,531 | 0 | 20 | 15 | 11 | 4 | 3 | 12 | 3 | 12 | | |
| DO <0,531 | 22 | 0 | 7 | 5 | 2 | 1 | 6 | 2 | 5 | | |
| Troponina 1 | | | | | | | | | | | |
| >2 ng/ml | 0 | 20 | 1 | | | | | | | | |
| <2 ng/ml | 22 | 0 | 21 | | | | | | | | |

Para cada paciente de los tres grupos, se recolectó una muestra de sangre en el momento de la admisión en tubos que contenían heparina seca. Después de la centrifugación a 1500 g durante 15 minutos a 4 °C, las muestras de plasma se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis. Para el grupo Ictus, se tomaron tres muestras de sangre adicionales después del evento neurológico: <24 horas; <48 horas; y >48 horas. En este grupo, el intervalo de tiempo entre el evento neurológico y la primera extracción de sangre fue de 185 minutos (con variación de 40 minutos a 3 días). Este parámetro se tuvo en cuenta en el análisis de datos. Cada paciente o los familiares del paciente dieron su consentimiento informado antes de la inscripción.

10 Medición de FABP

Los niveles de H-FABP se midieron en plasma mediante un ELISA tipo sándwich. Se recubrió una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (NUNC, Polyabo, CH) con 100 µl/pocillo de FABP de músculo policlonal de cabra antihumano (Spectral Diagnosis HC, Ontario, Estados Unidos), 20,4 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6, durante una noche en 4 °C. La placa se lavó automáticamente con PBS (Na₂PO₄ 15 mM-NaCl 120 mM-KCl 2,7 mM pH 7,4, Sigma) en un BioRad NOVAPATH™ WASHER (Hercules, CA). Cada etapa de lavado se realizó con PBS fresco. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con 200 µl/pocillo de caseína al 2 % (p/v) en tampón de carbonato durante 2 h a 37 °C. Después de la etapa de lavado, las muestras se pipetearon por duplicado a 100 µl/pocillo. La placa se incubó durante 2 h a 37 °C. Después de la etapa de lavado, se incubaron 100 µl/pocillo de FABP de corazón antihumano de ratón (clon 66E2, HyCult biotechnology bv, Uden, Países Bajos), 0,3 µg/ml en PBS-BSA al 1 % (p/v), durante 1 h a temperatura ambiente (T.A.) con agitación. Después de la etapa de lavado, se incubaron 100 µl/pocillo de inmunoglobulinas anti-ratón marcadas con fosfatasa (Dako, Dinamarca), 15 µg/ml en PBS, durante 1 h 30 a T.A. con agitación. Después de la etapa de lavado, se incubaron 50 µl/pocillo de sustrato de fosfatasa, 1,5 mg/ml de fosfato de paranitrofenilo en dietanolamina durante 30 min. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de NaOH 1 M. Se evaluó el desarrollo de color con un lector de microplacas, analizador cinético Milenia™ (DPC, LA, Estados Unidos), a una longitud de onda de 405 nm.

Medición de CK-MB y Troponina I

Se centrifugaron muestras de plasma a 1500 g durante 15 min, y se almacenaron alícuotas a -20 °C. Los niveles séricos de CK-MB y troponina I se determinaron usando un inmunoensayo enzimático de micropartículas fluorescentes (MEIA) con un sistema de analizador químico automático AxSYM™ (ABBOTT Laboratories, Abbott Park, IL). La tasa de formación de productos fluorescentes fue directamente proporcional a la cantidad de Troponina I en la muestra. El límite de detección para Troponina I fue 0,3 µg/l. La medición de CK-MB es proporcional a la cantidad de sondas fluorescentes y el límite de detección fue de 0,7 µg/l.

Medición de NSE y S100

De forma similar a las mediciones de H-FABP, se analizaron NSE y S100B en las cuatro muestras de plasma en serie del grupo Ictus. Se usaron los kits ELISA SMART S-100 y SMART-NSE. Ambos han sido comercializados por Skye PharmaTech Inc. (Ontario, CA). Los límites de detección para NSE y S100B fueron 1 µg/l y 0,01 µg/l, respectivamente.

Análisis estadístico

Los niveles de H-FABP se expresaron en valores de densidad óptica (DO) como media ± DE. Dado que la H-FABP recombinante no estaba disponible, no se pudo realizar la calibración externa para expresar los resultados como unidades de concentración (ng/ml). Los niveles de troponina I y CK-MB se expresaron en ng/ml. Debido a que las concentraciones plasmáticas de H-FABP, troponina I y CK-MB no cumplían los criterios para una distribución gaussiana en ninguna de las poblaciones normal, de ictus y AMI de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov,

las comparaciones entre los tres grupos se realizaron usando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el procedimiento post hoc de Dunn. Las comparaciones entre los subgrupos de ictus definidos anteriormente se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney y la evaluación longitudinal de las concentraciones de H-FABP a lo largo del tiempo se analizaron usando el análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA). Los límites de referencia para H-FABP con el objetivo de distinguir los pacientes de ictus frente a los normales se delinearon usando las curvas de características operativas del receptor (software Analyze-It™ para Microsoft Excel™) y, posteriormente, se calcularon los la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos en cada punto de tiempo. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

10 Resultados

Los resultados individuales del ensayo de H-FABP en las tres poblaciones, expresados en unidades de DO, se muestran gráficamente en la figura 1 y se detallan en la Tabla 3. La concentración de H-FABP en plasma media fue de $0,221 \pm 0,134$ de DO en el grupo de Control, $1,079 \pm 0,838$ de DO en el grupo Ictus y de $2,340 \pm 0,763$ de DO en el grupo AMI. El coeficiente de variación encontrado para este ELISA fue del $5,8 \% \pm 3,8$. Usando la prueba de Kruskal-Wallis, las tres concentraciones se encontraron significativamente diferentes ($p < 0,001$) entre sí. El mejor valor de corte para discriminar entre los grupos Control e Ictus se estableció en $DO > 0,531$ según lo determinado por las curvas ROC para el nivel de H-FABP (datos no mostrados). Utilizando este valor de corte, las medidas de validez de H-FABP para el diagnóstico de ictus fueron como se indica a continuación: la sensibilidad fue del $68,2 \%$ con 15 de 22 pacientes con ictus por encima del punto de corte, la especificidad fue del 100% con los 22 sujetos de control por debajo del punto de corte, el valor predictivo positivo fue del 100% y el valor predictivo negativo fue del $75,9 \%$.

Tabla 3

| Grupo | | Control | AMI | Ictus |
|-------------|---------------|---------|----------|----------|
| H-FABP | media | 0,221 | 2,434 | 1,079 |
| | DE | 0,134 | 0,638 | 0,838 |
| | Significancia | | $<0,001$ | $<0,001$ |
| Troponina-I | media | 0,0 | 164,6 | 0,5 |
| | DE | 0,1 | 205,6 | 1,3 |
| | Significancia | | $<0,001$ | ns |
| CK-MB | media | 1,3 | 63,8 | 7,9 |
| | DE | 0,9 | 51,5 | 21,3 |
| | Significancia | | $<0,001$ | ns |

Para discriminar, a nivel biológico, entre pacientes de los grupos AMI e Ictus, la Troponina I y CK-MB se ensayaron adicionalmente en cada grupo con valores de corte establecidos en 2 ng/ml para la el ensayo de Troponina AxSYM y $3,8 \text{ ng/ml}$ para el ensayo de CK-MB AxSYM (Tabla 3). Como era de esperar, las concentraciones de estos marcadores de AMI fueron significativamente más altas ($p < 0,01$) en el grupo AMI en comparación tanto con el grupo de Control como de Ictus. No se encontró ninguna diferencia entre los dos últimos grupos, lo que confirma que la Troponina I y CK-MB no aumentan como resultado de una lesión cerebral y que los pacientes con ictus no sufrieron un AMI concomitante en el momento de su ictus. Tomadas en conjunto, las concentraciones de H-FABP, troponina I y CK-MB permitieron una discriminación correcta entre AMI (aumento de los tres marcadores) e ictus (aumento de H-FABP con troponina I y CK-MB normales) en los 20 pacientes con AMI y en 15 pacientes con ictus, con la excepción de un paciente con ictus que mostraba, junto con niveles elevados de H-FABP, niveles moderadamente elevados de troponina I y CK-MB en ausencia de modificaciones de EKG, todo lo cual es consistente con un daño cardíaco no AMI concomitante.

En el grupo Ictus, se encontraron siete resultados falsos negativos con niveles de H-FABP por debajo del valor de corte de $DO 0,531$ en cualquier punto de tiempo después del evento neurológico. De estos siete pacientes, dos tuvieron una recuperación rápida y completa de sus déficits neurológicos en 24 horas coherentes con un ataque isquémico transitorio (TIA), y dos tuvieron un ictus lacunar en las imágenes de RM, uno ubicada en el tallo cerebral. Si bien el TIA y el ictus lacunar pueden explicar los resultados de falsos negativos en la mayoría de los pacientes, no se encontró una explicación consistente para los tres pacientes con ictus restantes con niveles bajos de H-FABP.

Las determinaciones secuenciales del nivel de H-FABP después del ictus mostraron que 10 de 15 (67%) pacientes con ictus positivo a H-FABP tuvieron un aumento muy temprano de los niveles de H-FABP (<12 horas). Además, como se muestra en la figura 2, cuando se consideraron todos los pacientes con ictus, las concentraciones medias de H-FABP disminuyeron constantemente después del insulto, encontrándose el valor más alto antes de las 12 horas. Las diferencias entre la medición inicial y las mediciones de menos de 48 horas y posteriores fueron

significativas (ANOVA, $p < 0,05$). Cuando se compararon los niveles de H-FABP entre los diferentes subgrupos del grupo Ictus, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los niveles de H-FABP fueron similares para ictus isquémico ($0,955 \pm 0,668$, $N = 15$) frente a ictus hemorrágico ($1,346 \pm 1,139$, $N = 7$), y para ictus hemisféricos ($0,987 \pm 0,783$, $N = 18$) frente a ictus de tronco cerebral ($1,493 \pm 1,080$), pero el poder estadístico de los análisis estuvo limitado por el pequeño tamaño de las muestras que se compararon. Sin embargo, al comparar ictus establecidos frente a TIA, los primeros ($1,2002 \pm 0,892$) mostraron casi el doble de niveles de H-FABP que los últimos ($0,652 \pm 0,499$), aunque esta diferencia no alcanzó significancia (prueba U de Mann-Whitney, $p = 0,24$).

Finalmente, se ensayaron NSE y S100B en los grupos de Control e Ictus, y los resultados se compararon con el ensayo de H-FABP. Los valores de corte usando las pruebas ELISA de proteína SMART-NSE y SMART S100B para el diagnóstico de ictus fueron 10 ng/ml para NSE y 0,02 ng/ml para S100B. Los niveles de NSE y S100B aumentaron ligeramente en los grupos de Ictus (14,12 ng/ml y 0,010 ng/ml, respectivamente) en comparación con el grupo control (15,88 ng/ml y 0,004 ng/ml, respectivamente). Como se muestra en la Tabla 4, la especificidad, la sensibilidad, VPP y VPN para el diagnóstico de ictus se encontraron mucho más bajos para NSE y S100B que para H-FABP. Estas diferencias son relevantes, ya que los tres marcadores se han ensayado en las mismas muestras.

Tabla 4

| | H-FABP | NSE | S100B |
|---------------------|--------|------|-------|
| Sensibilidad | 68,2 | 55 | 15 |
| Especificidad | 100 | 36,4 | 95,5 |
| Predictivo positivo | 100 | 44 | 75 |
| Predictivo negativo | 75,9 | 47,1 | 55,3 |

EJEMPLO 3

20

Se han identificado tres nuevas proteínas en geles 2-DE preparados con muestras de LCR de pacientes fallecidos. Estas proteínas corresponden a puntos que se han mostrado previamente aumentados en muestras de LCR de pacientes fallecidos en relación con controles sanos. Sin embargo, los intentos previos para identificar estas proteínas usando la espectrometría de masas MALDI-TOF no tuvieron éxito. Los experimentos actuales se realizaron mediante μ LC-MS-MS usando un dispositivo de trampa de iones por ESI (DecaLCQ XP, ThermoFinnigan). Además, la creciente cantidad de datos en las bases de datos podría conducir a la identificación exitosa de puntos previamente no caracterizados.

25

(1) Subunidad reguladora de la proteína de unión a ARN (O14805)/proteína DJ-1 (Q99497):

30

La subunidad reguladora de la proteína de unión a ARN se ha descrito previamente en muestras de LCR de fallecidos (véase el Ejemplo 1 anterior). Aquí, se ha obtenido la misma identificación con un punto adyacente (figura 3). También se confirmaron las identificaciones anteriores. La figura 1 muestra ampliaciones de mapas 2-DE de LCR sano y LCR de fallecidos. Se cargaron 270 μ g de proteína en un gel de IPG (pH 3,5 - 10 NL, 18 cm). La segunda dimensión fue un gel de placa vertical (12 % de T). El gel se tiñó con un colorante fluorescente. Las flechas que apuntan hacia arriba indican los puntos correspondientes a la subunidad reguladora de unión a ARN, o a la proteína DJ-1.

35

Además, estos resultados indican que estos puntos podrían corresponder a otra proteína homóloga llamada DJ-1. La subunidad reguladora de la proteína de unión a ARN y las secuencias de DJ-1 se diferencian entre sí solo por un aminoácido. El único péptido detectado durante los experimentos actuales no contenía este residuo específico.

40

Las mutaciones del gen DJ-1 están asociadas con parkinsonismo de inicio temprano autosómico recesivo (Bonifati et al., Science, 2003). Diferentes resultados sugieren que la proteína DJ-1 podría estar involucrada en la respuesta al estrés oxidativo celular y patologías neurodegenerativas (Bonifati et al., Science, 2003; Wilson et al., PNAS, 2003).

45

(2) Peroxirredoxina 5 (P30044):

El punto 2-DE correspondiente a Peroxirredoxina 5 se muestra en la figura 4. Se trata de una ampliación de mapas 2-DE de LCR sano y LCR de fallecidos preparados de la misma manera que en la figura 3. Se muestra el punto correspondiente a peroxirredoxina 5 por las flechas de la derecha.

50

La peroxirredoxina 5 es una enzima antioxidante que podría tener un efecto neuroprotector (Plaisant et al., Free Radic. Biol. Med., 2003). También se describió un patrón de expresión aberrante de proteínas pertenecientes a la

familia de Peroxirredoxina en cerebros de pacientes con diferentes enfermedades neurodegenerativas (Krapfenbauer et al., Electrophoresis, 2002; Krapfenbauer et al., Brain Res., 2003).

(3) Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A o Ciclofilina A (P05092)

5

Se identificaron dos puntos como Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (figura 5). Se trata de una ampliación de mapas 2-DE de LCR sano y LCR de fallecidos preparados de la misma manera que en la figura 4. El punto básica correspondiente a Ciclofilina A está justo adyacente al punto correspondiente a la Peroxirredoxina 5.

- 10 La Ciclofilina A se describió como un factor protector contra el estrés oxidativo celular (Doyle et al., Biochem J., 1999). Se une a las enzimas de Peroxirredoxina y podría verse implicada en la actividad de peroxidasa (Lee et al., J.Biol. Chem., 2001). Además, una publicación sugiere que la ciclofilina A es secretada por células de músculo liso vascular (VSMC) en respuesta al estrés oxidativo y estimula el crecimiento de VSMC (Jin et al., Circ. Res., 2000). Estos resultados sugieren la implicación de ciclofilina A en procesos de enfermedades vasculares. También se describió un vínculo con una forma familiar de esclerosis lateral amiotrófica (una patología neurodegenerativa) asociada con una mutación en la enzima antioxidante Cu/Zn Superóxido Dismutasa-1 (Lee et al., PNAS, 1999). La ciclofilina A parece tener un efecto protector contra la apoptosis inducida por SOD mutante.

EJEMPLO 4

20

Introducción

- Se realizó un estudio de pacientes con ictus y los resultados se muestran en las figuras 6 a 15. Se obtuvo una señal de intensidad de ELISA para el homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina (UFD1), la subunidad reguladora de unión a ARN (RNA-BP) y el nucleótido difosfato cinasa A (NDK A) en muestras de plasma de los pacientes y de pacientes de control negativo. Se tomaron muestras de plasma de pacientes entre 0-24 horas y/o después de 72 horas de la llegada al hospital de emergencia, y se compararon por edad/sexo con muestras de pacientes de control.

