

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 245**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2009 PCT/US2009/053376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10019553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2009 E 09807153 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2324360**

54 Título: **Proceso de detección de biomarcador y ensayo de estado neurológico**

30 Prioridad:

11.08.2008 US 188554 P
17.09.2008 US 97622 P
19.06.2009 US 218727 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2018

73 Titular/es:

BANYAN BIOMARKERS, INC. (100.0%)
13400 Progress Blvd.
Alachua, FL 32615, US

72 Inventor/es:

WANG, KEVIN, KA-WANG;
HAYES, RONALD, L.;
MULLER, UWE, R. y
ZHANG, ZHIQUN

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 665 245 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

Proceso de detección de biomarcador y ensayo de estado neurológico

APOYO GUBERNAMENTAL

5 **[0001]** Partes de este trabajo fueron financiadas por las subvenciones N14-06-1-1029, W81XWH-8-1-0376 y W81XWH-07-01-0701 del Departamento de Defensa de los Estados Unidos.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

10 **[0002]** La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional estadounidense N.º 61/188,554 presentada el 11 de agosto de 2008; la solicitud provisional estadounidense N.º 61/097,622 presentada el 17 de septiembre de 2008; la solicitud provisional estadounidense N.º 61/218,727 presentada el 19 de junio de 2009; y la solicitud provisional estadounidense N.º 61/271,135 presentada el 18 de julio de 2009.

CAMPO DE LA INVENCION

15 **[0003]** La presente invención se refiere, en general, a la determinación de estado neurológico de un individuo, donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía y, en particular, a medir la cantidad de un biomarcador neuroprotector, tal como proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) conjuntamente con otro biomarcador de estado neurológico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 **[0004]** El campo de la neurología clínica sigue frustrado por la comprensión de que una lesión secundaria a un tejido del sistema nervioso central asociada a una respuesta fisiológica a la lesión inicial podría reducirse sólo si la lesión inicial pudiera diagnosticarse rápidamente o en caso de un trastorno progresivo antes de que el estrés en tejidos del sistema nervioso central alcance un umbral preseleccionado. Tanto una lesión traumática, isquémica como química neurotóxica, junto con trastornos genéricos, presentan la posibilidad de daño cerebral. Mientras que el diagnóstico de formas graves de cada una de estas causas de daño cerebral se realiza directamente por medio de pruebas de respuesta clínica, tomografía computarizada (TC) e imagen por resonancia magnética (IRM), el diagnóstico por imágenes es limitado, tanto por el alto coste de las imágenes espectroscópicas como por el largo tiempo de diagnóstico. Las pruebas de respuesta clínica de personas incapacitadas son de valor limitado y normalmente impiden un diagnóstico matizado. De forma adicional, debido a las limitaciones de la diagnosis actual, se dan situaciones en las que un sujeto experimenta un estrés a su estado neurológico pero, normalmente, no es consciente de que se ha producido un daño o no busca tratamiento, puesto que los síntomas leves normalmente se solucionan rápidamente. La carencia de tratamiento de estas amenazas leves a moderadas al estado neurológico de un sujeto puede presentar un efecto acumulativo o, de otro modo, dar lugar a un evento de daño cerebral grave, presentando cualquiera de ellos un pronóstico clínico malo.

35 **[0005]** Con el fin de superar las limitaciones asociadas al diagnóstico espectroscópico y de respuesta clínica de estado neurológico, se le presta cada vez más atención a la utilización de biomarcadores como indicadores internos de cambio a estado de salud a nivel molecular o celular de un sujeto. Puesto que la detección de biomarcadores utiliza una muestra obtenida de un sujeto, normalmente líquido cefalorraquídeo, sangre o plasma, y detecta los biomarcadores en dicha muestra, la detección de biomarcadores posibilita una medición económica, rápida y objetiva de estado neurológico. La consecución de indicadores rápidos y objetivos de estado neurológico permite que se pueda determinar la gravedad de un estado cerebral anormal con un grado de objetividad no logrado anteriormente, pronosticar el resultado, guiar la terapia del estado, así como monitorizar la sensibilidad y la recuperación del sujeto. De forma adicional, dicha información obtenida de numerosos sujetos permite que se obtenga un grado de entendimiento del mecanismo de traumatismo craneal.

45 **[0006]** Se ha identificado un número de biomarcadores que están asociados a traumatismo craneoencefálico grave, tal y como se observa normalmente en una colisión de vehículos y en sujetos heridos en combate. Estos biomarcadores incluían productos de ruptura de espectrina, tales como SBDP150, SBDP150i, SBDP145 (necrosis neuronal aguda mediada por calpaína), SBDP120 (apoptosis neuronal retrasada mediada por caspasa), UCH-L1 (marcador de daño de cuerpo celular neuronal), y marcador asociado a daño de células dendríticas MAP2. La naturaleza de estos biomarcadores se describe con mayor detalle en los documentos de patente estadounidense 7,291,710 y 7,396,654.

50 **[0007]** La proteína ácida fibrilar glial (GFAP), miembro de la familia de proteínas citoesqueléticas, es el filamento intermedio principal de 8-9 nanómetros de las células gliales, como los astrocitos maduros del sistema nervioso central (SNC). GFAP es una molécula monomérica con una masa molecular entre 40 y 53 kDa y un punto isoeléctrico entre 5,7 y 5,8. GFAP es proteína altamente específica de cerebro que no se encuentra fuera del SNC. GFAP se libera en la sangre y el LCF poco después del traumatismo craneal. En la lesión del SNC posterior, bien como consecuencia de traumatismo, enfermedad, trastornos genéticos o lesión química, los astrocitos se vuelven reactivos de un modo que se caracteriza por la rápida síntesis de GFAP, denominado

astrogliosis o gliosis. Sin embargo, GFAP normalmente incrementa con la edad y existe una variación amplia en la concentración y el cambio metabólico de GFAP en el tejido cerebral.

5 **[0008]** Por lo tanto, se necesita un proceso y un ensayo para proporcionar medición mejorada de estado neurológico por medio de la cuantificación de un primer biomarcador, tal como GFAP, en combinación con otro biomarcador asociado a estado neurológico.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 **[0009]** Un proceso para determinar el estado neurológico de un sujeto, donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía, incluye medir una muestra obtenida del sujeto en un primer momento para una cantidad de un primer biomarcador y una cantidad de al menos un biomarcador neuroactivo adicional, donde dicho primer biomarcador es GFAP y dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional es UCH-L1. Mediante la comparación de la cantidad del primer biomarcador y la cantidad del al menos un biomarcador neuroactivo adicional con niveles normales para cada biomarcador, se determina el estado neurológico del sujeto. Cuando el sujeto se ha expuesto a un evento que podría provocar traumatismo craneoencefálico leve y traumatismo craneoencefálico moderado, un proceso de medir UCH-L1 y GFAP, tales lesiones presentan límites de detección para UCH-L1 y GFAP en suero de 0,39 nanogramos por milímetro (ng/ml) y 1,4 ng/ml, respectivamente.

20 **[0010]** También se proporciona un ensayo para determinar el estado neurológico de un sujeto. El ensayo incluye: (a) un sustrato para mantener una muestra biológica aislada de un sujeto (b) un agente aglutinante específicamente de un primer biomarcador donde un primer biomarcador es GFAP (c) un agente aglutinante específico para otro biomarcador neuroactivo donde dicho otro biomarcador neuroactivo es UCH-L1; y (d) instrucciones impresas para hacer reaccionar el agente específico de primer biomarcador con una primera parte de la muestra con el fin de detectar una cantidad de dicho primer biomarcador y hacer reaccionar dicho al menos un agente específico de biomarcador neuroactivo adicional con una segunda parte de la muestra y el al menos un biomarcador neuroactivo adicional en la muestra con el fin de detectar una cantidad de dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional para su relación con el estado del sujeto o de células derivadas del sujeto.

30 **[0011]** Un proceso para determinar si un sujeto ha sufrido traumatismo craneoencefálico leve o traumatismo craneoencefálico moderado en un evento, que comprende: medir mediante ELISA una muestra biológica obtenida de dicho sujeto para una cantidad de GFAP, donde dicha muestra biológica es sangre entera, suero o plasma; y comparar la cantidad medida de dicho GFAP con niveles normales de GFAP en un grupo de control que no había experimentado ninguna forma de traumatismo craneoencefálico, donde si la cantidad medida de GFAP se encuentra entre 0,082 y 0,492 nanogramos por milímetro, el sujeto ha sufrido traumatismo craneoencefálico leve o traumatismo craneoencefálico moderado en el evento.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0012]

35 La **figura 1** representa la técnica de Western Blot cuantitativa de UCH-L1 en LCF de rata después de MCAO; La **figura 2** representa niveles de UCH-L1 en LCR en sujetos tratados con placebo y CCI; La **figura 3** representa niveles de UCH-L1 en LCF tras placebo, amenaza de MCAO leve y amenaza de MCAO grave; La **figura 4** representa niveles de UCH-L1 en suero después de placebo o CCI en diversos momentos; La **figura 5** representa niveles de UCH-L1 en suero tras placebo, amenaza de MCAO leve y amenaza de MCAO grave; La **figura 6** representa niveles de SBDP145 en LCF y suero tras placebo, amenaza de MCAO leve y amenaza de MCAO grave; La **figura 7** representa niveles de SBDP120 en LCF y suero tras placebo, amenaza de MCAO leve y amenaza de MCAO grave; La **figura 8** representa el ascenso de MAP2 en LCF y suero tras placebo, amenaza de MCAO leve y amenaza de MCAO grave; En la **figura 9**, se muestran gráficos de barras de GFAP y otros biomarcadores para control humano y sujetos con TCE grave a partir de muestras de LCF; En la **figura 10**, se muestran gráficos de barras de GFAP y otros biomarcadores para control humano y sujetos con TCE grave de la figura 1 a partir de muestras de suero; En la **figura 11**, se muestran gráficos de barras de GFAP y otros biomarcadores para control humano y sujetos con TCE grave que resumen los datos de las figuras 9 y 10; En la **figura 12**, se muestran gráficos de presión sanguínea arterial (MABP), presión intracraneal (ICP) y presión de perfusión cerebral (CPP) para un único sujeto humano de traumatismo craneoencefálico en función de tiempo; En la **figura 13**, se muestran gráficos de biomarcadores de la invención a partir de muestras de LCF y suero procedentes del único sujeto humano de traumatismo craneoencefálico de la figura 12 en función del tiempo;