30 Protocolo

- Se realizó un ELISA usando placas de color negro recubiertas por NeutrAvidin™ de 96 pocillos Reacti-Bind™ (Pierce, Rockford, IL). Las placas se aclararon en primer lugar en una solución salina de tampón borato a pH 8,4 (BBS) (H₃BO₃ 100 mM, Na₂B₄O₇ 25 mM (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), NaCl 75 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)) en un lavador NOVAPATH™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Después, se añadieron 50 µl de anticuerpo conjugado con biotina (2 µg/ml) preparado en el tampón de dilución A a pH 7 (DB, alcohol polivinílico, hidrolizado al 80 %, Peso Mol. 9000-10.000 (Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos), MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico) (Sigma), NaCl, MgCl₂ (Sigma), ZnCl₂ (Aldrich), pH 6,90, solución al 30 % de BSA, grado de fabricación (Serological Proteins Inc., Kankakee, IL)) y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después, las placas se lavaron 3 veces en BBS en el lavador de placas. Después, se añadieron 50 µl de antígeno y se incubaron durante una hora a 37 °C. Las proteínas recombinantes se diluyeron a 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ng/ml en el tampón de dilución A para establecer una curva de calibración. Las muestras de plasma se diluyeron a la dilución apropiada en el tampón de dilución A. Después de la etapa de lavado, se añadieron 50 µl de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina a la dilución apropiada en el tampón de dilución A y se incubaron durante una hora a 37 °C. La placa de 96 pocillos se lavó después 3 veces con BBS en el lavador de placas y se añadieron 50 µl de sustrato fluorescente Attophos® AP de fluorescencia (Promega, Madison, WI). Las placas se leyeron inmediatamente en un lector de placas de microtitulación fluorométrico GEMINI-XS, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, Estados Unidos) en unidades de fluorescencia relativa (RFU) ($\lambda_{excitación} = 444 \text{ nm}$ y $\lambda_{emisión} = 555 \text{ nm}$).
- 50 Se leen las placas en fluorescencia usando un lector de microplacas fluorimétrico SpectraMax GEMINI-XS (Molecular Devices) ($\lambda_{excitación} = 444 \text{ nm}$ y $\lambda_{emisión} = 555 \text{ nm}$). Los resultados se expresan en RFU y se pueden obtener en modo de punto final (solo una lectura) o en modo cinético en 10 minutos. En el modo cinético, para cada pocillo se usaron 6 flashes (por pocillo) que se integran en un promedio y cada pocillo se lee 6 veces usando un intervalo mínimo de tiempo entre cada lectura. Esto termina siendo 2 minutos entre lecturas. Se determinó una pendiente y esto es lo que se usó para estas valoraciones. El mejor valor de corte para discriminar entre los grupos de Control e Ictus (isquémico más hemorrágico o isquémico frente a hemorrágico) se determinó mediante las curvas ROC utilizando el software GraphPad Prism 4.

Conclusión

Se puede observar claramente a partir de las figuras 7, 10 y 13 que UFD1, RNA-BP y NDK A se sobreexpresan, respectivamente, en pacientes con ictus en comparación con pacientes de control. Se realizó el análisis estadístico para cada uno de los biomarcadores y se trazaron las curvas ROC (software GraphPad Prism 4) que indicaron la sensibilidad de la prueba en función de una especificidad 1 (figuras 8, 11 y 14 para UFD1, RNA-BP y NDK A, respectivamente). Los mejores valores de corte para distinguir entre los pacientes con ictus y de control se dedujeron a partir de estas curvas ROC. Se obtuvo un 94,4 %, 94,4 % y un 100 % de sensibilidad para UFD1, RNA-BP y NDK A respectivamente y un 77,8 %, 72,2 % y un 83,3 % de especificidad para UFD1, RNA-BP y NDK A respectivamente. Para cada marcador, se realizó una prueba no paramétrica de Mann Whitney para comparar los grupos de ictus y de control. Para los 3 biomarcadores, se obtuvieron valores de p muy bajos (<0,0001 para UFD1 y NDK A y p = 0,0003 para RNA-BP) lo que significa que las diferencias entre el ictus y los controles son muy significativas.

En la figura 6, también podemos observar que RNA-BP y NDK A pueden detectar un ictus solo 30 minutos después del inicio de los síntomas, lo que significa que estos son marcadores muy tempranos de ictus. Este resultado se confirma por la disminución de la señal observada entre la llegada al hospital y después de 72 horas. Los pacientes 202 y 239 fueron evaluados a la llegada (entre 0 y 24 horas) y después de 72 horas y se pudo observar que para todos los marcadores, la señal disminuye significativamente.

Estos resultados demuestran que el homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina (UFD1), la subunidad reguladora de unión a ARN (RNA-BP) y el nucleótido difosfato cinasa A (NDK A) son marcadores útiles para el diagnóstico precoz de ictus, en solitario, en combinación, o junto con otros biomarcadores.

EJEMPLO 5

Este ejemplo se refiere a modificaciones postraduccionales que pueden inducirse en trastornos neurodegenerativos. La población de estudio y la manipulación de muestras, y el 2-DE de LCR fueron como se describe en el Ejemplo 1.

Ensayos de inmunotransferencia 2-DE

Las proteínas separadas por 2-DE se electrotransfirieron sobre membranas de PVDF esencialmente como se describe por Towbin *et al.* [22]. Las membranas se tiñeron con negro de amido, se destiñeron con agua y se secaron. Las proteínas de interés se detectaron como se ha descrito previamente [29] utilizando anticuerpos específicos y reactivos de detección de transferencia Western ECL™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se usó el siguiente anticuerpo: anticuerpo policlonal de conejo anti-humano de prostaglandina D sintasa (de tipo lipocalina) (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) diluido 1/250.

La figura 16 (A) muestra una comparación de intensidades puntuales de PGHD en geles 2-DE preparados con LCR de pacientes fallecidos o de control. Cuarenta y cinco µg de proteína se cargaron en una tira de IPG (pH 3,5-10 NL, 18 cm). La segunda dimensión se realizó en un gel de placa de gradiente vertical (9-16 % de T), teñido con plata amoniacal. La apolipoproteína AI etiquetada en cursiva mostró niveles similares en las dos muestras. Las localizaciones puntuales de PGHD en gel de control se dedujeron a partir de identificaciones anteriores [31]. En el gel de pacientes fallecidos, se administran locaciones puntuales de PGHD sustitutas. La figura 16 (B) muestra la inmunodetección de PGHD en geles 2-DE preparados con LCR de pacientes fallecidos y de control. Se realizó 2-DE como se indica en A. La inmunodetección se realizó como se ha descrito previamente [29] usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-humano de prostaglandina D sintasa (de tipo lipocalina) y reactivos de detección por transferencia western ECL™.

Resultados

La Prostaglandina D sintasa (PGHD) es una proteína básica (pI = 8,37) que se sabe que se modifica postraduccionalmente por N-glicosilación (Hoffmann A. *et al.*, J. Neurochem. 1994, 63, 2185-2196). En geles 2-D de LCR de pacientes sanos vivos se detectaron cinco puntos. En geles 2-D preparados con LCR post-mortem, los tres puntos ácidos disminuyen fuertemente con un aumento concomitante de los dos puntos básicos (figura 16A).

Para confirmar que estos puntos diferentes corresponden a PGHD, se realizaron ensayos de inmunotransferencia usando un anticuerpo específico (figura 16B). Los resultados obtenidos confirmaron que los puntos ácidos de PGHD no estaban presentes en el LCR de los pacientes fallecidos, mientras que los puntos básicos aún estaban presentes. Además, la medición del volumen total de PGHD en los dos geles usando el software Melanie 3 indicó que el nivel

de PGHD es similar en las dos muestras. Por lo tanto, esto sugiere que hubo una desglucosilación de PGHD en el LCR de los pacientes fallecidos, pero la cantidad total de PGHD se mantuvo constante.

Datos de la bibliografía:

5 Se encontró que la PGHD descendía en el LCR de pacientes que padecían EA (Puchades M. et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 2003, 118, 140-146). Sin embargo, el estudio se realizó usando geles 2-DE y solo se analizaron los puntos ácidos. Como muestran estos resultados en LCR de pacientes fallecidos, es posible que la PGHD se desglucosilara en las muestras analizadas, dando como resultado la desaparición de puntos ácidos pero no una
10 disminución en el nivel total de proteína.

Usando el enfoque isoeléctrico capilar, Hiraoka y col. han identificado cambios en la microheterogeneidad de carga de la PGHD de LCR asociada con diversos trastornos neurológicos (Hiraoka A. et al., Electrophoresis 2001, 22, 3433-3437). Se encontró que la relación de formas básicas/formas ácidas aumenta en la EA, en la EP con atrofia
15 cerebral patológica, y en esclerosis múltiple. Se especuló que estas modificaciones postraduccionales estaban relacionadas con cambios en el patrón de N-glucosilación.

Patrón de modificaciones postraduccionales de PGHD (PTM) en LCR de un paciente con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD):

20 Se comparó el patrón de PTM de PGHD en muestras de LCR recogidas de un paciente con CJD y un control sano. Las proteínas se separaron por 2-DE, se electrotransferieron sobre una membrana de PVDF y se detectó PGHD usando un anticuerpo específico, como se ha descrito previamente. Las muestras de LCR se recogieron por punción lumbar. El paciente control tenía un tratamiento neurológico para afecciones benignas no relacionadas con el daño
25 cerebral. Las muestras de LCR se centrifugaron inmediatamente después de la recolección, se dividieron en alícuotas, se congelaron a -20°C y se almacenaron hasta el análisis.

Los resultados se muestran en la figura 17, que es una comparación de intensidades puntuales de prostaglandina D2 sintasa en geles mini-2-DE preparados con LCR de un paciente que padece la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
30 o con un LCR de control de un paciente sano. Cuarenta y cinco µg de proteína se cargaron en un gel de IPG (pH 3-10 NL, 7 cm). La segunda dimensión fue un gel de placa de gradiente vertical (12 % de T). La inmunodetección se realizó usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-humano de PGHD (de tipo lipocalina) (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) y reactivos de detección de transferencia Western ECL™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

35 Los resultados mostraron que el patrón PTM de PGHD en el LCR del paciente con CJD es claramente diferente del control, con una fuerte disminución de los 4 puntos más ácidos (figura 17). El patrón del paciente con CJD es similar al observado en el LCR post-mortem. Estos datos apoyan el interés de los cambios en el patrón PTM de PGHD como marcador de trastornos neurológicos.

40 EJEMPLO 6

Este Ejemplo proporciona datos adicionales que muestran niveles en plasma de UFDP1 en pacientes con ictus y de control. La figura 19 muestra los niveles de UFDP1 en LCR de un paciente de control y un paciente fallecido. Se obtuvieron datos adicionales de dos cohortes de pacientes y controles, los menores de Ginebra, y un panel más
45 completo de Estados Unidos. La metodología para este Ejemplo y los siguientes Ejemplos 7 y 8 es la misma, salvo que los anticuerpos que se usan tienen especificidades diferentes para la proteína en cuestión. El método en cada uno de los estudios es similar al dado en el Ejemplo 4:

50 Se realizó un ELISA usando placas de color negro recubiertas por NeutrAvidin™ de 96 pocillos Reacti-Bind™ (Pierce, Rockford, IL). Las placas se aclararon en primer lugar en una solución salina de tampón borato a pH 8,4 (BBS) (H3BO3 100 mM, Na2B4O7 25 mM (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), NaCl 75 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)) en un lavador NOVAPATH™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Después, se añadieron 50 µl de conjugado de anticuerpo-biotina específico del biomarcador relevante (2 µg/ml) preparado en el tampón de dilución A a pH 7 (DB, alcohol polivinílico, hidrolizado al 80 %, Peso Mol. 9000-
55 10.000 (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico) (Sigma), NaCl, MgCl2 (Sigma), ZnCl2 (Aldrich), pH 6,90, solución al 30 % de BSA, grado de fabricación (Serological Proteins Inc., Kankakee, IL), y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después, las placas se lavaron 3 veces en BBS en el lavador de placas. Después, se añadieron 50 µl de antígeno o plasma y se incubaron durante una hora a 37 °C. Los antígenos de proteína recombinantes se diluyeron a 100, 50, 25, 12,5, 6,25,

- 3,125, 1,56 ng/ml en el tampón de dilución A para establecer una curva de calibración. Las muestras de plasma se diluyeron a la dilución apropiada en el tampón de dilución A. Después de una etapa de lavado adicional, se añadieron 50 µl de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina específicos del biomarcador relevante a la dilución apropiada en el tampón de dilución A y se incubaron durante una hora a 37 °C. La placa de 96 pocillos se lavó después 3 veces con BBS en el lavador de placas y se añadieron 50 µl de sustrato fluorescente Attophos® AP de fluorescencia (Promega, Madison, WI). Las placas se leyeron inmediatamente en un lector de placas de microtitulación fluorométrico SpectraMax GEMINI-XS, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, Estados Unidos).
- 10 Se leen las placas en fluorescencia usando un lector de microplacas fluorimétrico SpectraMax GEMINI-XS (Molecular Devices) ($\lambda_{\text{excitación}} = 444 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 555 \text{ nm}$). Los resultados se expresan en RFU y se pueden obtener en modo de punto final (solo una lectura) o en modo cinético en 10 minutos. En el modo cinético, para cada pocillo se usaron 6 flashes (por pocillo) que se integran en un promedio y cada pocillo se lee 6 veces usando un intervalo mínimo de tiempo entre cada lectura. Esto termina siendo 2 minutos entre lecturas. Se determinó una pendiente y
- 15 esto es lo que se usó para estas valoraciones. El mejor valor de corte para discriminar entre los grupos de Control e Ictus se determinó mediante las curvas ROC utilizando el software GraphPad Prism 4.

Los resultados se muestran en la figura 20.

20 EJEMPLO 7

Éste corresponde al Ejemplo 6, excepto que el polipéptido es RNA-BP. La figura 21 muestra los niveles de RNA-BP en el LCR de un paciente de control y un paciente fallecido. La figura 22 muestra la concentración en plasma de RNA-BP mediante ELISA para tres estudios, cada uno de los cuales comprende pacientes con ictus y controles.

25

EJEMPLO 8

Éste corresponde al Ejemplo 6, excepto que el polipéptido es NDKA. La figura 23 muestra los niveles de NDKA en el LCR de un paciente de control y un paciente fallecido. La figura 24 muestra la concentración plasmática de NDKA mediante ELISA para las cohortes de pacientes con ictus y controles de Ginebra y Estados Unidos como en el

30

EJEMPLO 9

Además de la discriminación simple entre pacientes con ictus y de control, los datos de cada uno de los Ejemplos 6, 7 y 8 pueden analizarse en relación con el tiempo entre ictus y recogida de muestras, o como alternativa, en relación con el tipo de ictus: isquémico, hemorrágico o ataque isquémico transitorio (TIA). Estos análisis separados se muestran en la figura 25a y la figura 25b y demuestran la utilidad de los marcadores de LCR de fallecidos en el diagnóstico del ictus. Esto es particularmente relevante para la práctica clínica, ya que es esencial para diagnosticar

40 el ictus dentro a tres horas del evento para permitir la administración de medicamentos anticoagulantes, tal como TPA. También es esencial que las pruebas puedan diferenciar un ictus hemorrágico del ataque isquémico, ya que la TPA solo es adecuada para el tratamiento de la isquemia y puede tener efectos catastróficos en pacientes con ictus hemorrágico.

45 EJEMPLO 10

Mientras que cada uno de los marcadores de LCR de fallecidos tiene un buen rendimiento individual para el diagnóstico del ictus, es probable que un producto comercial requiera la medición de los niveles de varias proteínas. Este enfoque de "panel" se puede lograr de dos maneras. En el enfoque más sencillo, los anticuerpos para cada

50 marcador por separado se agrupan y se usan para recubrir pocillos de microtitulación. La intensidad de la señal será la suma de aquella para cada marcador independiente, aunque en este caso, será imposible determinar los niveles individuales de cada uno de los marcadores. Esto puede crear desafíos al establecer valores de corte significativos, sin embargo, esto presenta el producto comercial más respetuoso con el usuario.

La figura 26 resume los marcadores que se usan en este Ejemplo. Los resultados experimentales se muestran en la figura 27, en la que los anticuerpos contra las proteínas de LCR de fallecidos UFD1, RNA-BP, NDKA y H-FABP se usaron a las mismas concentraciones que en el Ejemplo 4. Sin embargo, estas soluciones de anticuerpos se mezclaron en volúmenes iguales, reduciendo la concentración de cada especie de anticuerpo a un cuarto del nivel original en los ejemplos de analito individuales descritos anteriormente. El protocolo utilizado es como se indica a

continuación:

5 Para superar el problema del algoritmo del panel, se ensayaron los cuatro anticuerpos directamente en mezcla en cada pocillo. El protocolo es exactamente el mismo que se ha descrito previamente para los anticuerpos separados (anteriormente), salvo que cada uno de los conjugados de anticuerpo-biotina específicos del biomarcador se usaron a 12,5 μ l por pocillo durante la primera etapa de revestimiento del anticuerpo. La curva estándar se construyó de manera similar usando 12,5 μ l por pocillo de cada uno de los cuatro antígenos proteínicos recombinantes UFDP1, RNA-BP, NDKA y H-FABP, cada uno preparado por separado a concentraciones iniciales de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 ng/ml en el tampón de dilución A para establecer una curva de calibración en la misma placa. Se usaron muestras de plasma a la misma dilución y volumen (50 μ l por pocillo) que para los ensayos de biomarcadores individuales. La detección de antígenos capturados se realizó usando los mismos conjugados de anticuerpo-fosfatasa alcalina específicos del biomarcador que los ensayos individuales, añadiéndose volúmenes iguales (12,5 μ l) de los cuatro conjugados de anticuerpo-fosfatasa alcalina específicos del biomarcador a cada pocillo para la curva estándar y las muestras de plasma. La medición de la fluorescencia se realizó como se describe para los ensayos de biomarcadores individuales como se ha descrito en el ejemplo anterior.

20 Se ensayaron muestras de plasma de diez ictus y diez controles (no emparejadas por edad/sexo) diluidas 2 veces (figura 27). Este experimento condujo a un 100 % de sensibilidad y un 80 % de especificidad. Las dos muestras de falsos positivos corresponden a 368 pacientes de control y 450 que muestran cáncer de próstata y probable traumatismo craneal.

25 En este ejemplo específico, la señal de fluorescencia obtenida corresponde a la suma de la señal generada por cada sándwich de anticuerpo específico de biomarcador y es imposible determinar la contribución relativa de cada biomarcador individual con respecto total cuando se usan anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina para el lado de detección del ensayo. También es un aspecto de la invención que cada anticuerpo específico de biomarcador puede marcarse con un fluoróforo diferente con una diferencia suficiente entre sus longitudes de onda de excitación y emisión para que el nivel de cada anticuerpo pueda determinarse sin interferencia. En este caso, es posible cuantificar de forma precisa los niveles de hasta cuatro biomarcadores diferentes en una muestra en un solo ensayo, 30 proporcionando beneficios en la reducción del requisito de la muestra y un mayor rendimiento.

EJEMPLO 11

35 En algunas circunstancias, puede no ser deseable medir los niveles de analitos múltiples en un solo pocillo. Por ejemplo, los niveles absolutos de proteínas individuales, o la relación entre los niveles de proteínas múltiples, pueden ser necesarios para hacer un diagnóstico específico. En esta situación, puede ser deseable medir los niveles de cada analito en un ensayo separado. A continuación, se usa un algoritmo predictivo para interpretar estos conjuntos de datos multiparamétricos a fin de proporcionar un diagnóstico único para cada paciente. En este Ejemplo, se ha usado un algoritmo estadístico para predecir el rendimiento teórico de diferentes paneles de biomarcadores de analito múltiple.

45 Los conjuntos de datos de niveles de biomarcadores individuales generados en los diversos ejemplos anteriores se analizaron usando un algoritmo patentado para determinar las tasas de verdaderos positivos y verdaderos negativos para cada combinación de las proteínas de LCR de fallecidos UFDP1, RNA-BP, NDKA y H-FABP para el diagnóstico de ictus. Para el análisis, se dividió un conjunto de muestras (18 controles y 18 ictus para UFD1, RNA-BP, NDK A y H-FABP) en 2 poblaciones aleatorias.

50 El 80 % de las muestras totales para el entrenamiento de los umbrales se realizó mediante la técnica bayesiana simple, y el 20 % restante de las muestras totales se usó para evaluar los umbrales (sensibilidad y especificidad) para cada marcador, o combinación de marcadores hechos 1000 veces.

55 Cuando el algoritmo se aplicó a proteínas individuales, fue posible comparar valores de sensibilidades y especificidades con los observados. La sensibilidad y especificidad para estos conjuntos de datos (cifras entre paréntesis) se calcularon basándose en el corte óptimo determinado a partir de la curva ROC como se describe en los ejemplos anteriores. En los siguientes datos, el primer valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar (por ejemplo, 0,93 \pm 0,15). El segundo valor entre paréntesis para los datos de "1 proteína" corresponde a la sensibilidad (SE) y la especificidad (SP) obtenidas sin usar el algoritmo, pero usando una curva ROC simple (GraphPad Prism). Los valores SE y SP están indicados solo para comparar los resultados con y sin el algoritmo.

El resultado de este análisis de algoritmo fue como se indica a continuación:

1 proteína

Tasa de verdaderos positivos de UFD1 en el conjunto de entrenamiento: 0,93 (0,15) (SE al 94 %)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1 en el conjunto de entrenamiento: 0,74 (0,24) (SP al 78 %)
 Tasa de verdaderos positivos de RNA-BP en el conjunto de entrenamiento: 0,85 (0,21) (SE al 94 %)
 Tasa de verdaderos negativos de RNA-BP en el conjunto de entrenamiento: 0,73 (0,23) (SP al 72 %)
 Tasa de verdaderos positivos de H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,47 (0,29) (SE al 39 %)
 Tasa de verdaderos negativos de H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,80 (0,23) (SP al 100 %)
 Tasa de verdaderos positivos de NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,79 (0,24) (SE al 100 %)
 Tasa de verdaderos negativos de NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,89 (0,16) (SP al 83 %)

5 2 proteínas

Tasa de verdaderos positivos de UFD1/RNA-BP en el conjunto de entrenamiento: 0,90 (0,17)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/RNA-BP en el conjunto de entrenamiento: 0,69 (0,25)
 Tasa de verdaderos positivos de UFD1/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,82 (0,22)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,83 (0,20)
 Tasa de verdaderos positivos de UFD1/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,92 (0,16)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,79 (0,21)
 Tasa de verdaderos positivos de RNA-BP/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,81 (0,24)
 Tasa de verdaderos negativos de RNA-BP/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,73 (0,24)
 Tasa de verdaderos positivos de RNA-BP/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,91 (0,16)
 Tasa de verdaderos negativos de RNA-BP/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,83 (0,21)
 Tasa de verdaderos positivos de H-FABP/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,77 (0,27)
 Tasa de verdaderos negativos de H-FABP/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,84 (0,20)

20 3 proteínas

Tasa de verdaderos positivos de RNA-BP/NDK A/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,96 (0,11)
 Tasa de verdaderos negativos de RNA-BP/NDK A/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,83 (0,20)
 Tasa de verdaderos positivos de UFD1/NDK A/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,92 (0,17)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/NDK A/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,83 (0,21)
 Tasa de verdaderos positivos de UFD1/RNA-BP/NDKA en el conjunto de entrenamiento: 0,95 (0,14)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/RNA-BP/NDKA en el conjunto de entrenamiento: 0,82 (0,20)
 Tasa de verdaderos positivos de UFD1/RNA-BP/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,93 (0,15)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/RNA-BP/H-FABP en el conjunto de entrenamiento: 0,75 (0,23)

Las 4 proteínas

Tasa de verdaderos positivos de UFD1/RNA-BP/H-FABP/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,93 (0,13)
 Tasa de verdaderos negativos de UFD1/RNA-BP/H-FABP/NDK A en el conjunto de entrenamiento: 0,73 (0,23)

La figura 28 es una representación gráfica de combinaciones de dos de los cuatro biomarcadores usados en este Ejemplo. Muestra los puntos de corte (líneas horizontales y verticales) que se han determinado para el diagnóstico.

EJEMPLO 12

Se realizaron estudios a gran escala adicionales en Ginebra y Estados Unidos sobre los marcadores de LCR post mortem UFD1, RNA-BP y NDK A. El ensayo ELISA se realizó en muestras como se ha descrito en los Ejemplos anteriores (tanto para los experimentos de Ginebra, así como los experimentos de Estados Unidos). Los resultados se muestran en las figuras 29-38.

Bibliografía

[1] Vaagenes P, Urdal P, Melvoll R, Valnes K: Enzyme level changes in the cerebrospinal fluid of patients with acute stroke. Arch Neurol 1986;43:357-362.

- [2] Lampl Y, Paniri Y, Eshel Y, Sarova-Pinhas I: Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase levels in early stroke and transient ischemic attacks. *Stroke* 1990;21:854-857.
- [3] Matias-Guiu J, Martinez-Vazquez J, Ruibal A, Colomer R, Boada M, Codina A: Myelin basic protein and creatine kinase BB isoenzyme as CSF markers of intracranial tumors and stroke. *Acta Neurol Scand* 1986;73:461-465.
- 5 [4] Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pahlman S: S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987;18:911-918.
- [5] Cunningham RT, Young IS, Winder J, O'Kane MJ, McKinstry S, Johnston CF, Dolan OM, Hawkins SA, Buchanan KD: Serum neurone specific enolase (NSE) levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest* 1991;21:497-500.
- 10 [6] Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ: Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 2000;31:2670-2677.
- [7] Bitsch A, Horn C, Kemmling Y, Seipelt M, Hellenbrand U, Stiefel M, Ciesielczyk B, Cepek L, Bahn E, Ratzka P, Prange H, Otto M: Serum tau protein level as a marker of axonal damage in acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2002;47:45-51.
- 15 [8] Watson MAScott MG: Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995;41:343-360.
- [9] Hochstrasser DF, Frutiger S, Paquet N, Bairoch A, Ravier F, Pasquali C, Sanchez JC, Tissot JD, Bjellqvist B, Vargas R, et al.: Human liver protein map: a reference database established by microsequencing and gel comparison. *Electrophoresis* 1992; 13:992-1001.
- [10] Sanchez J-C, Chiappe D, Converset V, Hoogland C, Binz P-A, Paesano S, Appel RD, Wang S, Sennitt M, Nolan A, Cawthorne MA, Hochstrasser DF: The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics* 2001;1:136-163.
- 25 [11] Hochstrasser DF, Merrill CR: 'Catalysts' for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining. *Appl Theor Electrophor* 1988;1:35-40.
- [12] Appel RD, Palagi PM, Walther D, Vargas JR, Sanchez JC, Ravier F, Pasquali C, Hochstrasser DF: Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. *Electrophoresis* 1997;18:2724-2734.
- 30 [13] Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, Hochstrasser DF, Sanchez JC: A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 2003;3:1495-1499.

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico de un trastorno relacionado con el daño cerebral seleccionado de traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, 5 ataque isquémico transitorio y demencia vascular o la posibilidad de los mismos, en un sujeto que se sospecha que padece el mismo, o de pronóstico o seguimiento terapéutico de dicho trastorno relacionado con el daño cerebral en un sujeto, que comprende detectar H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de la subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina y nucleósido difosfato cinasa A, o variantes o mutantes respectivas del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el 10 mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, en una muestra de fluido corporal tomada del sujeto, en el que dicha H-FABP y al menos un polipéptido adicional o dicha variante o mutante, están presentes en el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno relacionado con el daño cerebral en una mayor cantidad en comparación con el fluido corporal de sujetos afectados por un trastorno no relacionado con el daño cerebral, por lo que una mayor cantidad de dicha H-FABP y al menos un polipéptido adicional o dicha variante 15 o mutante, en la muestra de fluido corporal es indicativa de dicho trastorno relacionado con daño cerebral.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los anticuerpos contra dicha H-FABP y al menos un polipéptido adicional se usan en la detección.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fluido corporal es líquido cefalorraquídeo, plasma, suero o sangre.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende detectar al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento 25 L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A), o una variante o mutante del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el trastorno relacionado 30 con el daño cerebral es ictus y los polipéptidos adicionales comprenden al menos dos polipéptidos seleccionados del homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, subunidad reguladora de unión a ARN y nucleósido difosfato cinasa A.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dos o más anticuerpos contra el homólogo de 35 la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, subunidad reguladora de unión a ARN, nucleósido difosfato cinasa A y H-FABP se usan en un único pocillo de una placa de microtitulación ELISA, y preferiblemente se usan anticuerpos contra los cuatro marcadores en un único pocillo.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 u 6, en el que dos o más polipéptidos seleccionados de 40 la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina, la subunidad reguladora de unión a ARN, el nucleósido difosfato cinasa A y H-FABP se ensayan por separado, y se usa un algoritmo predictivo para el diagnóstico.
8. Uso de H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de la subunidad reguladora de unión 45 a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina y nucleósido difosfato cinasa A, o variantes o mutantes respectivos del mismo, que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, y opcionalmente al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A), o una variante o mutante del mismo que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que 50 tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, para aplicaciones de diagnóstico o pronóstico relacionadas con trastornos relacionados con el daño cerebral seleccionados de traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio y demencia vascular.
- 55 9. Uso para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico, en relación con trastornos relacionados con el daño cerebral seleccionados de traumatismo craneal, ictus isquémico, ictus hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, ataque isquémico transitorio y demencia vascular, de anticuerpos contra H-FABP y al menos un polipéptido adicional seleccionado de subunidad reguladora de unión a ARN, homólogo de la proteína 1 de degradación por fusión de ubiquitina y nucleósido difosfato cinasa A, o variante o mutantes respectivas

del mismo que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas, y opcionalmente al menos un polipéptido adicional seleccionado de PGP 9.5, GFAP, Prostaglandina D sintasa, Neuromodulina, Neurofilamento L, Calcifosina, Glutación S transferasa P, Catepsina D, proteína DJ-1, Peroxirredoxina 5 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (Ciclofilina A), o una variante o mutante del mismo que tiene al menos un 90 % de homología con el mismo y que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales e inmunológicas.

10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se usa un dispositivo de ensayo que comprende un sustrato sólido que tiene una ubicación que contiene anticuerpos contra dicha H-FABP y dicho al menos un polipéptido adicional, o dichas variantes o mutantes del mismo.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el dispositivo de ensayo tiene una ubicación direccionable única para cada anticuerpo, para permitir de este modo una lectura de ensayo para cada polipéptido individual o para cualquier combinación de polipéptidos.