En la **figura 14**, se muestran gráficos de biomarcadores de la invención a partir de muestras de LCF y suero procedentes de otro sujeto humano individual de traumatismo craneoencefálico en función del tiempo;

En la **figura 15**, se muestran gráficos de cantidades de UCH-L1 que están presentes en LCF y suero tras traumatismo craneoencefálico grave en un sujeto ratón;

5 En la **figura 16**, se muestran gráficos de barras de concentración de GFAP para controles, así como individuos en la cohorte de traumatismo craneoencefálico leve/moderado en función de resultados de tomografía computarizada después del ingreso y 24 h a partir de ese momento;

En la **figura 17**, se muestran gráficos de barras de ensayos paralelos para el biomarcador UCH-L1 a partir de las muestras utilizadas para la figura 16;

10 En la **figura 18**, se representan gráficos de barras que muestran la concentración de UCH-L1 y GFAP, así como un biomarcador no seleccionado para el diagnóstico de estado neurológico, S100 beta, proporcionado en función de la magnitud de la lesión entre control, traumatismo craneoencefálico leve y moderado;

En la **figura 19**, se representan gráficos de barras que muestran la concentración de los mismos marcadores según se representa en la figura 18 con respecto a pruebas iniciales tras el ingreso en el hospital en comparación con lesiones en tomografías computarizadas;

15 La **figura 20** representa niveles de biomarcadores en sujetos humanos con diversos tipos de traumatismo craneal;

En la **figura 21**, se muestran gráficos que representan la curva ROC de UCH-L1, GFAP y SBDP145 en LCF humano (TCE grave frente a Control A) las primeras 24 horas después de la lesión;

20 En la **figura 22**, se muestra un gráfico que representa la curva ROC de UCH-L1 y GFAP en LCF humano (TCE leve frente a controles normales) una media de 3 h 35' con un rango de 15'-14 h 35 después de la lesión.

En la **figura 23**, se muestran gráficos de barras que representan el ascenso de biomarcadores de traumatismo craneal (GFAP, UCH-L1 y MAP2) en plasma de pacientes con apoplejía.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

[0013] La presente invención es útil en el diagnóstico y la gestión de estado neurológico anormal, donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía. Mediante la medición de un biomarcador, tal como GFAP, de un sujeto en combinación con valores obtenidos para un biomarcador neuroactivo adicional, se proporciona una determinación de estado neurológico del sujeto con mayor especificidad que la que podía alcanzarse previamente. La presente descripción se dirige a un primer biomarcador de GFAP. Se aprecia que la invención abarca otros varios biomarcadores adicionales incluidos, de manera ilustrativa, UCH-L1, NSE, MAP2 y SBDP, donde al menos un biomarcador adicional es UCH-L1. De manera sorprendente, mediante la combinación de la detección de más de un biomarcador, se alcanza un resultado sinérgico. De manera ilustrativa, la combinación de la detección de dos biomarcadores neuroactivos, tal como UCH-L1 y GFAP proporciona una detección sensible que es, de manera inesperada, capaz de discernir el nivel y la gravedad de un estado neurológico anormal en un sujeto.

[0014] La presente invención posibilita la detección de un estado neurológico en un sujeto, donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es proporcionar un medio para detectar o diagnosticar un estado neurológico anormal en un sujeto.

40 **[0015]** La presente invención también da a conocer un ensayo para la detección o el diagnóstico del estado neurológico de un sujeto.

[0016] A efectos de la presente invención en virtud del acuerdo, el traumatismo craneal se divide en dos niveles: traumatismo craneoencefálico leve (TCEL) y traumatismo craneoencefálico (TCE). En la presente memoria, también se hace referencia a un nivel intermedio de TCE moderado. También se hace referencia al espectro entre TCEL y que se extiende a través de TCE moderado, de manera sinónima, como TCE leve a moderado o con la abreviatura TCELM. TCE se define como una lesión que se relaciona con un aumento del doble o superior o un descenso del doble o superior en niveles o actividades de marcador molecular. TCEL se define como una lesión que se relaciona con menos de un aumento del doble o un descenso del doble en niveles o actividades de marcador molecular.

50 **[0017]** Un proceso de la invención incluye, preferiblemente, determinar el estado neurológico de un sujeto mediante el análisis de una muestra derivada de un sujeto en un primer momento para la presencia de un primer biomarcador. Un biomarcador es una célula, proteína, ácido nucleico, esteroide, ácido graso, metabolito u otro diferenciador útil para medir la actividad o respuesta biológica. Biomarcadores operables en el presente documento incluyen, de manera ilustrativa: esterasa carboxi-terminal de ubiquitina, hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina, producto(s) de ruptura de espectrina, una proteína intracelular localizada en las neuronas, MAP-tau, C-tau, MAP2, poli ADP ribosa polimerasa (PARP), proteína mediadora de respuesta a colapsina, anexina A11, familia de las aldehído deshidrogenasas 7, colifina 1, prolifina 1, α -enolasa (enolasa no neutral), proteína enolasa 1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa 1, aconitasa 2, acetil-CoA sintetasa 2, proteína neuronal 22, fosfoglicerato quinasa 2, fosfoglicerato quinasa 1, Hsc70-ps1, glutamato deshidrogenasa 1, aldolasa A, aldolasa C, fructosa-bisfosfato, dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1, proteína asociada a microtúbulo 2,

anhidrasa carbónica, factor 3 de ADP-ribosilación, transferrina, proteína relacionada con la regeneración del hígado, cadena α de hemoglobina, cadena β de hemoglobina, proteína relacionada con la regeneración del hígado, fetuína β , 3 oxoácido CoA transferasa, malato deshidrogenasa 1, NAD (soluble), lactato deshidrogenasa B, malato deshidrogenasa, precursor E1 de carboxilesterasa, inhibidor de serina proteasa α 1, haptoglobina, hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina L1, inhibidor de serina proteasa 2a, T-quininógeno, prepéptido de proteína de fase aguda mayor α 1, homólogo de murinoglobulina 1, proteína de componente específico de grupo, inhibidor de la disociación guanosin difosfato 1, proteína mediadora de respuesta a colapsina 2, homólogo de murinoglobulina 1, ferroxidasa, ceruloplasmina, cadena α de espectrina, cerebro, proteína C-reactiva, creatina quinasa cerebral, subunidad α tipo-7 de proteosoma, proteína 14-3-3, sinaptotagmina, subtipos de los mismos, fragmentos de los mismos, productos de ruptura de los mismos o combinaciones de los mismos. Otros posibles biomarcadores incluyen, de manera ilustrativa, los identificados por Kobeissy, FH, *et al*, Molecular & Cellular Proteomics, 2006; 5:1887-1898, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia, u otros conocidos en la técnica.

[0018] Un primer biomarcador es un biomarcador neuroactivo GFAP. Ejemplos ilustrativos de biomarcadores neuroactivos incluyen GFAP, esterasa carboxi-terminal de ubiquitina L1 (UCH-L1), enolasa neuroespecífica (NSE, por sus siglas en inglés), productos de ruptura de espectrina (SBDP, por sus siglas en inglés), preferiblemente SBDP150, SBDP150i SBDP145, SBDP120, proteína S100 ligadora de calcio B (S100b), proteínas asociadas a microtúbulo (MAP, por sus siglas en inglés), preferiblemente MAP2, MAP1, MAP3, MAP4, MAP5, proteína básica de la mielina (MBP, por sus siglas en inglés), Tau, proteína de neurofilamentos (NF), receptor cannabinoide (CB), proteínas CAM, proteína sináptica, proteínas mediadoras de respuesta a colapsina (CRMP, por sus siglas en inglés), óxido nítrico sintasa inducible (ONSi), proteína de núcleos neuronales (NeuN, por sus siglas en inglés), 2',3'-nucleótido cíclico-3'-fosfodiesterasa (CNPasa), neuroserpina, alfa-internexina, cadena ligera 3 de la proteína asociada a los microtúbulos 1 (LC3), neurofascina, los transportadores de glutamato (EAAT, por sus siglas en inglés), nestina, cortina-1,2' y BIII-Tubulina.

[0019] El proceso de la invención también incluye analizar la muestra para al menos un biomarcador neuroactivo adicional, donde dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional es UCH-L1. Cualquiera de los biomarcadores de la invención mencionados anteriormente puede operar como biomarcador neuroactivo adicional. Cualquier cantidad de biomarcadores puede detectarse, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. La detección puede ser simultánea o secuencial y puede ser de la misma muestra biológica o de múltiples muestras del mismo o de distintos sujetos. Preferiblemente, la detección de múltiples biomarcadores se realiza en la misma cámara de ensayo. El proceso de la invención también incluye comparar la cantidad del primer biomarcador y la cantidad del al menos un biomarcador neuroactivo adicional con niveles normales de cada uno del primer biomarcador y el biomarcador neuroactivo adicional para determinar el estado neurológico del sujeto.

[0020] En un modo de realización preferido un biomarcador es GFAP. GFAP se asocia con células gliales, tales como astrocitos. Preferiblemente, un biomarcador neuroactivo adicional se asocia con la salud de un tipo diferente de célula asociada con la función neuronal. Por ejemplo, CNPasa se encuentra en la mielina del sistema nervioso central y NSE se encuentra, principalmente, en las neuronas. Más preferiblemente, el otro tipo de célula es un axón, neurona o dendrita.

[0021] En otro modo de realización preferido, especialmente para TCEL y TCELM, es UCH-L1 en combinación con otros biomarcadores, tales como GFAP y MAP2.

[0022] Sin embargo, se aprecia que múltiples biomarcadores pueden ser predictores de diferentes modos o tipos de daño al mismo tipo de célula. Mediante la utilización de un ensayo de la invención que incluye biomarcadores asociados con células gliales, así como al menos otro tipo de célula neuronal, el tipo de células neuronales que se estresan o matan, así como la cuantificación de los resultados del estado neurológico, posibilita un diagnóstico rápido y sólido del tipo de traumatismo craneoencefálico. La medición de GFAP junto con al menos un biomarcador neuroactivo adicional y la comparación de la cantidad de GFAP y el biomarcador adicional con niveles normales de los marcadores posibilita una determinación del estado neurológico del sujeto.

[0023] Preferiblemente, los niveles de biomarcador específico que, cuando se miden conjuntamente con GFAP, permiten una mejor valoración del estado neurológico del sujeto, incluyen SBDP 150, SBDP150i, una combinación de SBDP145 (necrosis neuronal aguda mediada por calpaína) y SBDP120 (apoptosis neuronal retrasada mediada por caspasa), UCH-L1 (marcador de daño de cuerpo celular neuronal) y MAP2. Cabe señalar que esto tiene un valor particular en la medición de TCELM y en la selección de medicamentos candidatos u otros compuestos que causan estrés a células neuronales con cultivos celulares.

[0024] Una muestra es preferiblemente una muestra biológica. Ejemplos preferidos de muestras biológicas son, de forma ilustrativa: células, tejidos, líquido cefalorraquídeo (LCF), LCF artificial, sangre entera, suero, plasma, fluido citosólico, orina, heces, fluidos estomacales, fluidos digestivos, saliva, fluido nasal o de otra vía respiratoria, fluidos vaginales, semen, solución salina tamponada, solución salina, agua u otro fluido biológico identificado en la técnica. Más preferiblemente, una muestra biológica es LCF o suero sanguíneo. Se aprecia que

dos o más muestras biológicas distintas se analizan de manera optativa para elucidar el estado neurológico del sujeto.

5 **[0025]** Además de la expresión celular aumentada, los biomarcadores también aparecen en fluidos biológicos en comunicación con células dañadas. La obtención de fluidos biológicos, tales como líquido cefalorraquídeo (LCF), sangre, plasma, suero, saliva y orina de un sujeto es normalmente mucho menos invasiva y traumatizante que la obtención de una muestra para biopsia de tejido sólido. Por lo tanto, se prefieren las muestras que son fluidos biológicos para su utilización en la invención. LCF, en particular, se prefiere para la detección de daño neurológico en un sujeto, puesto que se encuentra en contacto inmediato con el sistema nervioso y se puede obtener fácilmente. El suero es una muestra biológica preferida, puesto que puede obtenerse fácilmente y
10 presenta mucho menos riesgo de daño adicional o efectos secundarios para un sujeto donante.

15 **[0026]** Para proporcionar correlaciones entre estado neurológico y cantidades medidas de GFAP y otros biomarcadores neuroactivos, se recogen muestras de LCF o suero de sujetos, sometiéndose las muestras a medición de GFAP, así como de otros biomarcadores neuroactivos. Los sujetos varían de estado neurológico. A continuación, se relacionan de manera optativa niveles detectados de GFAP y otros biomarcadores neuroactivos con resultados de tomografía computarizada, así como de puntuación de escala de coma de Glasgow (GCS, por sus siglas en inglés). A partir de estos resultados, se desarrolla y valida un ensayo de la invención (Lee *et al.*, *Pharmacological Research* 23:312-328, 2006). Se aprecia que GFAP y otros biomarcadores neuroactivos, además de obtenerse a partir de LCF y suero, también se obtienen fácilmente a partir de sangre, plasma, saliva, orina, así como de biopsia de tejido sólido. Mientras que LCF es un fluido de muestra preferido debido al
20 contacto directo con el sistema nervioso, se aprecia que otros fluidos biológicos presentan ventajas al tomarse muestras de los mismos para otros fines y, por lo tanto, permiten la determinación de la invención de estado neurológico como parte de una serie de pruebas realizadas en una muestra única, tal como sangre, plasma, suero, saliva u orina.

25 **[0027]** Una muestra biológica se obtiene de un sujeto mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, LCF se obtiene, preferiblemente, mediante punción lumbar. La sangre se obtiene, preferiblemente, mediante venopunción, mientras que el plasma y el suero se obtienen mediante el fraccionamiento de la sangre entera de acuerdo con métodos conocidos. En la técnica, se conocen técnicas quirúrgicas para la obtención de muestras de tejido sólido. Por ejemplo, en textos de neurocirugía estándar, tales como *Atlas of Neurosurgery: Basic Approaches to Cranial and Vascular Procedures*, de F. Meyer, Churchill Livingstone, 1999; *Stereotactic and Image Directed Surgery of Brain Tumors*, 1ª ed., de David G. T. Thomas, WB Saunders Co., 1993; y *Cranial Microsurgery: Approaches and Techniques*, de L. N. Sekhar y E. De Oliveira, 1ª ed., Thieme Medical Publishing, 1999, se describen métodos para la obtención de una muestra de tejido del sistema nervioso. En Belay *et al.*, *Arch. Neurol.* 58: 1673-1678 (2001); y Seijo *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 38: 3892-3895 (2000), también se describen
30 métodos para obtener y analizar tejido cerebral.

35 **[0028]** Después de la lesión, las células nerviosas en cultivo *in vitro* o *in situ* en un sujeto expresan niveles o actividades alterados de una o más proteínas que los que expresan dichas células no sometidas a la lesión. Por consiguiente, las muestras que contienen células nerviosas, por ejemplo, una biopsia de un tejido del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico son, de forma ilustrativa, muestras biológicas adecuadas para su utilización en la invención. Además de las células nerviosas, sin embargo, otras células expresan, de manera ilustrativa, espectrina all, incluyendo, por ejemplo, cardiomiocitos, miocitos en músculos esqueléticos, hepatocitos, células renales y células en testículos. Una muestra biológica que incluye dichas células o fluido secretados por estas células también podrían utilizarse en una adaptación de los métodos de la invención para
40 determinar y/o caracterizar una lesión de dichas células no nerviosas.

45 **[0029]** Un sujeto incluye, de forma ilustrativa, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pollo, un primate no humano, un humano, una rata y un ratón. Los sujetos que más se benefician de la presente invención son los que se sospecha que presentan condiciones neurológicas anormales o que están en riesgo de desarrollarlas, tales como víctimas de traumatismo craneal provocado por lesiones traumáticas (p. ej., heridas de bala, accidentes de automóvil, accidentes deportivos, síndrome del niño sacudido), eventos isquémicos (p. ej., apoplejía, hemorragia cerebral, parada cardíaca), trastornos neurodegenerativos (tales como enfermedad de Alzheimer, de Huntington y Parkinson; enfermedad relacionada con los priones; otras formas de demencia), epilepsia, abuso de sustancias (p. ej., de anfetaminas, éxtasis/MDMA o etanol) y patologías del sistema nervioso periférico, tales como neuropatía diabética, neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático.
50

55 **[0030]** Niveles básicos de diversos biomarcadores son los niveles obtenidos en la muestra biológica objetivo en la especie de sujeto deseado en ausencia de un estado neurológico conocido. Estos niveles no han de expresarse en concentraciones duras, pero en su lugar deben conocerse a partir de experimentos de control paralelos y expresarse en términos de unidades fluorescentes, unidades de densidad y similares. Normalmente, en ausencia de un estado neurológico, los SBDP están presentes en muestras biológicas en una cantidad insignificante. Sin embargo, UCH-L1 es una proteína muy abundante en las neuronas. La determinación de los niveles básicos de UCH-L1 en neuronas de especies particulares se conoce en profundidad en la técnica. De
60

manera similar, la determinación de la concentración de niveles básicos de MAP2, GFAP, NSE u otro biomarcador se conoce en profundidad en la técnica.

5 **[0031]** Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "diagnóstico" se refiere a identificar la presencia o ausencia de un estado neurológico u otro estado, tal como una lesión o enfermedad. Diagnóstico hace referencia, optativamente, al resultado de un ensayo en el que una proporción o nivel particular de un biomarcador se detecta o está ausente.

10 **[0032]** Tal y como se utiliza en el presente documento, una "proporción" es, bien una proporción positiva en la que el nivel del objetivo es mayor que el objetivo en una segunda muestra o en relación con un nivel básico conocido o identificado del mismo objetivo. Una proporción negativa indica que el nivel del objetivo es menor que el objetivo en una segunda muestra o en relación con un nivel básico conocido o identificado del mismo objetivo. Una proporción neutra indica que no se observan cambios en el biomarcador objetivo.

15 **[0033]** Tal y como se utiliza en el presente documento, una lesión es una alteración de la integridad, actividad, nivel, solidez, estado celular o molecular u otra alteración que sea localizable en un evento. Lesión incluye, de forma ilustrativa, un modulador físico, mecánico, químico, biológico, funcional, infeccioso o de otro tipo de las características celulares o moleculares. Un evento es, de forma ilustrativa, un traumatismo físico, tal como un impacto (percutor) o una anomalía biológica, tal como una apoplejía provocada, bien por un bloqueo o por un derrame de un vaso sanguíneo. Un evento es, optativamente, una infección causada por un agente infeccioso. Un experto en la materia identifica numerosos eventos equivalentes que están abarcados por los términos lesión o evento.

20 **[0034]** Una lesión es, optativamente, un evento físico, tal como un impacto percutor. Un impacto es del tipo de una lesión percutora, tal como provocada por un golpe en la cabeza que, bien deja intacta la estructura craneal o causa la fisura de la misma. De forma experimental, se utilizan diversos métodos de impacto de forma ilustrativa, incluido el impacto cortical controlado (CCI, por sus siglas en inglés) a una profundidad de depresión de 1,6 mm, equivalente a TCE grave en seres humanos. Este método se describe en profundidad en Cox, CD, *et al.*, J Neurotrauma, 2008; 25(11):1355-65. Se aprecia que otros métodos experimentales que producen traumatismo por impacto son operables de manera similar.

25 **[0035]** El TCE también puede ser provocado por apoplejía. El ataque isquémico se modela, optativamente, mediante oclusión de arteria cerebral media (MCAO, por sus siglas en inglés) en roedores. Los niveles de proteína UCH-L1, por ejemplo, aumentan después de MCAO leve, que aumenta aún más después de amenaza de MCAO grave. La amenaza de MCAO leve puede dar lugar a un aumento del nivel de proteína en dos horas, que es transitorio, y vuelve a nivel de control en 24 horas. Por el contrario, la amenaza de MCAO grave da lugar a un aumento del nivel de proteína dos horas después de la lesión y puede ser mucho más persistente, mostrando un nivel estadísticamente considerable hasta 72 horas o más.

30 **[0036]** Un proceso ilustrativo para detectar la presencia o ausencia de GFAP y uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto, tal como un humano, poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el marcador que se está analizando, incluyendo de forma ilustrativa un anticuerpo o aptámero y analizar la unión del compuesto o agente a la muestra tras el lavado. Las muestras que presentan específicamente un compuesto o agente unido expresan el marcador que se está analizando.