15

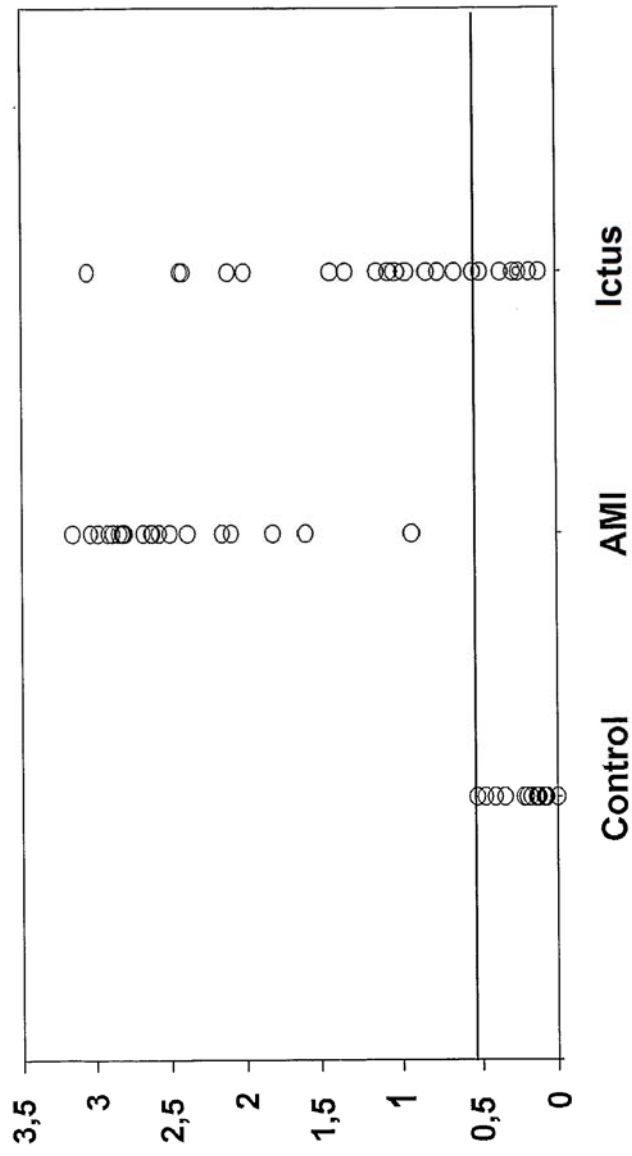


Figura 1

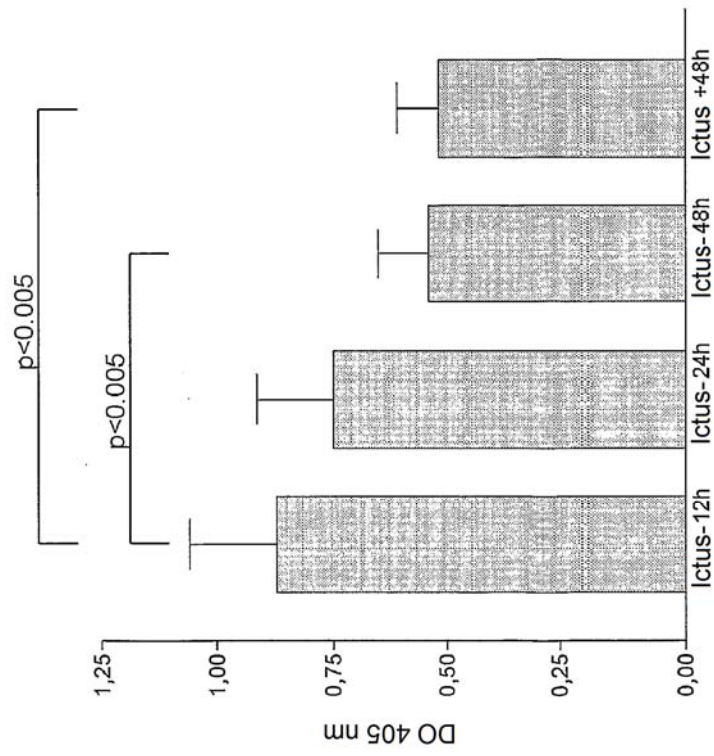


Figura 2

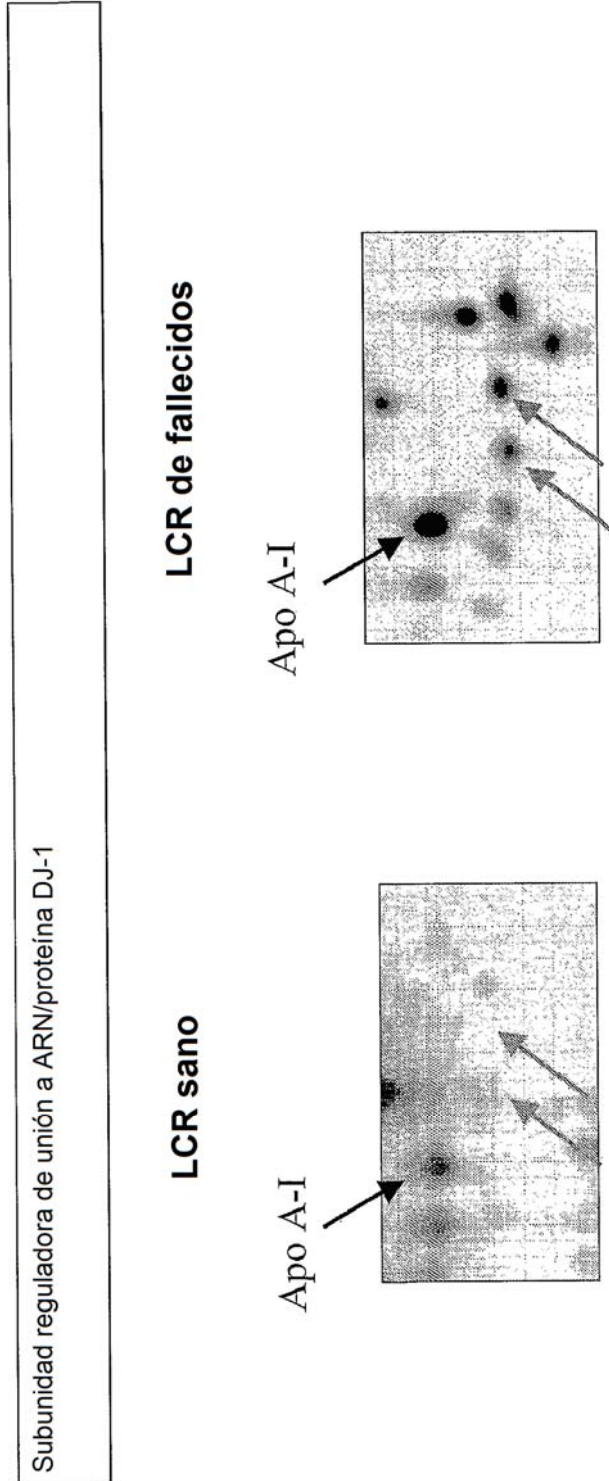
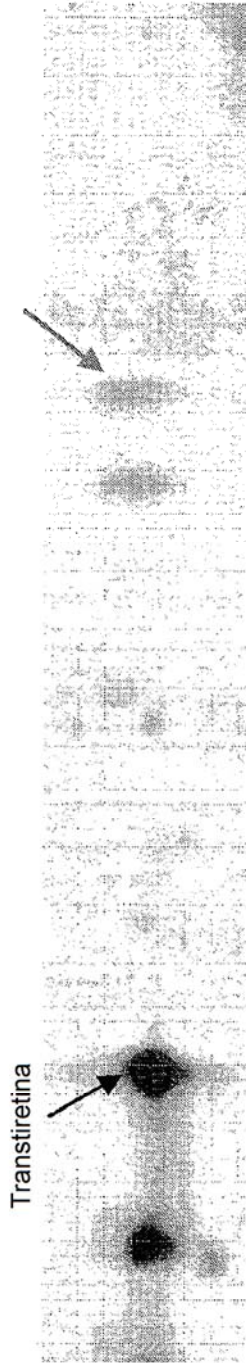


Figura 3

Peroxirredoxina 5

LCR sano



LCR de fallecidos

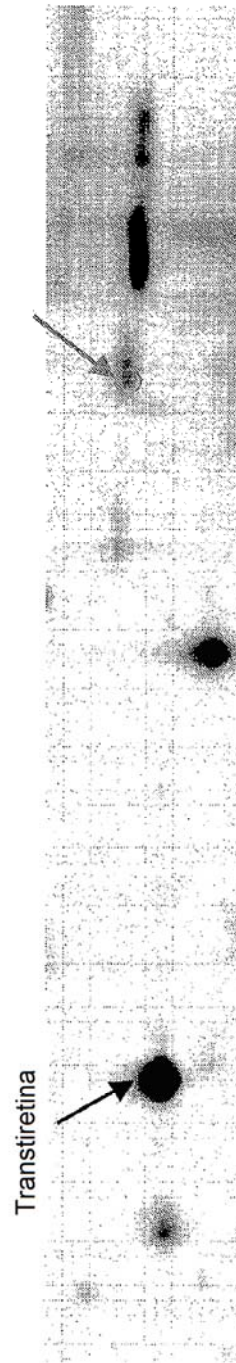


Figura 4

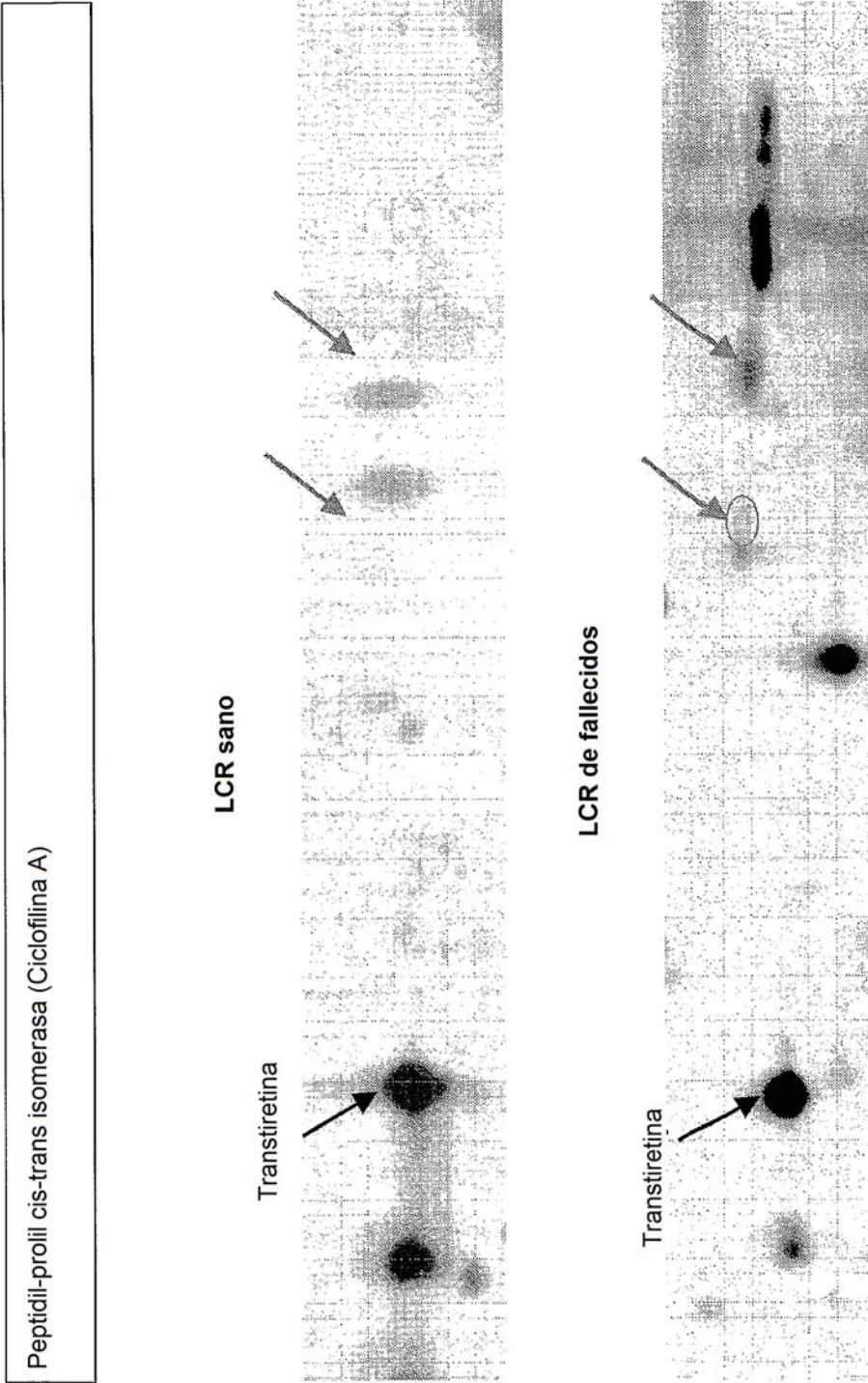


Figura 5

Fig. 6: Señal de intensidad de ELISA obtenida para UFD1, RNA-BP y NDK A pacientes con ictus emparejados por edad/sexo con pacientes de

| PACIENTES DE ICTUS (entre 0-24 h de la llegada al hospital de emergencia) | | | | | PACIENTES DE CONTROL NEGATIVO | | | | | | | | |
|---|-------------|------|-------------------|--|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|------|-------------------|------------------|--------------------|----------------------------|
| Número de paciente | Diagnóstico | Sexo | Año de nacimiento | tiempo de inicio de los síntomas de los síntomas (min) | UFD1 (señal RFU) CO=9047 | RNA-BP (señal RFU) CO=7441 | NDK A (señal RFU) CO=12500 | Número de paciente | Sexo | Año de nacimiento | UFD1 (señal RFU) | RNA-BP (señal RFU) | NDK A (señal RFU) CO=12500 |
| 186 | IC | M | 1931 | 30 min | 7127 | 10844 | 13639 | 368 | M | 1931 | 10365 | 12267 | 75.072 |
| 253 | Irr | F | 1975 | 45 min | 39636 | 14367 | 19907 | 401 | F | 1972 | 1306 | 1209 | 2.398 |
| 245 | IC | M | 1925 | 1h15 | 10900 | 11444 | 38160 | 404 | M | 1925 | 3564 | 4525 | 7.425 |
| 243 | H | M | 1938 | 1h18 | 21008 | 22046 | 25508 | 388 | M | 1938 | 2643 | 3867 | 11.877 |
| 239 | TIA | M | 1923 | 1h40 | 17122 | 7471 | 37548 | 464 | M | 1923 | 2957 | 5775 | 6.292 |
| 202 | H | M | 1949 | 1h15 | 12225 | 8379 | 66554 | 305 | M | 1949 | 37188 | 4587 | 5.449 |
| 229 | H | M | 1932 | 2h05 | 9237 | 14931 | - | 317 | M | 1931 | 8857 | 13370 | 7.183 |
| 271 | Irr | M | 1913 | 2h07 | 11658 | 27199 | 22313 | 439 | M | 1913 | 4248 | 4348 | 11.884 |
| 256 | TIA | F | 1935 | 3h00 | 17727 | 23110 | 20671 | 378 | F | 1935 | 3512 | 4420 | 7.546 |
| 267 | IC | M | 1928 | 3h00 | 25665 | 11309 | 69539 | 339 | M | 1929 | 2455 | 3784 | 5.086 |
| 208 | Irr | F | 1945 | 8h00 | 12617 | 20467 | 13080 | 349 | F | 1946 | 4076 | 4103 | 5.166 |
| 212 | Irr | M | 1934 | 10h30 | 27326 | 11986 | 17216 | 379 | M | 1934 | 8791 | 8751 | 10.497 |
| 258 | IC | M | 1920 | 1d | 16814 | 9392 | 26118 | 400 | M | 1922 | 4919 | 7411 | 5.920 |
| 234 | TIA | M | 1914 | 2d | 2880 | 13278 | 78373 | 322 | M | 1915 | 5373 | 5757 | 12.112 |
| 246 | IC | M | 1920 | 2d | 10374 | 10983 | 27109 | 443 | M | 1919 | 11589 | 13479 | 13.797 |
| 250 | IC | M | 1908 | 4d | 32857 | 5702 | 122914 | 450 | M | 1909 | 17357 | 12344 | 47.866 |
| 240 | Irr | M | 1926 | 5d | 9796 | 17691 | 12817 | 430 | M | 1926 | 2660 | 4505 | 7.542 |
| 254 | Irr | F | 1960 | ? | 21142 | 10078 | 29784 | 354 | F | 1955 | 3711 | 3647 | 6.360 |
| 249 | Irr | | | | | | 32639 | | | | | | |
| PACIENTES DE ICTUS (después de 72 h de la llegada al hospital de emergencias) | | | | | | | | | | | | | |
| 239 | TIA | M | 1923 | 1h40 | 11517 | 7169 | 19918 | | | | | | |
| 202 | H | M | 1949 | 1h15 | 5764 | 7706 | 27685 | | | | | | |
| 239 | IC | | | | 16357 | 11919 | 21931 | | | | | | |

ic: ictus establecido
 Irr: isquémico resuelto rápidamente
 TIA: ataque isquémico transitorio
 H: Hemorrágico
 M: Hombre
 F: Mujer

RFU: Unidad de fluorescencia relativa (longitud de onda de excitación 444 nm, longitud de onda de emisión 555 nm)

Plasma positivo (asado)

Paciente 25508 antes y después de 72 h

25508 paciente (Hemorrágico) n.º 273 emparejados por edad/sexo con el control en lugar de n.º 243

Figura 7. Detección de UFD1 en nuevas muestras en plasma diluidas 2 veces. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente de tipo sándwich. Valores brutos en modo cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo

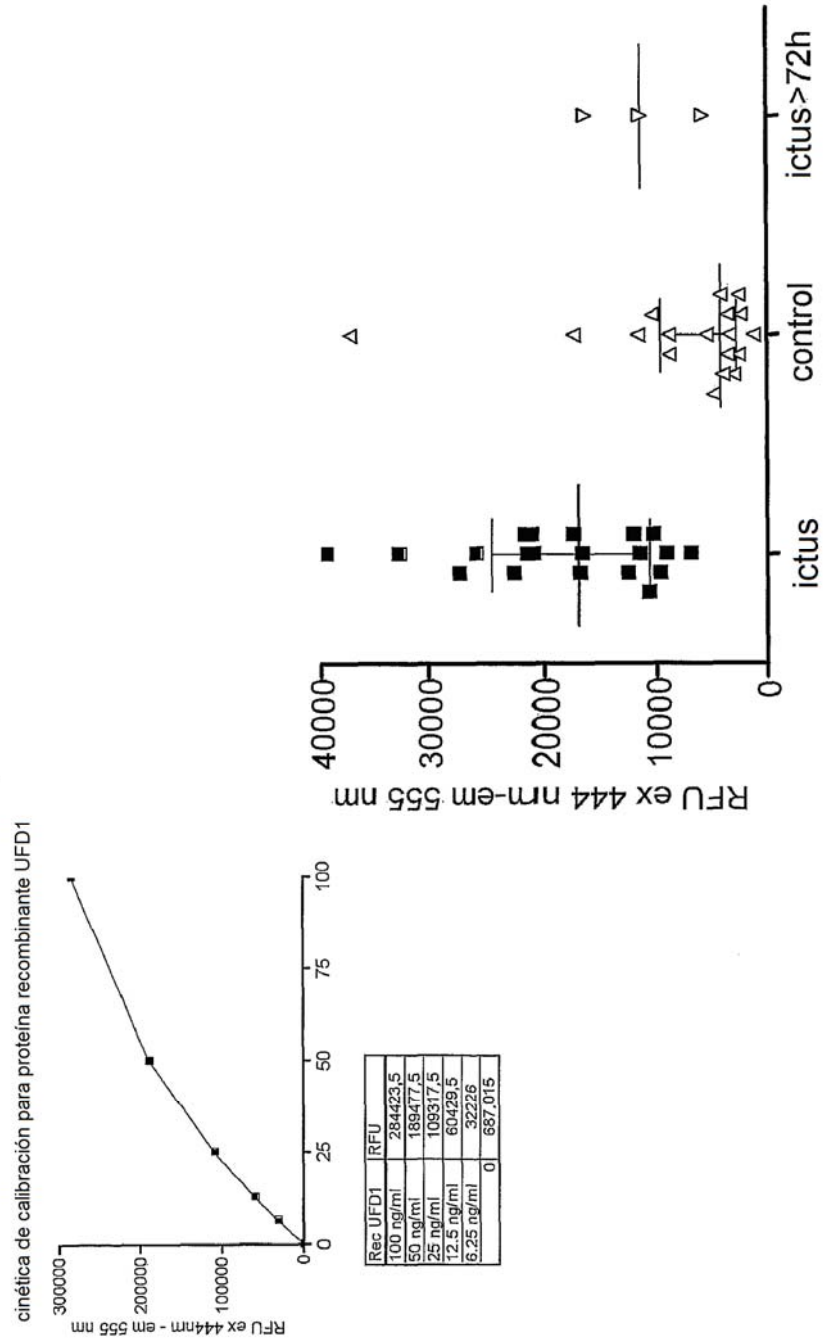
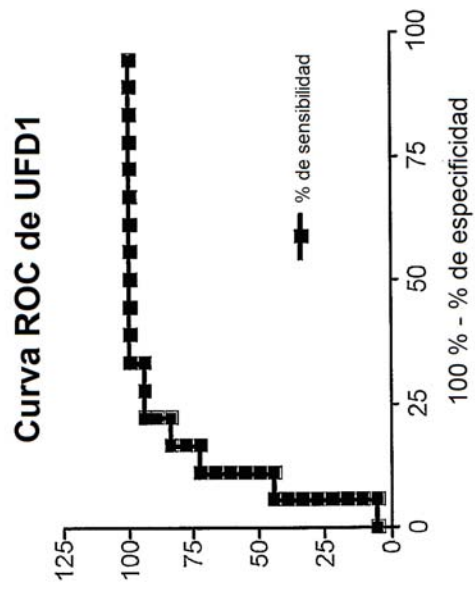