35 **[0037]** Un proceso de la invención puede utilizarse para detectar GFAP y uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. La cantidad de GFAP y uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales en una muestra se compara con controles adecuados, tal como una primera muestra que se conoce que expresa niveles detectables del marcador que se está analizando (control positivo) y una segunda muestra que se sabe que no expresa niveles detectables del marcador que se está analizando (un control negativo). Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un marcador incluyen, de forma ilustrativa, ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo, radioensayo, técnica de Western Blot, técnica de Southern, técnica de Northern, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, espectrometría de masas, RT-PCR, PCR, cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos de alta resolución, ensayo de actividad enzimática, ensayo celular, tomografía de emisión de positrones, espectroscopia de masas, combinaciones de los mismos u otra técnica conocida en la técnica. Asimismo, las técnicas *in vivo* para la detección de un marcador incluyen la introducción de un agente marcado que se une específicamente al marcador en una muestra biológica o sujeto de prueba. Por ejemplo, el agente puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en una muestra biológica o sujeto de prueba puede detectarse mediante técnicas de imágenes estándar. Optativamente, el agente aglutinante específicamente de primer biomarcador y el agente de unión específica a al menos un biomarcador neuroactivo adicional, se unen ambos a un sustrato. Se aprecia que un ensayo de unión de agente se forma fácilmente uniéndose los agentes con superposición espacial, produciéndose la detección por medio de una detección claramente diferente para el primer biomarcador y cada uno de al menos un biomarcador neuroactivo adicional. Una cuantificación basada en la

intensidad de color de cada uno de los biomarcadores unidos con superposición espacial es representativa de dichas técnicas.

[0038] Cualquier molécula adecuada que pueda específicamente unirse a GFAP y cualquier molécula adecuada que se una específicamente a uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales es operativa en la invención para alcanzar un ensayo sinérgico. Un agente preferido para la detección de GFAP o el uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales es un anticuerpo capaz de unirse al biomarcador que se está analizando. Preferiblemente, un anticuerpo se conjuga con una marca detectable. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Puede utilizarse un anticuerpo intacto, un fragmento del mismo (p. ej., Fab o F(ab')₂) o una variante alterada artificialmente del mismo (p. ej., sFv). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier tipo de inmunoglobulina, incluida IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subtipo de las mismas. En el mercado, hay anticuerpos para numerosos biomarcadores de la invención conocidos por los expertos en la materia. De forma ilustrativa, los anticuerpos dirigidos a biomarcadores de la invención están disponibles a partir de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California). Ejemplos de anticuerpos operativos en el presente documento para detectar un primer biomarcador incluyen anticuerpo anti-GFAP, anticuerpo anti-UCH-L1, anticuerpo anti-NSE, anticuerpo anti-MAP2 o un anticuerpo anti-SBDP. Otros biomarcadores que se han de fijar como objetivo como parte de un ensayo de la invención distintos del primer biomarcador incluyen GFAP, NSE, SBDP, SBDP150, SBDP145, SBDP120, S100b, MAP2, MAP1, MAP3, MAP4, MAP5, MBP, Tau, proteína de neurofilamentos (NF), receptor cannabinoide CB, CAM, proteína sináptica, CRMP, ONSi, NeuN, CSPasa, neuroserpina, alfa-internxina, LC3, neurofascina, EAAT, nestina, cortina-1 o BIII-Tubulina.

[0039] Un anticuerpo se marca optativamente. Un experto en la materia identifica numerosas marcas operables en el presente documento. En el mercado hay marcas y kits para marcado disponibles optativamente a partir de Invitrogen Corp, Carlsbad, California. Las marcas incluyen, de forma ilustrativa, marcas fluorescentes, biotina, peroxidasa, radionucleótidos u otro tipo de marca conocida en la técnica. De forma alternativa, una especie de detección de otro anticuerpo u otro compuesto conocido en la técnica se utiliza como detección de formas de un biomarcador unido por un anticuerpo.

[0040] Se prefieren ensayos basados en anticuerpos para analizar una muestra biológica para la presencia de GFAP y uno o más biomarcadores neuroactivos. A continuación, en la sección de ejemplos, se describen métodos de técnica de Western Blot adecuados. Para una análisis más rápido (que puede ser importante en situaciones de emergencia médica), pueden utilizarse ensayos inmunoabsorbentes (p. ej., ELISA y RIA) y ensayos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, la muestra biológica o una parte de la misma se inmoviliza sobre un sustrato, tal como una membrana hecha de nitrocelulosa o PVDF; o un sustrato rígido hecho de poliestireno u otro polímero plástico, tal como una placa de microtitulación y se pone el sustrato en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a GFAP o uno de los otros biomarcadores neuroactivos en condiciones que permiten la unión del anticuerpo al biomarcador que se está analizando. Después del lavado, la presencia del anticuerpo sobre el sustrato indica que la muestra contenía el marcador que se está analizando. Si el anticuerpo se conjuga directamente con una marca detectable, tal como una enzima, fluoróforo o radioisótopo, la presencia de la marca se detecta optativamente mediante el análisis del sustrato para la marca detectable. De forma alternativa, se añade al sustrato un anticuerpo secundario marcado de forma detectable que se une al anticuerpo específico de marcador. La presencia de marca detectable sobre el sustrato después del lavado indica que la muestra contenía el marcador.

[0041] Numerosas modificaciones de estos inmunoensayos básicos también son operativas en la invención. Estas incluyen el anticuerpo específico de biomarcador, en lugar de la muestra inmovilizada sobre un sustrato, y el sustrato se pone en contacto con GFAP u otro biomarcador neuroactivo conjugado con una marca detectable en condiciones que provocan la unión del anticuerpo al marcador marcado. A continuación, se pone en contacto el sustrato con una muestra en condiciones que permiten la unión del marcador que se está analizando al anticuerpo. Una reducción de la cantidad de marca detectable sobre el sustrato después del lavado indica que la muestra contenía el marcador.

[0042] Si bien se prefiere la utilización de anticuerpos en la invención debido a su caracterización amplia, cualquier otro agente adecuado (p. ej., un péptido, un aptámero o una molécula orgánica pequeña) que se une específicamente a GFAP u otro biomarcador neuroactivo, se utiliza optativamente en lugar del anticuerpo de los inmunoensayos descritos anteriormente. Por ejemplo, puede utilizarse un aptámero que se une específicamente a espectrina all y/o uno o más de sus SBDP. Los aptámeros son moléculas basadas en ácido nucleico que se unen a ligandos específicos. Se conocen métodos para la elaboración de aptámeros con una especificidad de unión particular, tal y como se describe en los documentos de patente estadounidense n.º 5,475,096; 5,670,637; 5,696,249; 5,270,163; 5,707,796; 5,595,877; 5,660,985; 5,567,588; 5,683,867; 5,637,459; y 6,011,020.

[0043] En la técnica, se conoce una infinidad de marcas detectables que son operativas en un ensayo diagnóstico para expresión de biomarcadores. Los agentes utilizados en métodos para detectar GFAP u otro biomarcador neuroactivo se conjugan con una marca detectable, por ejemplo, una enzima como peroxidasa de rábano. Los agentes marcados con peroxidasa de rábano pueden detectarse mediante la adición de un sustrato adecuado que produce un cambio de color en presencia de peroxidasa de rábano. Otras varias marcas

detectables que pueden utilizarse son conocidas. Ejemplos habituales de estas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, compuestos fluorescentes, compuestos luminiscentes, oro coloidal, partículas magnéticas, biotina, radioisótopos y otras enzimas. Se aprecia que un sistema de anticuerpo primario/secundario se utiliza optativamente para detectar uno o más biomarcadores. Un anticuerpo primario que identifica específicamente uno o más biomarcadores es expuesto a una muestra biológica que puede contener el biomarcador de interés. Un anticuerpo secundario con una marca adecuada que identifica la especie o isótopo del anticuerpo primario se pone, a continuación, en contacto con la muestra de manera que se alcance la detección específica del uno o más biomarcadores en la muestra.

[0044] La presente invención utiliza una etapa de relacionar la presencia o cantidad de GFAP solamente, o con uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales en una muestra biológica con la gravedad y/o tipo lesión de células nerviosas. En el presente documento, se demuestra que la medición de GFAP solamente es muy eficaz en la detección de TCELM. La cantidad de GFAP y uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales en la muestra biológica se asocia con un estado neurológico, tal como traumatismo craneoencefálico, según se describe en los ejemplos. Los resultados de un ensayo de la invención para medir de forma sinérgica GFAP y uno o más biomarcadores neuroactivos adicionales pueden ayudar a un médico o veterinario a determinar el tipo y la gravedad de lesión con consecuencias en relación con los tipos de células que se han puesto en riesgo. Estos resultados están en consonancia con resultados de tomografía computarizada y GCS, pero son cuantitativos, se obtienen más rápidamente y a un coste mucho menor.

[0045] La presente invención da a conocer una etapa de comparar la cantidad de GFAP y la cantidad de al menos otro biomarcador neuroactivo con niveles normales para determinar el estado neurológico del sujeto. Se aprecia que la selección de biomarcadores adicionales permite identificar los tipos de células implicadas en un estado neurológico anormal, así como la naturaleza de la muerte celular en el caso de un marcador de lesión axonal, a saber un SBDP. La práctica de un proceso de la invención proporciona una prueba que puede ayudar a un médico a determinar una terapéutica adecuada para gestionar el beneficio óptimo del sujeto. Mientras que los datos suministrados en los ejemplos del presente documento se proporcionan con respecto a un espectro completo de traumatismo craneoencefálico, se aprecia que estos resultados pueden aplicarse a eventos isquémicos, trastornos neurodegenerativos, enfermedad relacionada con los priones, epilepsia, etiología química y patologías del sistema nervioso periférico. Como se muestra en los datos de ejemplo proporcionados a continuación, se observa inesperadamente una diferencia de género en un estado neurológico anormal de un sujeto.

[0046] También se proporciona un ensayo para analizar el daño celular en un sujeto o un cultivo celular aislado del mismo. El ensayo incluye: (a) un sustrato para mantener una muestra aislada de un sujeto que se sospecha que presenta una célula nerviosa dañada, siendo la muestra un fluido en comunicación con el sistema nervioso del sujeto antes de aislarse del sujeto; (b) un agente aglutinante específico de GFAP; (c) un agente aglutinante específico para otro biomarcador neuroactivo, donde dicho otro biomarcador neuroactivo es UCH-L1 y (d) instrucciones impresas para realizar el ensayo de forma ilustrativa para hacer reaccionar: el agente aglutinante específico con la muestra biológica o una parte de la muestra biológica para detectar la presencia o cantidad de biomarcador, y el agente específico para otro biomarcador neuroactivo con la muestra biológica o una parte de la muestra biológica para detectar la presencia o cantidad del al menos un biomarcador en la muestra biológica. El ensayo de la invención puede utilizarse para detectar un estado neurológico para remuneración económica.

[0047] El ensayo incluye, de manera optativa, una marca detectable, tal como una conjugada con el agente o una conjugada con una sustancia que se une específicamente al agente, tal como un anticuerpo secundario.

[0048] Un proceso de la invención incluye, de forma ilustrativa, diagnosticar un estado neurológico en un sujeto, donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía. La muestra biológica se analiza mediante mecanismos conocidos en la técnica para detectar o identificar la presencia de uno o más biomarcadores presentes en la muestra biológica. A partir de la cantidad o presencia de un biomarcador objetivo en una muestra biológica, se calcula de forma optativa una proporción de uno o más biomarcadores. La proporción es, de manera optativa, el nivel de uno o más biomarcadores en relación con el nivel de otro biomarcador en la misma muestra o en una paralela, o la proporción de la cantidad del biomarcador en relación con un nivel básico medido o establecido previamente del mismo biomarcador en un sujeto que se sabe que está libre de un estado neurológico patológico. La proporción permite el diagnóstico de un estado neurológico en el sujeto. Un proceso de la invención también administra de forma optativa una terapéutica al sujeto que alterará directa o indirectamente la proporción de uno o más biomarcadores.

[0049] También se describe un proceso para diagnosticar y, de forma optativa, tratar una lesión multiorgánica. Múltiples órganos incluyen, de forma ilustrativa, subconjuntos de tejido neurológico, tales como el cerebro, la médula espinal y similares, o regiones específicas del cerebro, tales como el córtex, el hipocampo y similares. Múltiples lesiones incluyen, de forma ilustrativa, la muerte celular apoptótica, que puede detectarse mediante la presencia de SBDP inducidos por caspasa, y la muerte celular oncótica, que puede detectarse mediante la presencia de SBDP inducidos por calpaína. El proceso de la invención incluye, de forma ilustrativa, analizar para una pluralidad de biomarcadores en una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto en el que la muestra

biológica estaba, de manera optativa, en contacto de fluido con un órgano que se sospecha que ha sufrido una lesión u órgano control cuando se obtuvo la muestra biológica del sujeto. El proceso de la invención determina un primer subtipo de lesión orgánica a partir de una primera proporción de una pluralidad de biomarcadores. El proceso de la invención también determina un segundo subtipo de una segunda lesión orgánica a partir de una

5 segunda proporción de la pluralidad de biomarcadores en la muestra biológica. Las proporciones se determinan, de forma ilustrativa, mediante procesos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

[0050] La invención en virtud del acuerdo incluye de forma ilustrativa una composición para distinguir la magnitud de un estado neurológico en un sujeto. Una composición de la invención es, bien una entidad de agente o una mezcla de diversos agentes. En un modo de realización preferido una composición es una mezcla. La mezcla

10 contiene, de manera optativa, una muestra biológica derivada de un sujeto. Se sospecha que el sujeto, de manera optativa, presenta un estado neurológico. La muestra biológica en comunicación con el sistema nervioso del sujeto antes de aislarse del sujeto. En una composición de la invención también contiene al menos dos agentes primarios, preferiblemente anticuerpos, que se unen, específica e independientemente, a al menos dos biomarcadores que pueden estar presentes en la muestra biológica. En un modo de realización preferido, el

15 primer agente primario es un anticuerpo que se une específicamente a GFAP. Un segundo agente primario es, preferiblemente, un anticuerpo que se une específicamente a una hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina, preferiblemente UCH-L1 o un producto de ruptura de espectrina.

[0051] Los agentes de la composición de la invención se inmovilizan de manera optativa o, de otro modo, en contacto con un sustrato. Las enseñanzas de la invención también se marcan preferiblemente con al menos una

20 marca detectable. En un modo de realización preferido, la marca detectable sobre cada agente es única e independientemente detectable, bien en la misma cámara de ensayo o en cámaras alternativas. De manera optativa, un agente secundario específico para detectar o unirse al agente primario se marca con al menos una marca detectable. En el ejemplo no limitativo, el agente primario es un anticuerpo derivado de conejo. Un agente secundario es, de manera optativa, un anticuerpo específico para un anticuerpo primario derivado de conejo. En

25 la técnica, se conocen mecanismos de detección de la unión de anticuerpo a un antígeno y un experto en la materia concibe fácilmente numerosos métodos y agentes adecuados para la detección de antígenos o biomarcadores en una muestra biológica.

[0052] La invención utiliza una etapa de relacionar la presencia o cantidad de un biomarcador en una muestra biológica con la gravedad y/o tipo de lesión de célula nerviosa (u otra célula de expresión de biomarcador). La

30 cantidad de biomarcador(es) en la muestra biológica se relaciona directamente con la gravedad de la lesión de tejido nervioso, puesto que una lesión más grave daña una cantidad mayor de células nerviosas lo que, a su vez, provoca que se acumule una cantidad mayor de biomarcador(es) en la muestra biológica (p. ej. LCF; suero). Si una lesión de célula nerviosa provoca un tipo apoptótico y/o necrótico de muerte celular también puede determinarse mediante el análisis de los SBDP presentes en la muestra biológica. La muerte celular necrótica

35 activa, preferentemente, la calpaína, mientras que la muerte celular apoptótica activa, preferentemente, la caspasa-3. Puesto que los SBDP de calpaína y caspasa-3 pueden distinguirse, la medición de estos marcadores indica el tipo de daño celular en el sujeto. Por ejemplo, la activación de la calpaína inducida por necrosis da lugar a la producción de SBDP150 y SBDP145; la activación de la caspasa-3 inducida por apoptosis da lugar a la producción de SBDP150i y SBDP120; y la activación de ambas vías da lugar a la producción de los cuatro

40 marcadores. Asimismo, el nivel o el grado cinético de UCH-L1 presente en una muestra biológica puede, de manera optativa, distinguir una lesión leve de una lesión más grave. En un ejemplo ilustrativo, MCAO grave (2 h) produce un aumento de UCH-L1 tanto en LCF como en suero en relación con una amenaza leve (30 min), mientras que ambos producen niveles de UCH-L1 que sobrepasan los de sujetos no lesionados. Asimismo, la persistencia o grado cinético de los marcadores en una muestra biológica es indicativa de la gravedad de la

45 lesión, indicando una lesión mayor el aumento de la persistencia de GFAP, UCH-L1 o SBDP en el sujeto que se mide mediante un proceso de la invención en muestras biológicas tomadas en diferentes momentos después de la lesión.

[0053] Los resultados de dicha prueba pueden ayudar a un médico a determinar si la administración de

50 terapéutica particular, tal como inhibidores de calpaína y/o caspasa o antagonistas de los receptores colinérgicos muscarínicos puede ser beneficiosa para un paciente. Este método puede ser especialmente importante en la detección de la diferencia de edad y género en un mecanismo de muerte celular.

[0054] Se aprecia que otros reactivos, tales como agua de grado de ensayo, agentes tamponadores, membranas, placas de ensayo, anticuerpos secundarios, sales y otros reactivos complementarios están

55 disponibles a partir de comerciantes conocidos por los expertos en la materia. De forma ilustrativa, las placas de ensayo están disponibles a partir de Corning, Inc. (Corning, Nueva York) y los reactivos están disponibles a partir de Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Misuri).

[0055] En el presente documento, se describen métodos que implican técnicas biológicas convencionales. Dichas técnicas se conocen generalmente en la técnica y se describen en detalle en tratados de metodología

60 tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York., 1989; y *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel

et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, ed. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991; y *Methods of Immunological Analysis*, ed. Masseyeff *et al.*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992, se describen métodos inmunológicos (p. ej., preparación de anticuerpos específicos de antígeno, inmunoprecipitación e inmunoblot).

[0056] Los ejemplos no limitativos siguientes ilustran diversos aspectos de la presente invención. Los ejemplos tienen fines ilustrativos y no constituyen una limitación de cualquier práctica de la presente invención. Se observará que pueden llevarse a cabo variaciones y modificaciones sin desviarse del espíritu y alcance de la invención. Si bien los ejemplos están destinados, por lo general, a tejido de mamíferos, específicamente, análisis de tejido de ratones, un experto en la materia reconoce que técnicas similares y otras técnicas conocidas en la técnica trasladan fácilmente los ejemplos a otros mamíferos, como los humanos. Los reactivos ilustrados en el presente documento son, normalmente, de reacción cruzada entre especies de mamíferos o los reactivos alternativos con propiedades similares están disponibles en el mercado, y un experto en la materia entiende fácilmente dónde pueden obtenerse dichos reactivos. A los expertos en la materia les resultan evidentes variaciones dentro de los conceptos de la invención.

Ejemplo 1: Materiales para análisis de biomarcadores

[0057] Reactivos ilustrativos utilizados en la realización de la invención en virtud del acuerdo incluyen bicarbonato sódico (Sigma Cat #: C-3041), tampón de bloqueo (Startingblock T20-TBS) (Pierce Cat#: 37543), solución salina tamponada con Tris con Tween 20 (TBST; Sigma Cat #: T-9039). Solución salina fosfatada (PBS; Sigma Cat #: P-3813); Tween 20 (Sigma Cat #: P5927); Ultra TMB ELISA (Pierce Cat #: 34028); y placas ELISA Nunc Maxisorp (Fisher). Los anticuerpos monoclonales y policlonales GFAP y UCH-L1 son de elaboración propia o se obtienen a partir de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California. Los anticuerpos dirigidos a espectrina α -II y productos de ruptura, así como a MAP2, están disponibles a partir de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California. Invitrogen, Corp., Carlsbad, California, dispone de marcas para anticuerpos de numerosos subtipos. Las concentraciones de proteínas en muestras biológicas se determinan mediante la utilización de ensayos de microproteínas con ácido bicinónico (Pierce Inc., Rockford, Illinois, EE. UU.) con estándares de albúmina. Todos los demás reactivos y materiales necesarios son conocidos por los expertos en la materia y se pueden establecer con facilidad.