Figura 8. Curva ROC de UFD1



Mejor valor de corte de UFD1 para diferenciar ictus frente a control. Determinación de sensibilidad y especificidad

| | corte | P (Mann y Whitney) | SE | SP |
|---------|-------|--------------------|-------|-------|
| S vs. C | 9047 | <0,0001 | 94,4% | 77,8% |

Figura 9. Detección de UFD1 en nuevas muestras de plasma diluidas 2 veces. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente de tipo sándwich. Valores en bruto en modo cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo

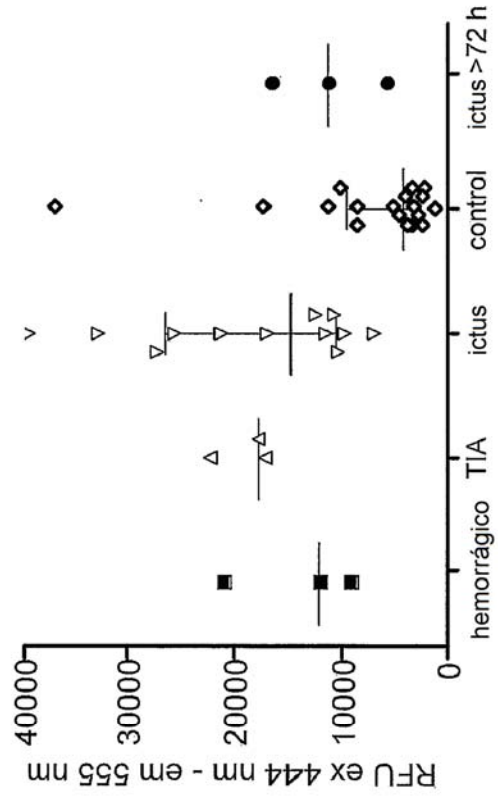


Figura 10. Detección de RNA-BP en nuevas muestras de plasma diluidas 2 veces. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente de tipo sándwich. Valores brutos en modo cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo

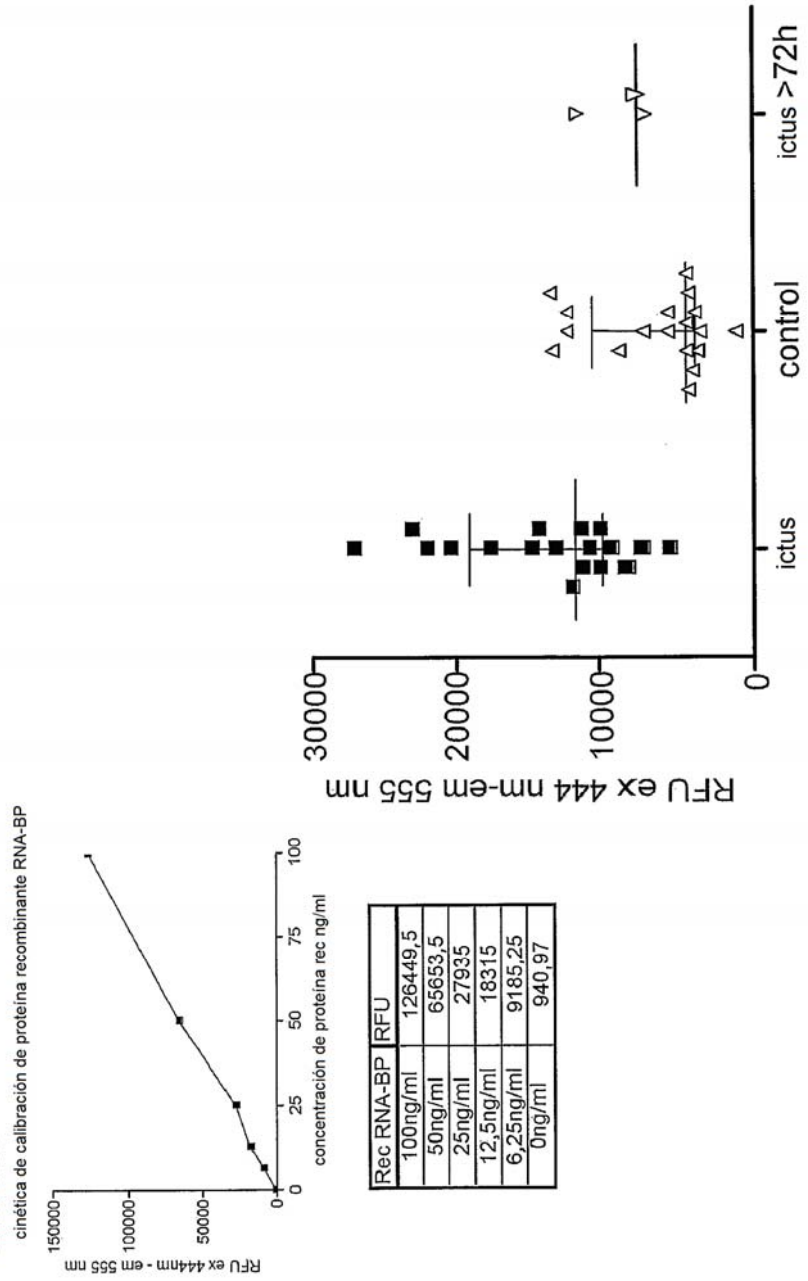
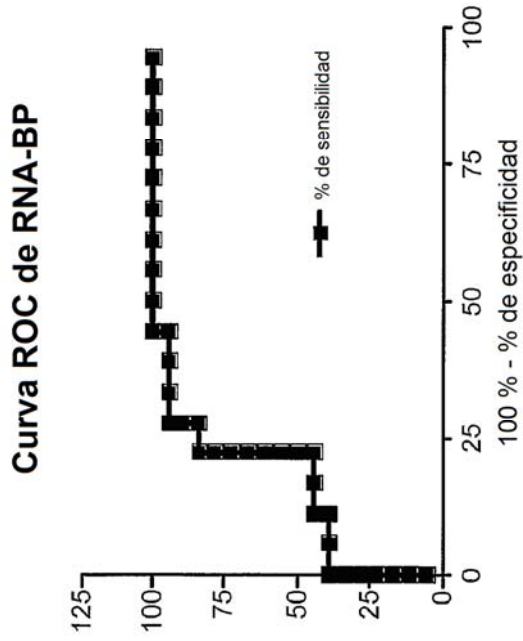


Figura 11. Curva ROC de RNA-BP



Mejor valor de corte de RNA-BP para diferenciar ictus frente a control. Determinación de la sensibilidad y la especificidad

| | corte | P (Mann y Whitney) | SE | SP |
|---------|-------|--------------------|-------|-------|
| S vs. C | 7441 | 0.0003 | 94,4% | 72,2% |

Figura 12. Detección de RNA-BP en nuevas muestras de plasma diluidas 2 veces. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente de tipo sándwich. Valores brutos en modo cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo

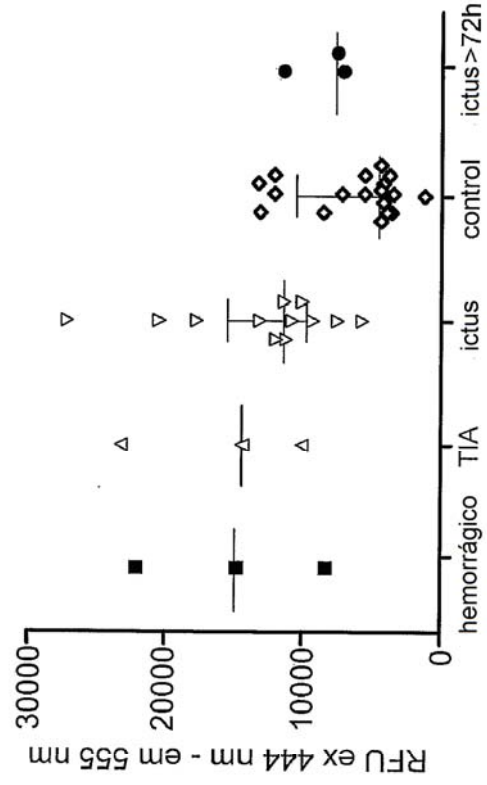


Figura 13. Detección de NDK A en nuevas muestras de plasma sin diluir. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente de tipo sándwich. Valores brutos en modo cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo

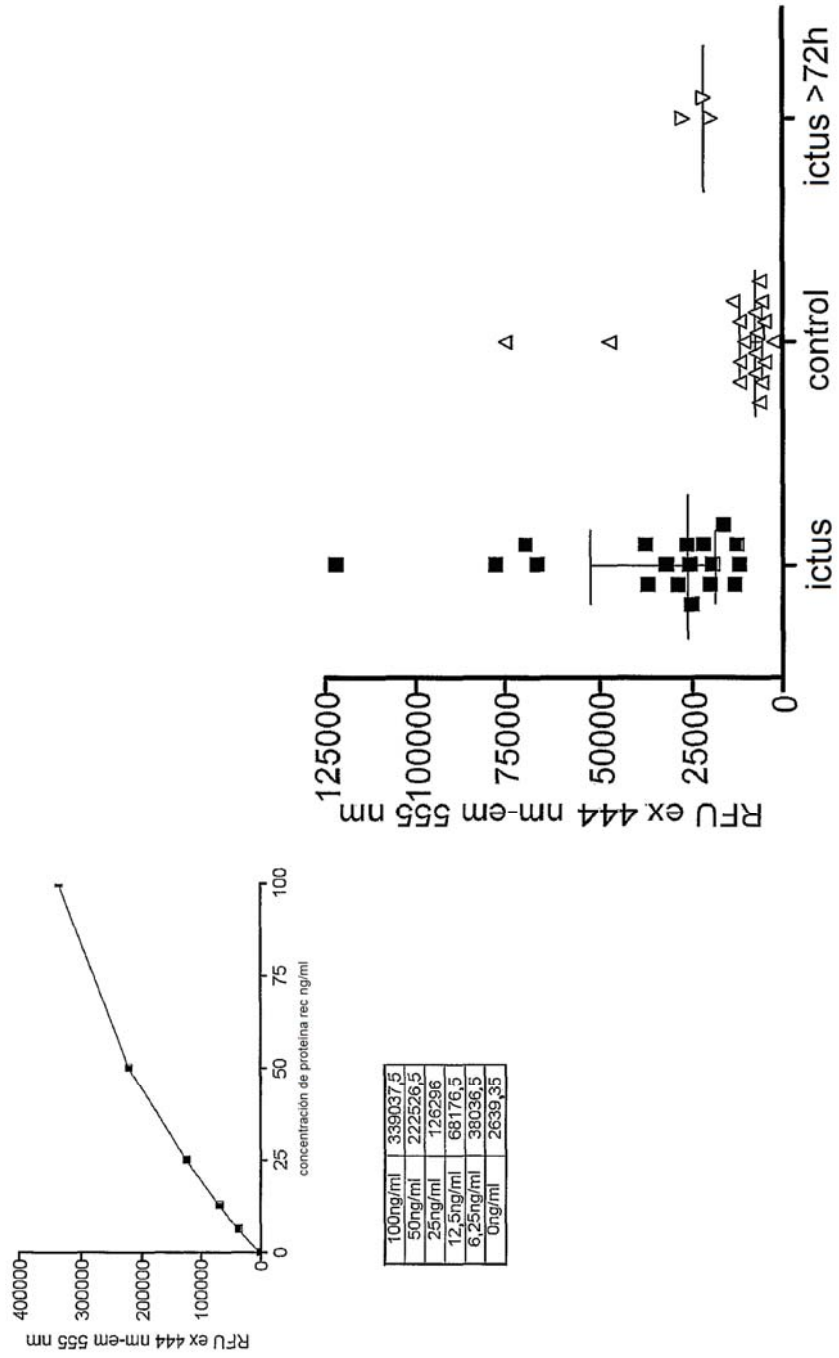
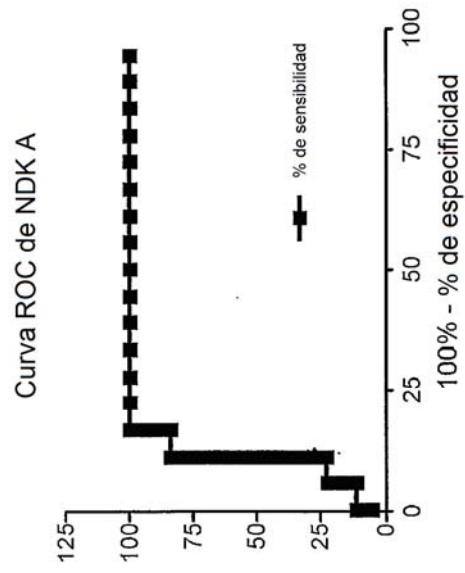


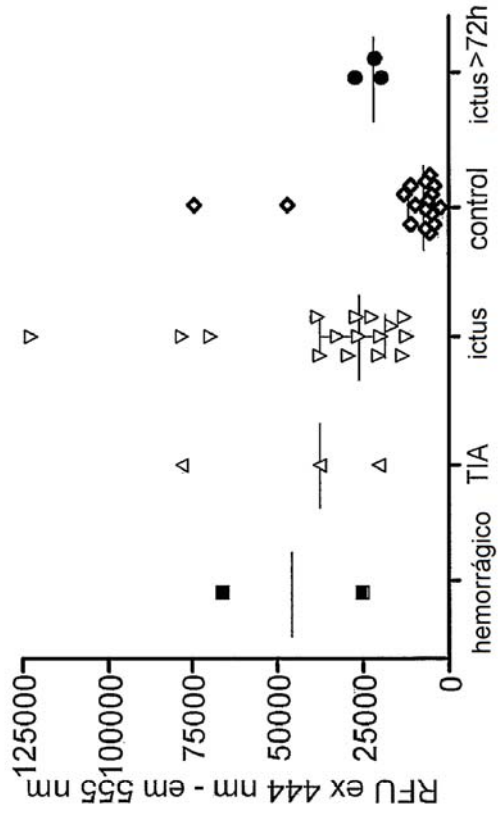
Figura 14. Curva ROC de NDK A



Mejor valor de corte de NDK A para diferenciar ictus frente a control. Determinación de la sensibilidad y la especificidad

| | corte | P (Mann y Whitney) | SE | SP |
|---------|-------|--------------------|------|-------|
| S vs. C | 12464 | <0,0001 | 100% | 83,3% |

Figura 15. Detección de NDK A en nuevas muestras de plasma no diluidas. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente de tipo sándwich. Valores brutos en modo cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo



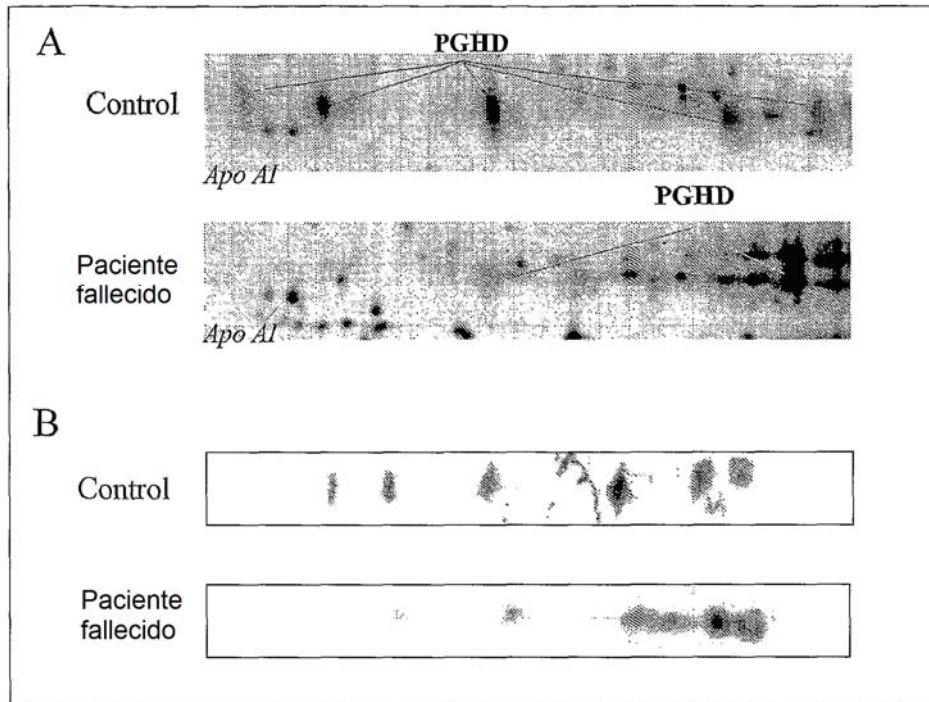


Figura 16

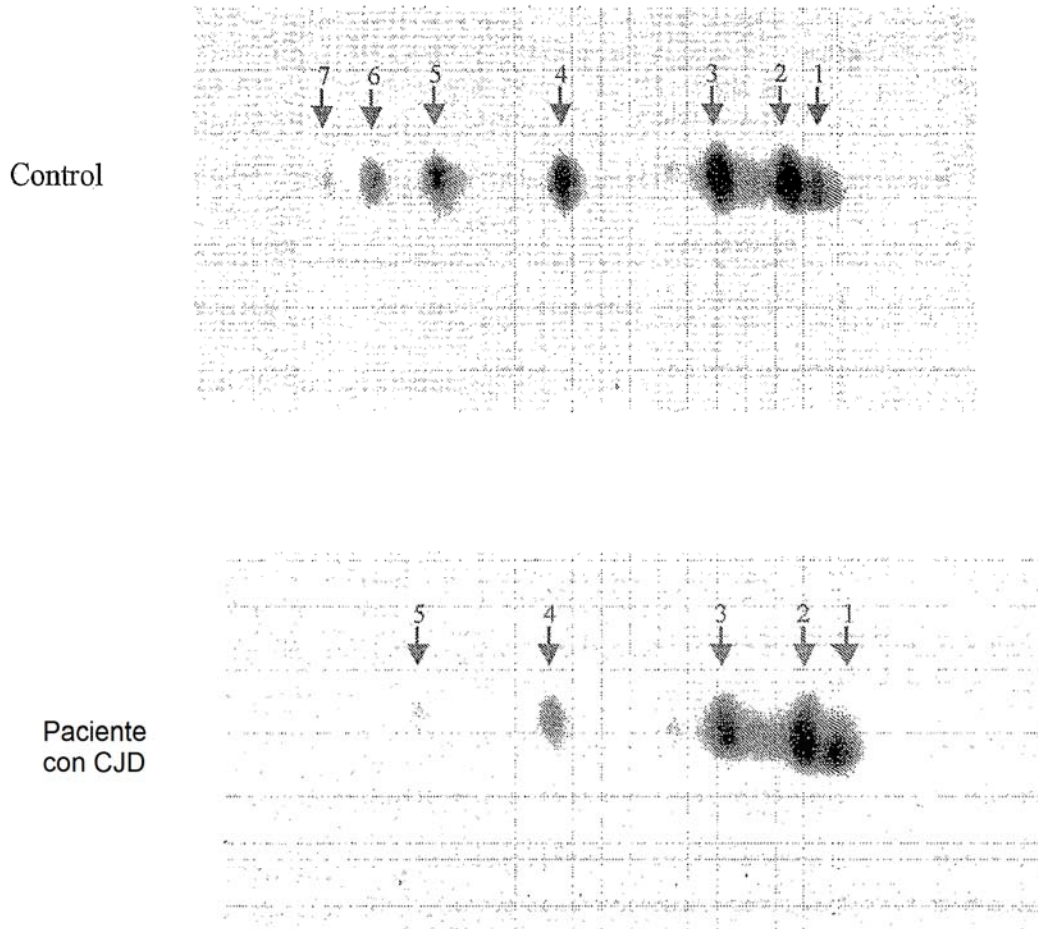
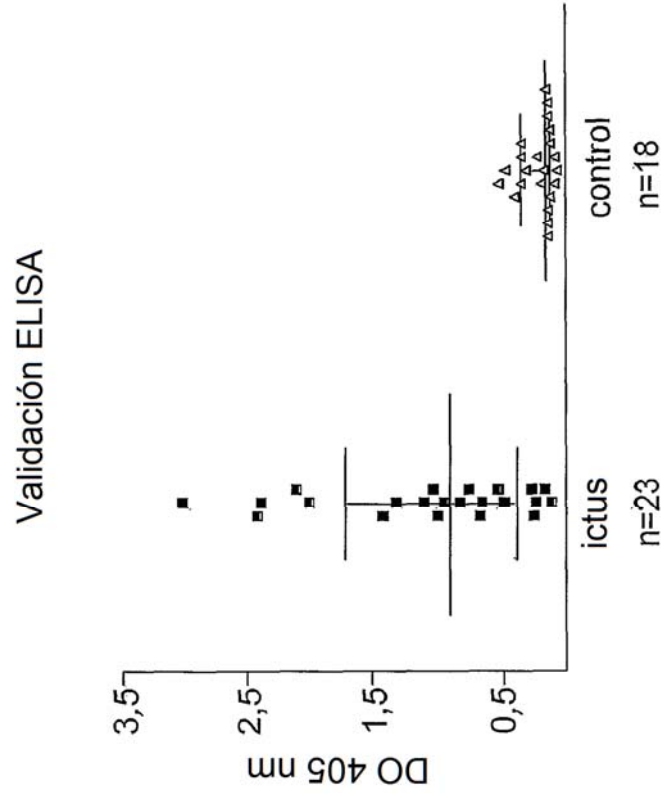


Figura 17

Figura 18 - Proteína de unión a ácidos grasos de corazón (H-FABP)



| | p | SE | SP |
|---------|----------|-----|------|
| S vs. C | < 0,0001 | 68% | 100% |

Figura 19 - Descubrimiento de UFPD-1 en LCR post-mortem

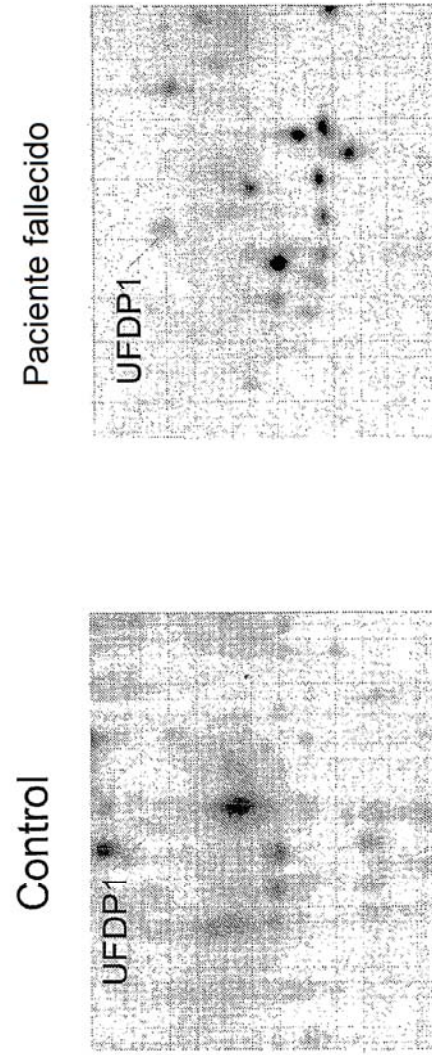


Figura 20 - Concentración en plasma de UFDP1: ELISA

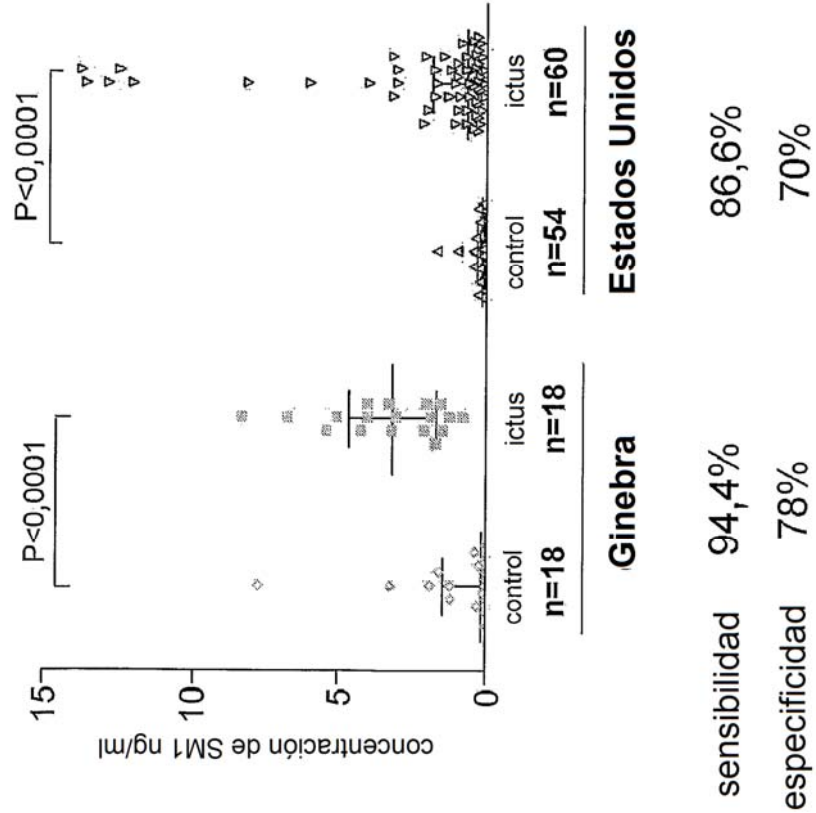
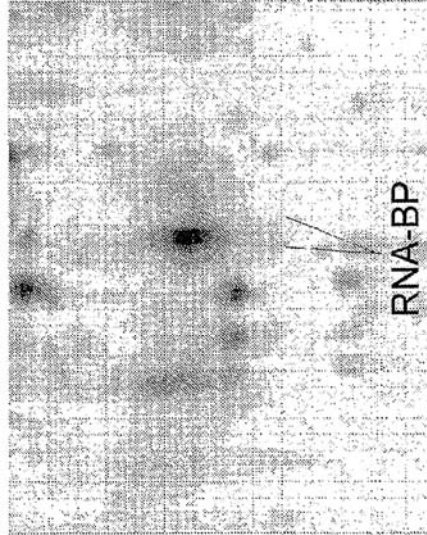


Figura 21 - Descubrimiento de RNA-BP en LCR post-mortem

Control



Paciente fallecido

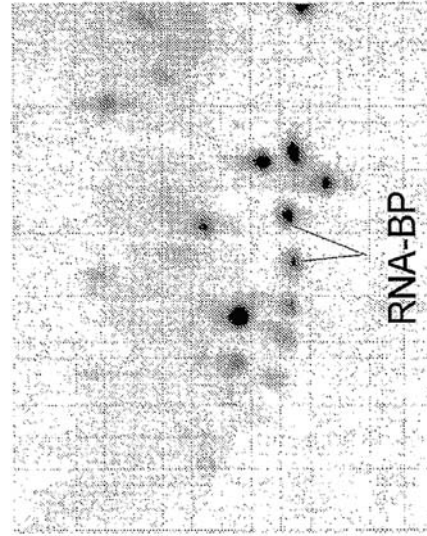


Figura 22 - Concentración en plasma de RNA-BP: ELISA

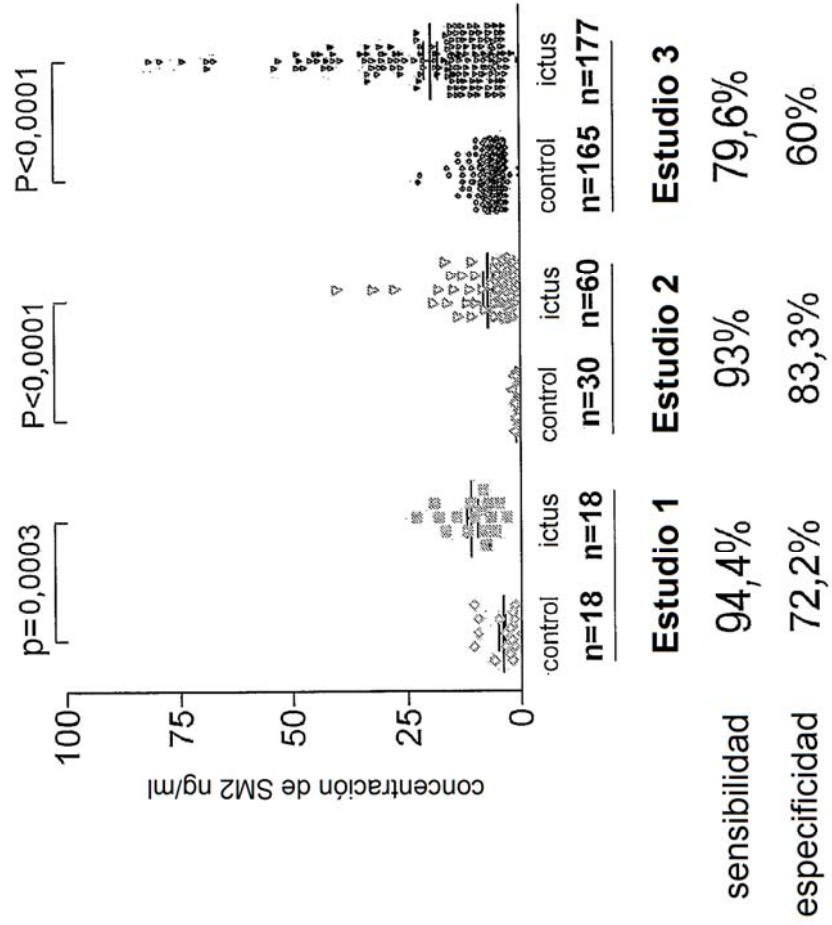


Figura 23 - Descubrimiento de NDKA en LCR post-mortem

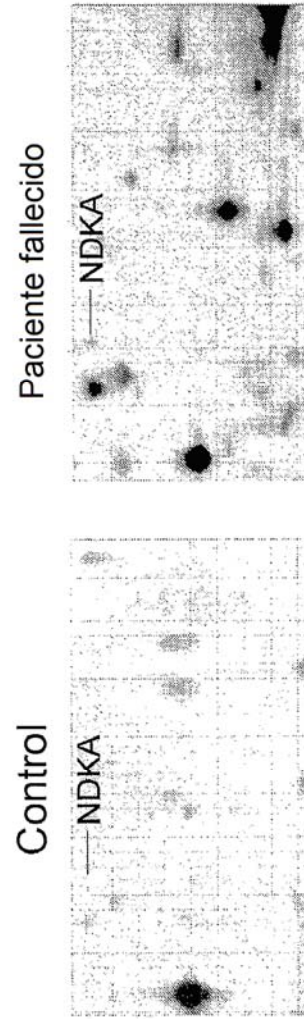


Figura 24 - Concentración en plasma de NDKA: ELISA

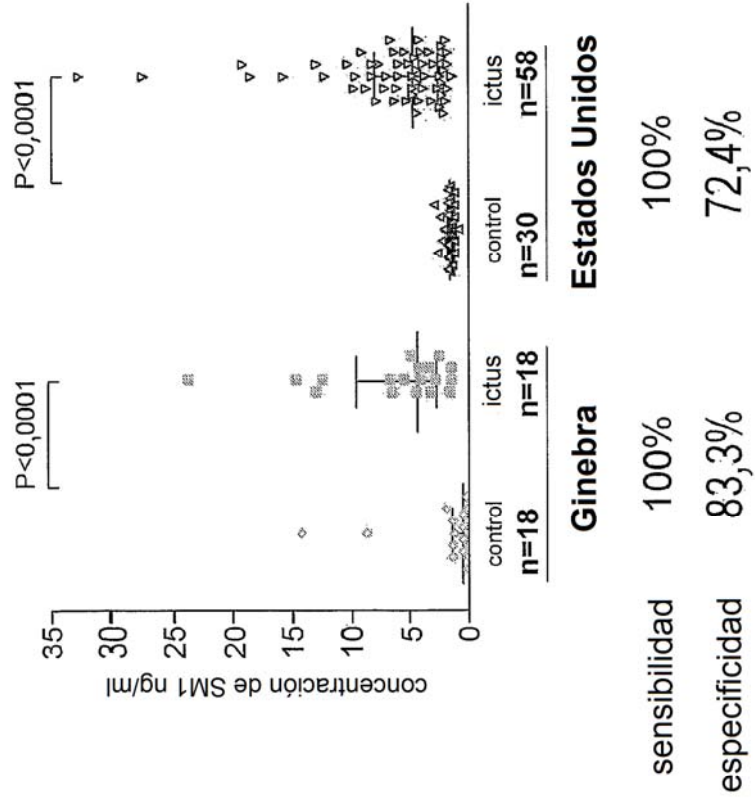


Figura 25a - Tiempo de inicio de los síntomas

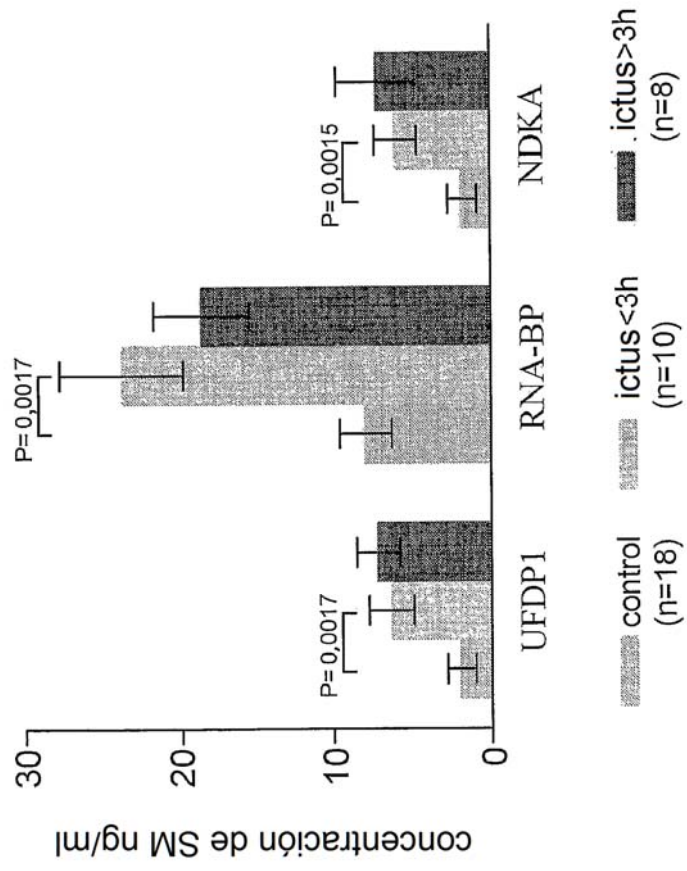


Figura 25b: Tipo de ictus

(Datos de Estados Unidos, media \pm SEM, prueba de Mann Whitney)

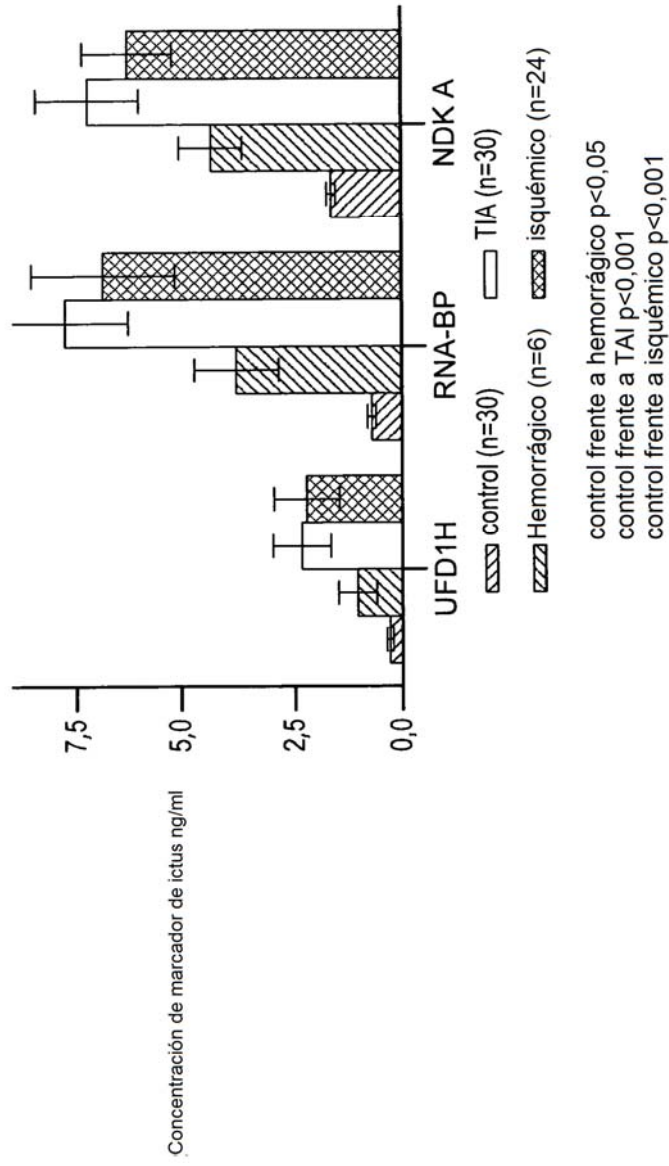
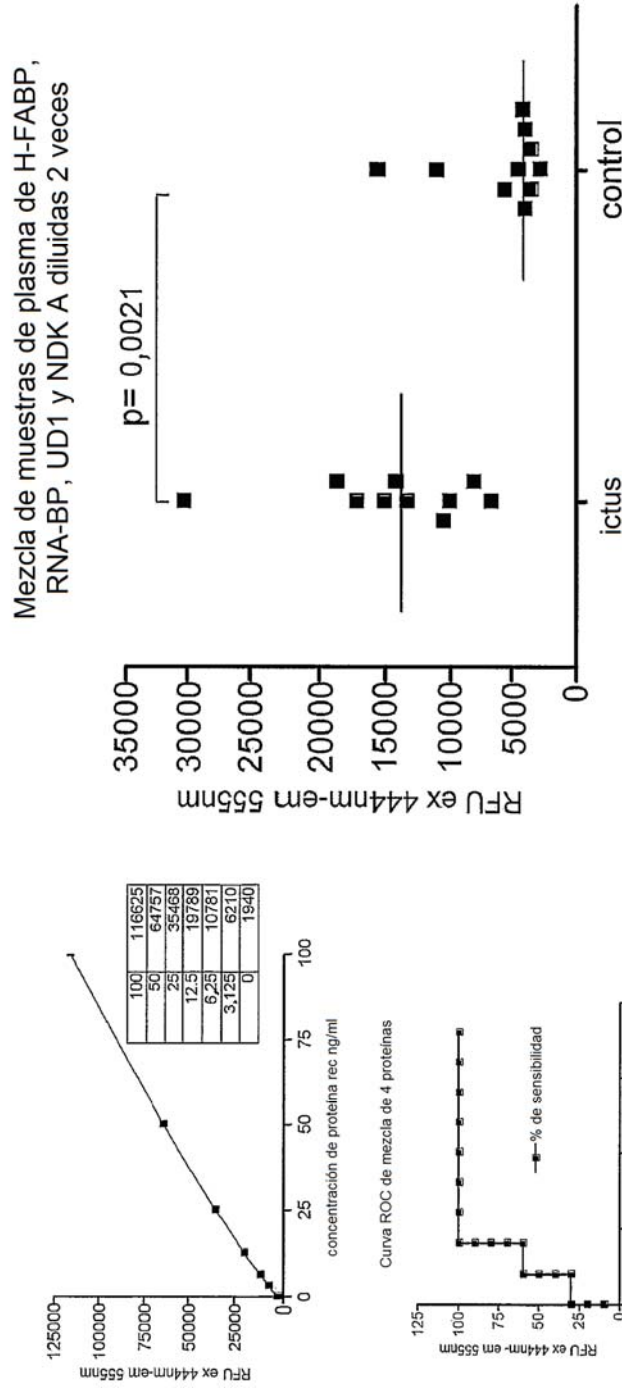


Figura 26 - PANEL de marcadores plasmáticos tempranos de ictus

| Proteína | Tipo de marcador | % de sensibilidad | % de especificidad |
|----------|---|-------------------|--------------------|
| H-FABP | Marcador de diagnóstico temprano de ictus | 68 | 100 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| UFDP1 | Marcador de diagnóstico temprano de ictus | 94 | 78 |
| RNA-BP | Marcador de diagnóstico temprano de ictus | 94 | 72 |
| NDKA | Marcador de diagnóstico temprano de ictus | 100 | 83 |

Figura 27. Mezcla de UFD1, RNA-BP, NDK A y H-FABP en el mismo pocillo. Detección de la señal total generada por todas las proteínas en nuevas muestras de plasma diluidas 2 veces. Anticuerpos para ELISA inmunofluorescente. Valores brutos en modo fluorescente cinético. Controles/ictus emparejados por edad/sexo



| | | | |
|---------|--------------------|------|-----|
| S vs. C | P (Mann y Whitney) | SE | SP |
| | 0,0021 | 100% | 80% |

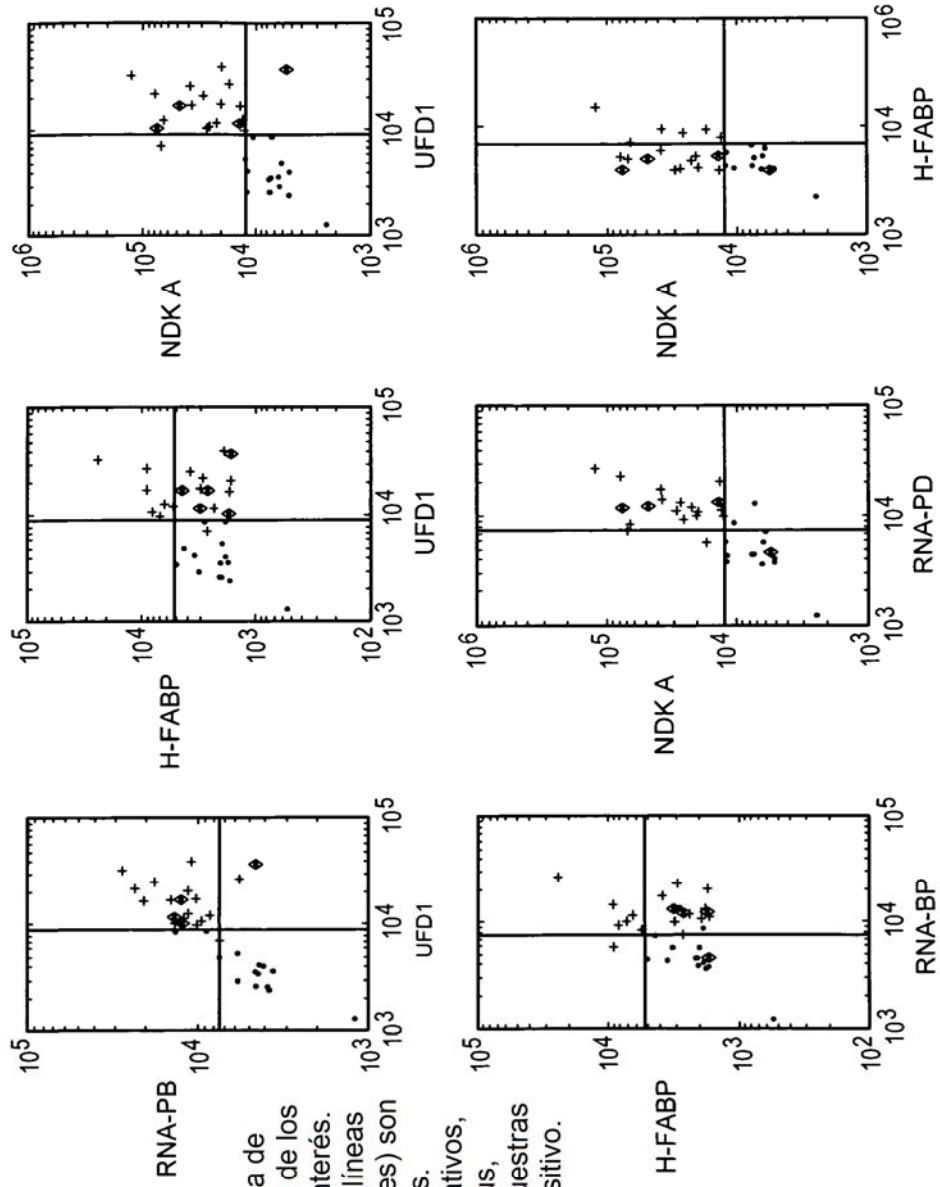


Fig. 28

Representación gráfica de una combinación de 2 de los 4 biomarcadores de interés. Los cortes indicados (líneas horizontales y verticales) son los datos por nosotros. Punto: Controles negativos, cruz, pacientes de ictus, puntos en rombos: muestras de control de falso positivo.

FIGURA 29A

| Número de paciente | Diag | Sexo | año de nacimiento (año) | Tiempo de inicio de los síntomas (min) | UFD1 (ng/ml) | RNA-BP (ng/ml) | NDK A (ng/ml) |
|--------------------|------|------|-------------------------|--|--------------|----------------|---------------|
| 186 | I | M | 1931 | 30 | 1,67 | 9,58 | 1,73 |
| 253 | I | F | 1975 | 45 | 16,76 | 15,84 | 3,01 |
| 245 | I | M | 1925 | 75 | 3,42 | 13,14 | 6,73 |
| 243 | H | M | 1938 | 78 | 8,11 | 36,64 | 4,15 |
| 239 | TIA | M | 1923 | 100 | 6,31 | 22,38 | 6,60 |
| 202 | H | M | 1949 | 75 | 4,04 | 11,26 | 12,52 |
| 229 | H | M | 1932 | 125 | 2,65 | 23,43 | NAN |
| 271 | I | M | 1913 | 127 | 3,77 | 17,96 | 3,50 |
| 256 | TIA | F | 1935 | 180 | 6,59 | 14,43 | 3,16 |
| 267 | I | M | 1928 | 180 | 10,27 | 28,55 | 13,13 |
| 208 | I | F | 1945 | 480 | 4,22 | 16,95 | 1,61 |
| 212 | I | M | 1934 | 630 | 11,04 | 6,29 | 2,46 |
| 258 | I | M | 1920 | 1440 | 6,17 | 33,71 | 4,27 |
| 234 | TIA | M | 1914 | 2880 | 8,70 | 38,62 | 14,93 |
| 246 | I | M | 1920 | 2880 | 3,18 | 20,36 | 4,47 |
| 250 | I | M | 1908 | 5760 | 13,61 | 46,21 | 24,02 |
| 240 | I | M | 1926 | 7200 | 2,91 | 14,42 | 1,56 |
| 254 | I | F | 1960 | NAN | 8,18 | 16,70 | 5,02 |
| 249 | I | M | 1931 | 720 | NAN | NAN | 5,60 |
| 255 | I | M | 1910 | 2880 | 7,31 | 47,38 | 4,41 |
| 298 | I | M | 1910 | 225 | 7,58 | 55,55 | 32,84 |
| 154 | I | F | 1910 | 165 | 6,72 | 13,22 | 7,73 |
| 179 | I | F | 1912 | 150 | 6,74 | 13,62 | 4,08 |
| 248 | TIA | F | 1912 | 150 | 10,72 | 19,00 | 4,59 |
| 225 | I | M | 1915 | 1440 | 4,35 | 13,74 | 12,98 |
| 156 | I | F | 1919 | 650 | 1,87 | 4,87 | 0,84 |
| 173 | I | M | 1920 | 2880 | 7,00 | 13,00 | 5,92 |
| 205 | I | M | 1920 | 2880 | 10,94 | 14,83 | 6,12 |
| 299 | I | F | 1923 | 2880 | 7,19 | 26,47 | 31,49 |
| 245 | I | M | 1925 | 75 | 2,83 | 9,61 | 7,00 |
| 189 | TIA | M | 1926 | 360 | 2,07 | 8,68 | 2,54 |
| 181 | TIA | M | 1930 | 70 | 1,60 | 3,98 | 0,95 |
| 176 | I | M | 1932 | 2880 | 5,34 | 10,88 | 2,24 |
| 135 | I | F | 1933 | 275 | 14,85 | 18,60 | 6,38 |
| 161 | I | M | 1936 | 135 | 1,83 | 11,60 | NAN |
| 285 | I | M | 1938 | 240 | 2,48 | 9,92 | NAN |
| 215 | TIA | M | 1933 | 715 | 1,54 | 6,05 | NAN |
| 235 | I | M | 1970 | 195 | 5,12 | 16,09 | NAN |
| 368 | ctrl | M | 1931 | NAN | 3,17 | 18,48 | 14,26 |
| 401 | ctrl | F | 1972 | NAN | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 404 | ctrl | M | 1925 | NAN | 0,02 | 4,10 | 0,46 |
| 388 | ctrl | M | 1938 | NAN | 0,00 | 2,88 | 1,37 |
| 464 | ctrl | M | 1923 | NAN | 0,00 | 6,42 | 0,23 |
| 305 | ctrl | M | 1949 | NAN | 15,62 | 4,22 | 0,06 |
| 317 | ctrl | M | 1931 | NAN | 2,47 | 20,53 | 0,41 |