Ejemplo 2: Desarrollo de ensayo de biomarcadores

[0058] En el laboratorio se producen anticuerpos monoclonales y anticuerpo policlonal de conejo específico de antibiomarcador. Para determinar la especificidad de reactividad de los anticuerpos para detectar un biomarcador objetivo, se analiza una cantidad conocida de biomarcador aislado o parcialmente aislado o se investiga un panel de tejido mediante técnica de Western Blot. Se utiliza un ELISA indirecto con la proteína biomarcadora recombinante unida a la placa ELISA para determinar una concentración óptima de los anticuerpos utilizados en el ensayo. Los pocillos de la microplaca se recubren con anticuerpo biomarcador antihumano policlonal de conejo. Tras determinar la concentración de anticuerpo biomarcador antihumano de conejo para una señal máxima, se determina el límite de detección inferior del ELISA indirecto para cada anticuerpo. Una muestra diluida adecuada se incuba con un anticuerpo biomarcador antihumano policlonal de conejo durante 2 horas y se lava a continuación. A continuación, se añade anticuerpo biomarcador antihumano monoclonal marcado de biotina y se incuba con biomarcador capturado. Tras lavarse a fondo, se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. Tras 1 hora de incubación y la última etapa de lavado, se deja que el conjugado restante reaccione con sustrato de tetrametilbenzotina de peróxido de hidrógeno. Se detiene la reacción mediante la adición de la solución ácida y se mide la absorbancia del producto de reacción amarillo resultante a 450 nanómetros. La absorbancia es proporcional a la concentración del biomarcador. Se forma una curva estándar mediante el trazado de valores de absorbancia como una función de concentración de biomarcador mediante la utilización de muestras calibradoras y se determinan concentraciones de muestras desconocidas mediante la utilización de la curva estándar.

Ejemplo 3: Modelo *in vivo* de modelo de lesión TCE

[0059] Se utiliza un dispositivo de impacto cortical controlado (CCI) para modelar TCE en ratas, tal y como se describe anteriormente (Pike *et al.*, 1998). Se anestesian ratas Sprague-Dawley (Harlan: Indianápolis, Indiana) macho adultas (280-300 g) con un 4 % de isoflurano en un gas portador de 1:1 O₂/N₂O (4 min) y mantenidas en un 2,5 % de isoflurano en el mismo gas portador. Se monitoriza la temperatura corporal central continuamente mediante un sondeo por par termoeléctrico rectal y se mantiene a 37±1°C mediante la colocación de una almohadilla térmica controlada de temperatura ajustable debajo de las ratas. Los animales se montan en un marco estereotáctico en una posición en decúbito abdominal y se abrochan mediante barras de oído y de incisivo. Tras una incisión craneal de línea media y reflexión de los tejidos blandos, una craneotomía (7 mm de diámetro) unilateral (ipsilateral al lugar de impacto) se lleva a cabo al lado de la sutura central, entre bregma y lambda. La duramadre se mantiene intacta en el córtex. Se produce traumatismo cerebral mediante el golpeo del córtex derecho (ipsilateral) con una punta impactadora de aluminio de 5 mm de diámetro (alojada en un cilindro

neumático) a una velocidad de 3,5 m/s con una compresión de 1,6 mm y un tiempo de permanencia de 150 ms. Los animales control lesionados con placebo se someten a procedimientos quirúrgicos idénticos, pero no reciben la lesión del impacto. Se lleva a cabo una gestión adecuada previa y posterior a la lesión para garantizar el cumplimiento de las directrices establecidas por el Comité Institucional del cuidado y uso de los animales de la Universidad de Florida y de las directrices de los Institutos Nacionales de Salud detalladas en la obra *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Además, se investiga de conformidad con la Ley de bienestar animal y otros estatutos y normativas federales relacionadas con animales y experimentos que impliquen animales y en cumplimiento con los principios establecidos en *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicación del NRC, edición de 1996."

10 **Ejemplo 4:** Modelo de lesión de oclusión de arteria cerebral media (MCAO):

15 **[0060]** Se incuban ratas con anestesia con isoflurano (5 % de isoflurano a través de cámara de inducción seguido de un 2 % de isoflurano a través de cono nasal), la arteria carótida común (ACC) derecha de la rata se expone en el nivel de bifurcación de la arteria carótida externa e interna (ACE y ACI) con una incisión en el cuello en la línea media. Se sigue rostralmente la ACI hasta la rama pterigopalatina y se liga y se corta la ACE en sus ramas linguales y mandibulares. A continuación, se introduce una sutura de nylon 3-0 en la ACI a través de una incisión en el muñón de la ACE (se monitorizó la vía de sutura visualmente a través de la pared vascular) y se hace avanzar a través del canal carótido aproximadamente 20 mm de la bifurcación carótida hasta que queda alojada en el estrechamiento de la arteria cerebral anterior bloqueando el principio de la arteria cerebral media. A continuación, se cierra la incisión dérmica y la sutura endovascular se deja en su lugar durante 30 minutos o 20 horas. Más tarde, se vuelve a anestesiarse la rata brevemente y se retrae el filamento de sutura para permitir la reperusión. Para cirugías de MCAO con placebo, se sigue el mismo procedimiento, pero se hace avanzar el filamento solamente 10 mm más allá de la bifurcación carótida interna-externa y se deja en su lugar hasta que se sacrifique la rata. Durante todos los procedimientos quirúrgicos, los animales se mantienen a 37 ± 1 °C mediante una manta eléctrica homeotérmica (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EE. UU.). Cabe destacar que, a la conclusión de cada experimento, si el cerebro de las ratas muestra evidencia patológica de hemorragia subaracnoidea después de la necropsia, se excluyen del estudio. Se lleva a cabo una gestión adecuada previa y posterior a la lesión para garantizar el cumplimiento de la totalidad de directrices sobre el cuidado y uso de los animales.

25 **Ejemplo 5:** Preparación de tejidos y muestras:

30 **[0061]** En los momentos adecuados (2, 6, 24 horas y 2, 3, 5 días) después de la lesión, se anestesian los animales y se sacrifican mediante decapitación. Los cerebros se sacan rápidamente, se enjuagan con PBS helado y se parten en dos. El hemisferio derecho (córtex cerebral alrededor del área de impacto e hipocampo) se disecciona rápidamente, se enjuaga en PBS helado, se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C hasta su utilización. Para la inmunohistoquímica, se congelan rápidamente los cerebros en suspensión de hielo seco, se cortan por medio de criostato (20 µm) sobre portaobjetos SUPERFROST PLUS GOLD® (Fisher Scientific) y, a continuación, se almacenan a -80 °C hasta su utilización. Para el hemisferio izquierdo, se recoge el mismo tejido que el lado derecho. Para la técnica de Western Blot, se pulverizan las muestras de cerebro con un mortero pequeño y se dejan sobre hielo seco hasta conseguir un polvo fino. A continuación, el tejido cerebral pulverizado se rompe durante 90 min a 4 °C en un tampón de 50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 1mM DTT, 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche Biochemicals). A continuación, se centrifugan los lisados de cerebro a 15 000 xg durante 5 min a 4 °C para limpiar y eliminar los residuos insolubles, se congelan instantáneamente y se almacenan a -80 °C hasta su utilización.

45 **[0062]** Para la electroforesis en gel y la electrotransferencia, se preparan muestras con LCF limpio (7 µl) para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) con un tampón de carga 2X que contenía 0,25 M Tris (pH 6,8), 0,2 M DTT, 8 % SDS, 0,02 % azul de bromofenol y 20 % glicerol en H₂O destilada. Se resuelven veinte microgramos (20 µg) de proteína por hilera de forma rutinaria mediante SDS-PAGE en geles 10-20 % Tris/glicina (Invitrogen, Cat #EC61352) a 130 V durante 2 horas. Tras la electroforesis, se transfieren lateralmente proteínas separadas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) en un tampón de transferencia que contiene 39 mM glicina, 48 mM Tris-HCl (pH 8,3) y un 5 % de metanol a un voltaje constante de 20 V durante 2 horas a temperatura ambiente en una unidad de transferencia semiseca (Bio-Rad). Después de la electrotransferencia, se bloquean las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en un 5 % de leche no grasa en TBS y un 0,05 % Tween-2 (TBST) y, a continuación, se incuban con el anticuerpo policlonal primario UCH-L1 en TBST con un 5 % de leche no grasa a una dilución de 1:2000, de acuerdo con lo recomendado por el fabricante a 4 °C durante la noche. A esto, le siguen tres lavados con TBST, una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario con biotina unido (Amersham, Cat # RPN1177v1) y una incubación de 30 min con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (reactivo BCIP/NBT: KPL, Cat # 50-81-08). Se analizan pesos moleculares de proteínas biomarcadoras intactas mediante la utilización de estándares de peso molecular con colores del arco iris (Amersham, Cat # RPN800V). El análisis semicuantitativo de niveles de proteínas GFAP, UCH-L1 o SBDP intactas se lleva a cabo mediante escaneo densitométrico asistido por ordenador (escáner Epson XL3500) y el análisis de imágenes con *software* ImageJ (NIH)

Ejemplo 6: UCH-L1 aumenta en LCF después de amenaza de MCAO.

[0063] Se somete a los sujetos a amenaza de MCAO y se analizan las muestras de LCF mediante técnica de Western Blot cuantitativa. La proteína UCH-L1 es fácilmente detectable después de la lesión a niveles estadísticamente considerables por encima de las cantidades de UCH-L1 en muestras tratadas con placebo (figuras 1A, B). Estos niveles de UCH-L1 aumentan temporalmente (a 6 h) tras isquemia leve (30 min MCAO) seguida de reperfusión, mientras que los niveles se mantienen entre 6 y 72 h después de una isquemia más grave (2 h MCAO) (figuras 1A, B).

Ejemplo 7: ELISA identifica fácilmente niveles de UCH-L1 tanto en LCF como en suero.