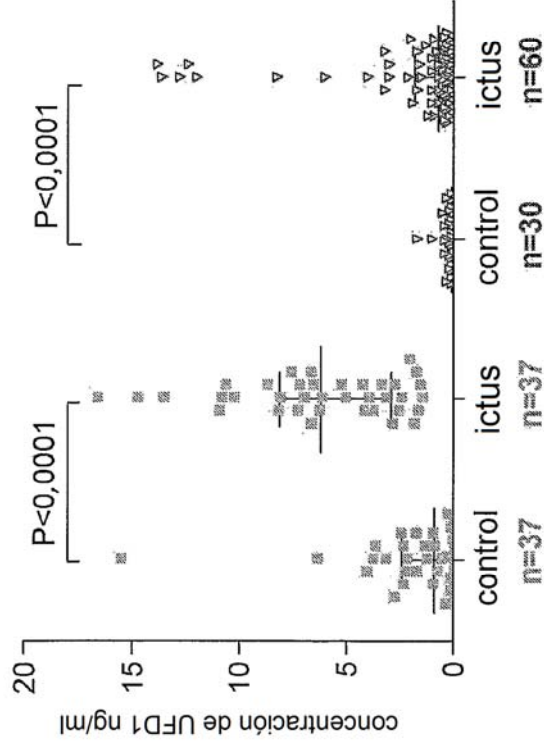
FIGURA 29B

| Número de paciente | Diag | Sexo | año de nacimiento (año) | Tiempo de inicio de los síntomas (min) | UFD1 (ng/ml) | RNA-BP (ng/ml) | NDK A (ng/ml) |
|--------------------|------|------|-------------------------|--|--------------|----------------|---------------|
| 439 | ctrl | M | 1913 | NAN | 0,34 | 3,78 | 1,37 |
| 378 | ctrl | F | 1935 | NAN | 0,00 | 3,91 | 0,48 |
| 339 | ctrl | M | 1929 | NAN | 0,00 | 2,73 | -0,02 |
| 349 | ctrl | F | 1946 | NAN | 0,26 | 3,32 | 0,00 |
| 379 | ctrl | M | 1934 | NAN | 2,44 | 11,95 | 1,09 |
| 400 | ctrl | M | 1922 | NAN | 0,65 | 9,46 | 0,15 |
| 322 | ctrl | M | 1915 | NAN | 0,86 | 6,39 | 1,42 |
| 443 | ctrl | M | 1919 | NAN | 3,74 | 20,73 | 1,76 |
| 450 | ctrl | M | 1909 | NAN | 6,42 | 18,62 | 8,71 |
| 430 | ctrl | M | 1926 | NAN | 0,00 | 4,07 | 0,48 |
| 354 | ctrl | F | 1955 | NAN | 0,09 | 2,47 | 0,24 |
| 389 | ctrl | M | 1909 | NAN | 2,78 | 9,08 | 3,02 |
| 371 | ctrl | M | 1910 | NAN | 1,30 | 4,70 | 0,00 |
| 352 | ctrl | F | 1911 | NAN | 1,46 | 5,54 | 0,01 |
| 376 | ctrl | F | 1912 | NAN | 0,00 | 2,58 | 0,00 |
| 429 | ctrl | F | 1912 | NAN | 2,45 | 5,68 | 0,00 |
| 399 | ctrl | M | 1916 | NAN | 0,46 | 6,28 | 0,61 |
| 434 | ctrl | F | 1919 | NAN | 2,22 | 5,94 | 0,25 |
| 459 | ctrl | M | 1921 | NAN | 0,88 | 3,75 | 0,43 |
| 462 | ctrl | M | 1921 | NAN | 0,41 | 2,16 | 0,00 |
| 444 | ctrl | F | 1922 | NAN | 4,13 | 5,52 | 0,14 |
| 468 | ctrl | M | 1923 | NAN | 1,80 | 5,14 | 2,22 |
| 386 | ctrl | M | 1927 | NAN | 0,98 | 2,96 | 0,39 |
| 397 | ctrl | M | 1931 | NAN | 2,30 | 16,58 | 0,12 |
| 402 | ctrl | M | 1933 | NAN | 3,86 | 7,32 | 0,15 |
| 416 | ctrl | F | 1934 | NAN | 0,00 | 2,13 | 0,45 |
| 307 | ctrl | M | 1936 | NAN | 0,19 | 3,08 | NAN |
| 321 | ctrl | M | 1938 | NAN | 0,23 | 2,07 | NAN |
| 417 | ctrl | M | 1943 | NAN | 1,83 | 10,41 | NAN |
| 377 | ctrl | M | 1966 | NAN | 1,05 | 8,59 | NAN |

NAN : no ensayado

Figura 30: Proteína de degradación por fusión de ubiquitina

Validación ELISA (prueba de Mann-Whitney)



| | Ginebra | Estados Unidos |
|---------------|---------|----------------|
| sensibilidad | 91,9% | 86,6% |
| especificidad | 67,5% | 70% |

Figura 31: Proteína de unión a ARN en plasma

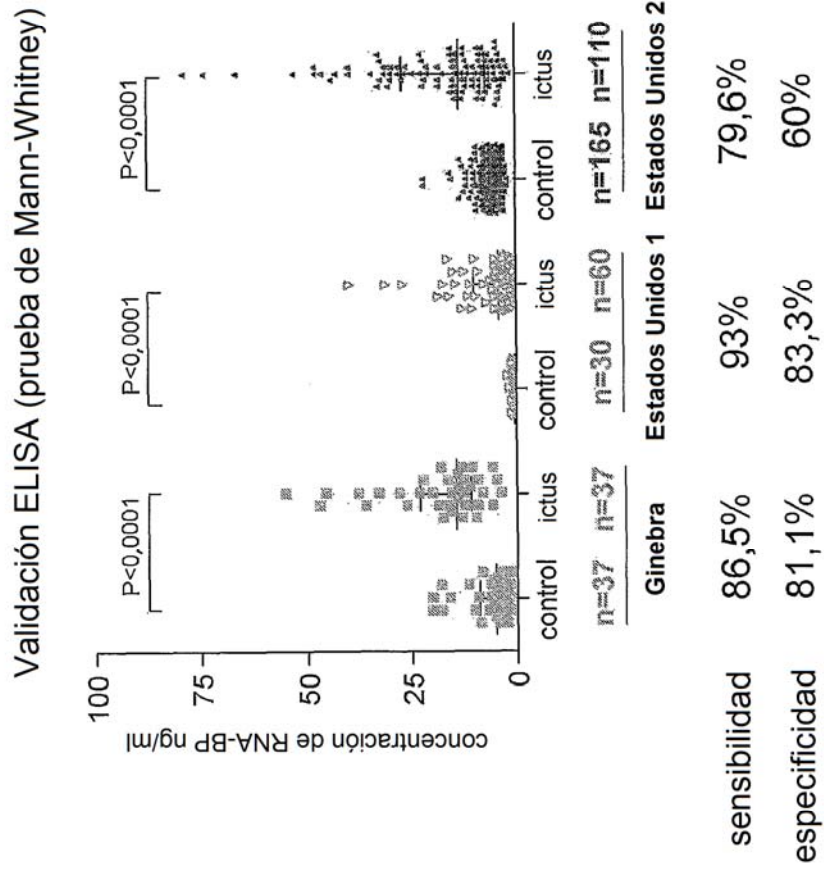


Figura 32: Proteína de unión a ARN en plasma (Estados Unidos 3)

Datos de Estados Unidos de estudio de escape a gran escala en 633 pacientes

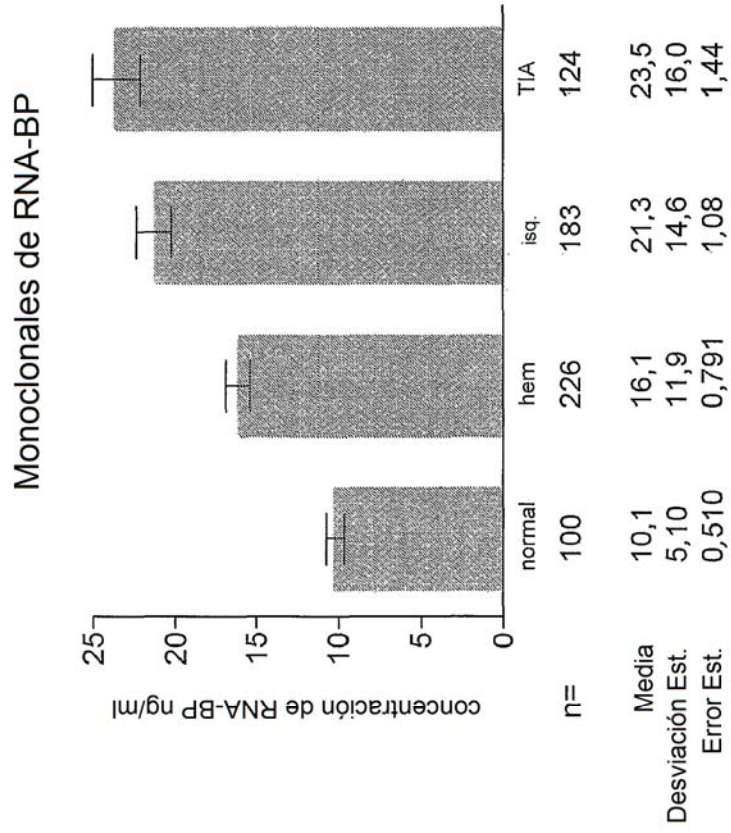


Figura 33: Proteína de unión a ARN en plasma (Estados Unidos 3)

| Estadística de Kruska-Wallis | 79,78 | | | | |
|--|-------|------------|-------|------|------|
| Prueba de comparación múltiple de Dunn | | | | | |
| normal frente a hem. | | Valor de p | CO | SE | SP |
| normal frente a isq. | | P < 0,001 | 9,5 | 68 | 62 |
| normal frente a TIA | | P < 0,001 | 9,5 | 77,6 | 62 |
| hem frente a isq. | | P < 0,001 | 9,5 | 81,4 | 62 |
| hem frente a TIA | | P < 0,01 | 13,5 | 60 | 54,9 |
| isq. frente a TIA | | P < 0,001 | 15,95 | 64,5 | 63,7 |
| | | P > 0,05 | | | |

Figura 34: Nucleósido difosfato cinasa A

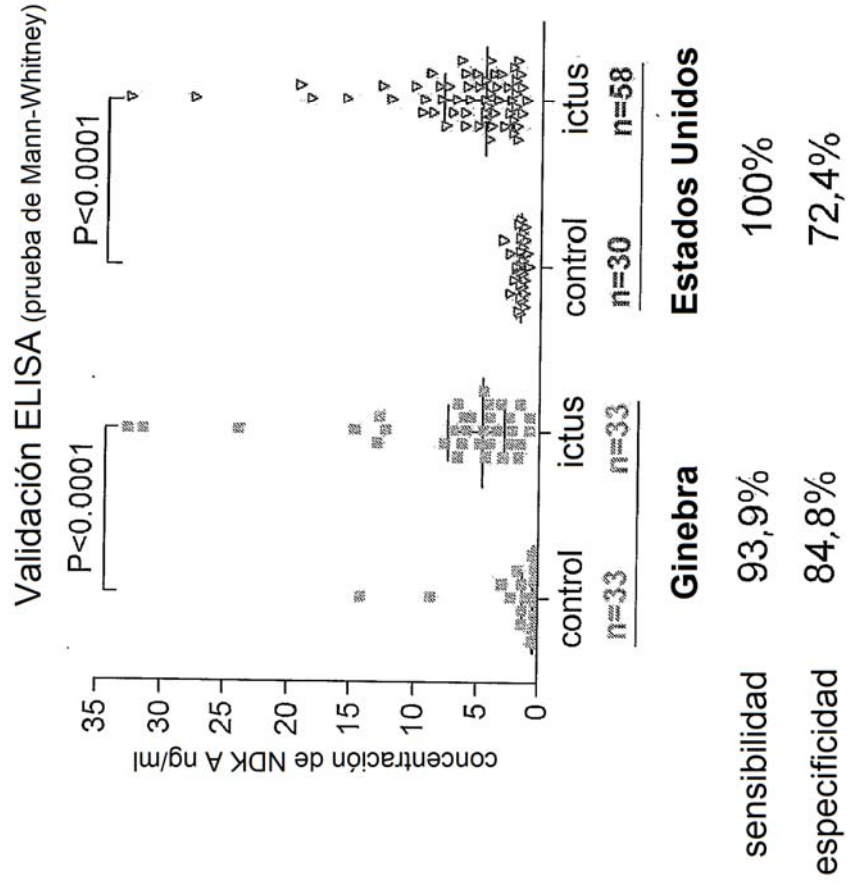


Figura 35: Nucleósido difosfato cinasa A (Estados Unidos 3)

Datos de Estados Unidos de estudio a gran escala en 622 pacientes

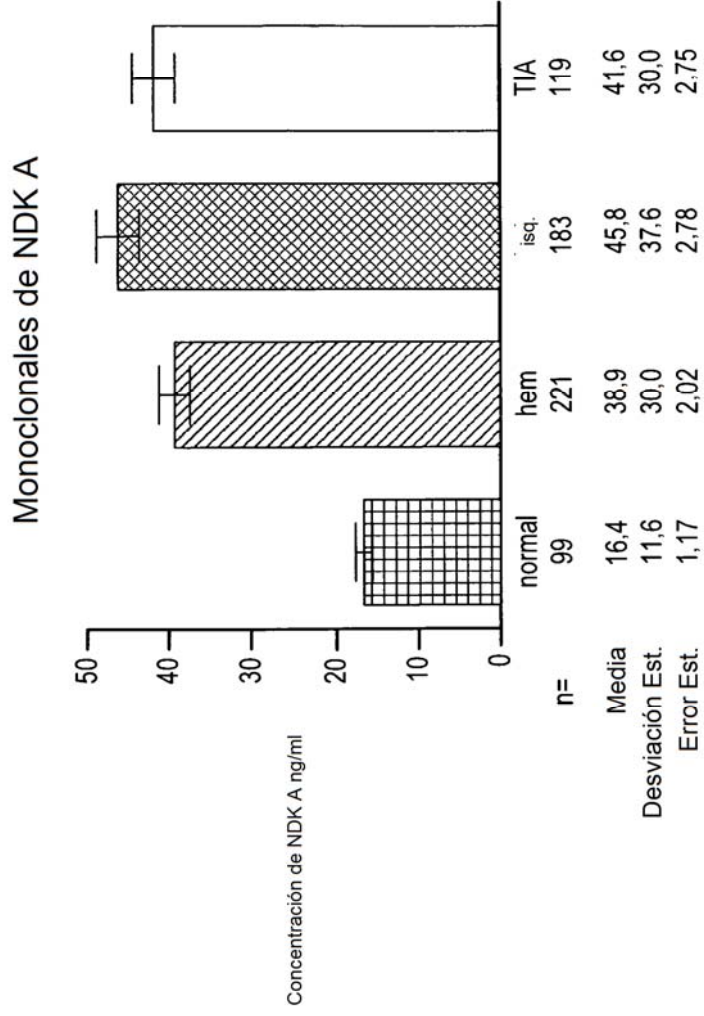


Figura 36: Nucleósido difosfato cinasa A (Estados Unidos 3)

| Estadística de Krustal-Wallis 109,9 | | | | | |
|--|------------|----|------|------|--|
| Prueba de comparación múltiple de Dunn | Valor de p | CO | SE% | SP% | |
| normal frente a hem | P < 0,001 | 18 | 81 | 76,7 | |
| normal frente a isq. | P < 0,001 | 18 | 74,8 | 76,7 | |
| normal frente a TIA | P < 0,001 | 18 | 81,5 | 76,7 | |
| hem frente a isq. | P > 0,05 | | | | |
| hem frente a TIA | P > 0,05 | | | | |
| isq. frente a TIA | P > 0,05 | | | | |

Figura 37: Tiempo de inicio de los síntomas

(Datos de Ginebra, media \pm SEM, prueba de Mann Whitney)

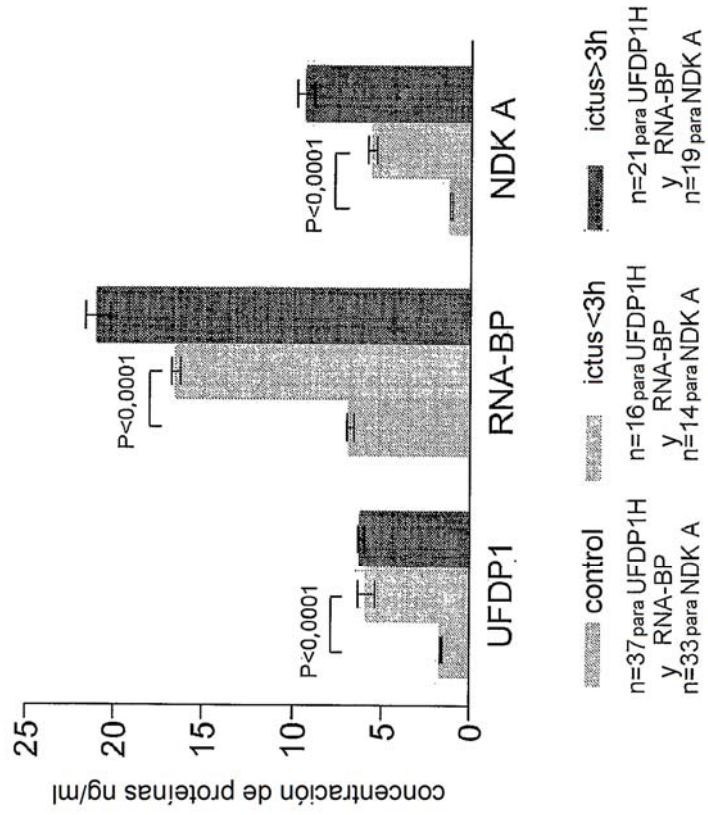


Figura 38: Tipo de ictus

(Datos de Estados Unidos 1, media \pm SEM, prueba de Mann Whitney)