[0064] ELISA se utiliza para detectar y cuantificar más rápida y fácilmente UCH-L1 en muestras biológicas. Para un ELISA de tipo sándwich de UCH-L1 (swELISA), se recubren placas de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de anticuerpo de captura (500 ng/pocillo anti-UCH-L1 de conejo purificado, de elaboración propia mediante técnicas convencionales) en 0,1 M de bicarbonato de sodio, pH 9,2. Se incuban las placas durante la noche a 4 °C, se vacían y se añaden 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo (Startingblock T20-TBS) y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. A esto le sigue, bien la adición del estándar de antígeno (UCH-L1 recombinante) para curva estándar (0,05 - 50 ng/pocillo) o muestras (3-10 µl de LCF) en diluyente de muestra (volumen total 100 µl/pocillo). Se incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente y, a continuación, se lava con limpiador de placa automático (5 x 300 µl/pocillo con tampón de lavado, TBST). A continuación, se añade anticuerpo de detección conjugado con anti-UCH-L1-HRP de ratón (de elaboración propia, 50 µg/ml) en tampón de bloqueo a pocillos a 100 µl/pocillo y se incuba durante 1,5 h a temperatura ambiente, seguido de lavado. Si se necesita amplificación, se añade solución de biotilil tiramida (kit de amplificación Perkin Elmer Elast) durante 15 min a temperatura ambiente, se lava y, a continuación, se sigue con 100 µl/pocillo de estreptavidina-HRP (1:500) en PBS con 0,02 % Tween-20 y un 1 % ASB durante 30 min y, a continuación, se sigue con lavado. Finalmente, se desarrollan los pocillos con 100 µl/pocillo de solución de sustrato de TMB (Ultra-TMB ELISA, Pierce# 34028) con tiempos de incubación de 5-30 minutos. La señal se lee a 652 nm con un espectrofotómetro de 96 pocillos (Molecular Device Spectramax 190).

[0065] Los niveles de UCH-L1 del grupo TCE (lesión percutora) son considerablemente superiores que los controles con placebo ($p < 0,01$, análisis ANOVA) y los controles naive, según se mide mediante un swELISA que demuestra que UCH-L1 aumenta de forma temprana en LCF (2 h después de la lesión) y, a continuación, desciende alrededor de 24 h después de la lesión, antes de aumentar otra vez 48 h después de la lesión (figura 2).

[0066] Después de la amenaza de MCAO, la magnitud de UCH-L1 en LCF aumenta radicalmente con amenaza grave (2 h) en relación con una amenaza más leve (30 min). (figura 3) Los niveles de proteína UCH-L1 del grupo de MCAO más grave de 2 h son 2-5 veces superiores que el MCAO de 30 min ($p < 0,01$, análisis ANOVA). Los niveles de proteína UCH-L1 para los placebos son prácticamente indistinguibles de los controles naive.

[0067] Se obtienen resultados similares para UCH-L1 en suero. Se recoge sangre (3-4 ml) al final de cada periodo experimental directamente del corazón mediante la utilización de jeringa equipada con una aguja con un calibre 21, se coloca en un tubo de polipropileno y se deja reposar durante entre 45 min y 1 hora a temperatura ambiente para formar coágulo. Se centrifugan los tubos durante 20 min a 3 000 xg y se quita el suero y se analiza mediante ELISA (figuras 4, 5).

[0068] Los niveles de UCH-L1 del grupo TCE son considerablemente superiores que el grupo placebo ($p < 0,001$, análisis ANOVA) y para cada momento analizado 2 h a 24 h con respecto a los mismos momentos con placebo ($p < 0,005$, prueba t de Student). UCH-L1 aumenta de forma considerable después de la lesión a partir de 2 h en suero. La amenaza de MCAO grave produce un aumento de UCH-L1 en suero en relación con la amenaza leve. Tanto la amenaza leve como la grave son estadísticamente superiores que los animales tratados con placebo, lo que indica que la detección en suero de UCH-L1 es un diagnóstico sólido y los niveles son capaces de distinguir de forma suficiente una lesión leve de una grave.

Ejemplo 8: Análisis de productos de ruptura de espectrina:

[0069] Los productos de ruptura de espectrina se analizan después de la amenaza de MCAO con ratas mediante procedimientos similares a los descritos en el documento de patente estadounidense n.º 7,291,710, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia. En la figura 6, se muestra que los niveles de SBDP145 tanto en suero como en LCF aumentan considerablemente ($p < 0,05$) en todos los momentos estudiados después de amenaza de MCAO grave (2 h) en relación con amenaza leve (30 min). De manera similar, SBDP120 muestra ascensos considerables después de amenaza de MCAO grave entre 24 y 72 horas después de la lesión en LCF (figura 7). Sin embargo, los niveles de SBDP120 en suero aumentan después de amenaza grave en relación con amenaza leve en todos los momentos entre 2 y 120 horas. Tanto en LCF como en suero, la amenaza de MCAO leve y grave aumentó SPBP120 y 140 en relación con sujetos tratados con placebo.

Ejemplo 9: Análisis de MAP2:

[0070] La proteína 2 asociada a microtúbulo (MAP2) se analiza como biomarcador tanto en LCF como en suero después de amenaza de MCAO leve (30 min) y grave (2 h) en sujetos mediante ELISA o técnica de Western Blot, básicamente según se describe en el presente documento. Los anticuerpos contra MAP2 (MAP-2 (E-12)) se obtienen de Sant Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California. Estos anticuerpos son adecuados tanto para procedimientos de ELISA como de técnica de Western Blot y son de reacción cruzada con MAP2 murina y humana. Los niveles de MAP2 aumentan de forma considerable ($p < 0.05$) en sujetos después de amenaza de MCAO leve en relación con animales naive tanto en LCF como en suero (figura 8). Al igual que con UCH-L1 y SBDP, la amenaza grave (2 h) produce niveles mucho mayores de MAP2 en ambas muestras que la amenaza leve (30 min).

Ejemplo 10: Estudio de traumatismo craneoencefálico grave

[0071] Se llevó a cabo un estudio que incluía 46 seres humanos con traumatismo craneoencefálico grave. Cada uno de estos sujetos se caracteriza por tener más de 18 años, presentar un GCS inferior o igual a 8 y requerir ventriculostomía y neuromonitorización como parte del cuidado rutinario. Un grupo de control A, también denominado controles LCF, incluía 10 individuos, también de 18 años o mayores y sin lesiones. Se obtienen muestras durante la anestesia espinal para procedimientos quirúrgicos rutinarios o para el acceso a LCF asociado al tratamiento de hidrocefalia o meningitis. Un grupo de control B, también denominado controles normales, ascendía a 64 individuos, cada uno de 18 años o mayor y con múltiples lesiones sin traumatismo craneal. En la tabla 1, se proporcionan más datos con respecto a las estadísticas demográficas del estudio.

Tabla 1. Estadísticas demográficas de sujetos para el estudio de traumatismo craneoencefálico grave

		TCE	Controles LCF	Controles normales
<u>Número</u>		46	10	64
	Varones	34 (73,9 %)	29 (65,9 %)	26 (40,6 %)
	Mujeres	12 (26,1 %)	15 (34,1 %)	38 (59,4 %)
<u>Edad:</u>	Media	50,2	58,2 1,2	30,09 2,3
	Desv. est.	19,54	20,52	15,42
	Mínimo	19	23	18
	Máximo	88	82	74
<u>Raza:</u>	Caucásica			
	Negra	45	38 (86,4 %)	52 (81,2 %)
	Asiática	1	6 (13,6)	4 (6,3 %)
	Otra			7 (10,9 %)
				1 (1,6 %)
<u>GCS en urgencias</u>				
	Media		5,3	
	Desv. est.		1,9	

[0072] El nivel de biomarcadores encontrado en las primeras muestras de LCF y suero disponibles obtenidas en el estudio se proporciona en las figuras 9 y 10, respectivamente. La media de la primera muestra de LCF recogida, según se muestra en la figura 9, era 11,2 horas, mientras que el tiempo medio para la recogida de una muestra de suero posterior al evento de lesión, según la figura 10, es 10,1 horas. La cantidad de cada uno de los biomarcadores de UCH-L1, MAP2, SBDP145, SBDP120 y GFAP se proporciona para cada muestra para la cohorte de pacientes con traumatismo craneoencefálico en comparación con un grupo de control. La utilidad del diagnóstico de los diversos biomarcadores en las primeras 12 horas posteriores a la lesión, basado en una compilación de datos de LCF y suero, se proporciona en la figura 11 e indica, en particular, el valor de GFAP, así como el de marcadores adicionales UCH-L1 y los productos de ruptura de espectrina. Niveles elevados de UCH-

L1 son indicativos del riesgo del daño de cuerpo celular neuronal, mientras que un aumento de SPDP145 con un descenso correspondiente de SBDP120 sugiere necrosis axonal aguda.

5 **[0073]** Un sujeto de la cohorte de traumatismo craneoencefálico era una mujer caucásica de 52 años que había sufrido un accidente de motocicleta sin llevar puesto el casco. Después de su ingreso en urgencias, su GCS era de 3 y durante las primeras 24 horas posteriores al traumatismo, su mejor GCS era de 8. Después de 10 días, su GCS era de 11. La tomografía computarizada reveló hemorragia subaracnoidea y fracturas faciales con una puntuación de Marshall de 11 y una puntuación de Rotterdam de 2. La ventriculostomía se quitó a los 5 años y se obtuvo un resultado global bueno. En la figura 12, se muestra la presión sanguínea arterial (MABP), la presión intracraneal (ICP) y la presión de perfusión cerebral (CPP) para este paciente de traumatismo craneoencefálico
10 en función del tiempo. Se observa una posible lesión secundaria aproximadamente 40 horas después de la lesión, tal y como indica un descenso en MABP y CPP. Los cambios en la concentración de biomarcadores de la invención para muestras de LCF y suero de este individuo se detallan en la figura 13. Estos resultados incluyen un aumento pronunciado de GFAP tanto en LCF como en suero, así como los cambios en los otros biomarcadores mostrados en la figura 13 y proporcionan información clínica importante sobre la naturaleza de la
15 lesión y los tipos de células involucradas, así como sobre modos de muerte celular asociados a los productos de ruptura de espectrina.

[0074] Otro individuo de la cohorte de traumatismo craneoencefálico grave incluía una mujer caucásica de 51 años que sufrió una lesión por aplastamiento asociada a la caída de un caballo sobre el individuo. Tras el ingreso en urgencias, el GCS era de 3, siendo corriente el análisis por imágenes inicialmente, con contusiones corticales y subcorticales pequeñas. La IRM el día 5 reveló contusiones considerables en la fosa posterior. En ese momento, la escala de Marshall era de 11, con una puntuación de la escala de Rotterdam de 3. El sujeto empeoró y se retiró el cuidado 10 días después de la lesión. Los valores de LCF y suero para este individuo durante un periodo de tiempo, se proporcionan en la figura 14.
20

[0075] A partir del ensayo ELISA de tipo sándwich, se observa que los valores de GFAP en función del tiempo son notablemente elevados en relación con controles normales (grupo de control B) en función del tiempo.
25

[0076] La concentración de productos de ruptura de espectrina, MAP2 y UCH-L1, en función del tiempo posterior al traumatismo craneoencefálico, se ha dado a conocer en otros lugares, según se ejemplifica en los documentos de patente estadounidense 7,291,710 y 7,396,654, que se incorporan en el presente documento como referencia.

30 **[0077]** Se realizó un análisis para valorar la capacidad de los biomarcadores medidos en suero para pronosticar el resultado de TCE, específicamente GCS. El análisis de regresión por pasos fue el método estadístico utilizado para valorar cada uno de los biomarcadores como factor predictivo independiente, junto con los factores demográficos de edad y género, así como interacciones entre pares de factores. Las interacciones determinan un potencial predictivo importante entre factores relacionados, por ejemplo, cuando la relación entre un
35 biomarcador y el resultado puede ser diferente para hombres y mujeres, dicha relación se definiría como un género por la interacción de los biomarcadores.

[0078] El análisis resultante identificó los biomarcadores UCH-L1, MAP2 y GFAP como pronosticadores estadísticamente significantes de GCS (tabla 2, 3). Asimismo, se demostró que GFAP tenía predictibilidad mejorada cuando se valoró en interacción con UCH-L1 y género (tabla 4, 5).

40 Tabla 2. Análisis de regresión por pasos 1 - Cohorte incluye: Todos los sujetos >= 18 años

Resumen de selección por pasos - 48 sujetos

Variable	Parámetro	Modelo		
Paso introducido	Estimación	R-cuadrado	Valor F	Valor p
Intercepto	13,02579			
2 SEXCD	-2,99242	0,1580	7,29	0,0098
1 LCF_UCH_L1	-0,01164	0,2519	11,54	0,0015
3 Suero_MAP_2	0,96055	0,3226	4,59	0,0377

Tabla 3. Análisis de regresión por pasos 2 - Cohorte incluye: Sujetos TCE >= 18 años

Resumen de selección por pasos - 39 sujetos

Resumen de selección por pasos - 39 sujetos

Variable	Parámetro	Modelo		
Paso introducido	Estimación	R-cuadrado	Valor F	Valor p
Intercepto	5,73685			
1 Suero_UCH_L1	-0,30025	0,0821	8,82	0,0053
2 Suero_GFAP	0,12083	0,1973	5,16	0,0291

Tabla 4. Análisis de regresión por pasos 1 - Cohorte incluye: Sujetos TCE y A >= 18 años

Resumen de selección por pasos - 57 sujetos

Variable	Parámetro	Modelo		
Paso introducido	Estimación	R-cuadrado	Valor F	Valor p
Intercepto	8,04382			
1 Suero_UCH_L	-0,92556	0,1126	12,90	0,0007
2 Suero_MAP_2	1,07573	0,2061	5,79	0,0197
3 Suero_UCH-L1 +Suero_GFAP	0,01643	0,2663	4,35	0,0419

Tabla 5. Análisis de regresión por pasos 2 - Cohorte incluye: Sujetos TCE >= 18 años

Resumen de selección por pasos - 44 sujetos

Variable	Parámetro	Modelo		
Paso introducido	Estimación	R-cuadrado	Valor F	Valor p
Intercepto	5,50479			
1 Suero_UCH_L1	-0,36311	0,0737	11,95	0,0013
2 SEX_Suero_GFAP	0,05922	0,1840	5,09	0,0296
3 Suero_MAP_2	0,63072	0,2336	2,59	0,1157

5

Ejemplo 11:

[0079] Se repitió el estudio del ejemplo 10 con una cohorte de traumatismo craneoencefálico moderado caracterizada por puntuaciones GCS de entre 9 y 11, así como con una cohorte de traumatismo craneoencefálico leve caracterizada por puntuaciones GCS de 12-15. Se obtuvieron muestras de sangre de cada paciente a su llegada al servicio de urgencias de un hospital a las 2 horas de la lesión y se midieron por medio de ELISA para observar los niveles de GFAP en nanogramos por milímetro. Se compararon los resultados con los de un grupo de control que no había sufrido ninguna lesión. Resultados secundarios incluían la presencia de lesiones intracraneales en tomografías computarizadas de la cabeza.

[0080] En 3 meses, se inscribieron 53 pacientes: 35 con GCS de 13-15, 4 con GCS de 9-12 y 14 controles. La media de edad era de 37 años (rango de 18-69) y el 66 % eran varones. El nivel de GFAP en suero medio era 0 en los pacientes control, 0,107 (0,012) en los pacientes con GCS de 13-15 y 0,366 (0,126) en GCS de 9-12 (P<0,001). La diferencia entre GCS de 13-15 y los controles era considerable a P<0,001. En los pacientes con lesiones intracraneales en tomografía computarizada, los niveles de GFAP eran de 0,234 (0,055) en comparación con 0,085 (0,003) en los pacientes sin lesiones (P<0,001). Se da un aumento considerable de GFAP en suero después de un TCEL en comparación con controles ilesos tanto en los grupos leves como moderados. También se asoció GFAP considerablemente con la presencia de lesiones intracraneales en tomografía computarizada.

15

20

5 **[0081]** En la figura 16, se muestra la concentración de GFAP para controles, así como individuos en la cohorte de traumatismo craneoencefálico leve/moderado en función de los resultados de tomografía computarizada después del ingreso y 24 h a partir de ese momento. Se llevaron a cabo ensayos simultáneos en el transcurso de este estudio para el biomarcador UCH-L1. En la figura 17, se proporciona la concentración de UCH-L1 derivada de las mismas muestras que las utilizadas para determinar GFAP. La concentración de UCH-L1 y GFAP, así como un biomarcador no seleccionado para el diagnóstico de estado neurológico, S100b, se proporciona en función de la magnitud de la lesión entre control, traumatismo craneoencefálico leve y moderado, tal y como se muestra en la figura 18. Los análisis simultáneos de UCH-L1 y GFAP de estos pacientes ilustran el efecto sinérgico del proceso de la invención al permitir a un investigador diagnosticar de forma simultánea el traumatismo craneoencefálico, así como discernir el nivel de traumatismo craneoencefálico entre niveles leves y moderados de gravedad. En la figura 19, se representa la concentración de los mismos marcadores, según se representa en la figura 18 con respecto a la prueba inicial tras el ingreso en el hospital en relación con lesiones en tomografías computarizadas que ilustran la gran confianza en el resultado predictivo del proceso de la invención. En la figura 20, se muestra que tanto NSE y MAP2 son elevados en sujetos con TCEL en suero tanto en el momento del ingreso como en las 24 h de seguimiento. Estos datos muestran un efecto diagnóstico sinérgico de la medición de múltiples biomarcadores, tales como GFAP, UCH-L1, NSE y MAP2 en un sujeto.

10 **[0082]** Por medio de la medición simultánea de diversos biomarcadores, tales como UCH-L1, GFAP, NSE y MAP2, se obtiene una determinación rápida y cuantificable con respecto a la gravedad del traumatismo craneal coherente con la puntuación GSC y la tomografía computarizada, pero en un proceso, de forma sorprendente, más cuantificable, ágil y económico. Adicionalmente, con un ensayo acoplado para biomarcadores indicativo de estado neurológico, se valora la naturaleza de la anomalía neurológica y en este estudio particular que sugiere el daño de cuerpo celular neuronal. Como sucede con un traumatismo craneoencefálico grave, se observa que las variaciones de género sugieren una función de los antiinflamatorios hormonales como candidatos terapéuticos. Una curva ROC modeladora de UCH-L1, GFAP y SBDP145 posterior a TCE también sustenta el valor de la medición simultánea de estos biomarcadores, tal y como se muestra en las figuras 21, 22.

15 **[0083]** Asimismo, en la figura 22 se mostraba que diversos biomarcadores cerebrales (GFAP, UCH-L1 y MAP2) en plasma de pacientes con apoplejía. Se recogieron muestras con un tiempo posterior a la lesión medio de 24,2 h (rango de 18-30 h). El panel superior muestra niveles de GFAP, UCH-L1 y MAP2 en apoplejía (n=11) frente a controles normales (n=30). El panel inferior también muestra que UCH-L1 es elevado tanto en poblaciones con apoplejía hemorrágica e isquémica en comparación con plasma control normal.

20 **[0084]** Los documentos de patente y publicaciones mencionados en la memoria son indicativos de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

25 **[0085]** La descripción anterior es ilustrativa de modos de realización particulares de la invención, pero no pretende ser una limitación en la práctica de la misma. Las reivindicaciones siguientes pretenden definir el alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para determinar el estado neurológico de un sujeto donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía, que comprende:

5 medir una muestra biológica obtenida del sujeto en un primer momento para una cantidad de un primer biomarcador y una cantidad de al menos un biomarcador neuroactivo adicional, donde dicho primer biomarcador es GFAP y dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional es UCH-L1; y

10 comparar la cantidad de dicho primer biomarcador y la cantidad de dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional con el nivel básico de dicho primer biomarcador y dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional en un sujeto que se sabe que está libre de un estado neurológico patológico para determinar el estado neurológico del sujeto;

 donde dicha muestra biológica es líquido cefalorraquídeo (LCF), sangre entera, suero o plasma.
2. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además medir para una cantidad de un biomarcador neuroactivo adicional, donde dicho biomarcador neuroactivo adicional es NSE, SBDP145, SBDP120, S100b, MAP2 o MBP.
- 15 3. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, que también comprende medir una segunda cantidad de dicho primer biomarcador y una segunda cantidad de dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional en un segundo momento para producir un perfil cinético para dicho primer biomarcador y dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional.
- 20 4. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, que también comprende comparar la cantidad de dicho primer biomarcador y la cantidad de dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional entre los niveles en el sujeto y los niveles en otros individuos del mismo género que el sujeto que se sabe que está libre de un estado neuronal patológico.
- 25 5. Proceso de conformidad con la reivindicación 4, donde se determina si el sujeto se ha expuesto a un cierto grado de traumatismo craneoencefálico que varía entre leve y grave; y donde el proceso también comprende predecir la mortalidad a partir de la cantidad de UCH-L1 y la cantidad de GFAP.
- 30 6. Producto de ensayo para determinar el estado neurológico, donde dicho estado neurológico se selecciona entre traumatismo craneoencefálico y apoplejía de un sujeto, que comprende:

 un sustrato para mantener una muestra biológica aislada del sujeto;

 un agente aglutinante específicamente de un primer biomarcador donde un primer biomarcador es GFAP;

35 un agente de unión específica a al menos un biomarcador neuroactivo adicional donde dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional es UCH-L1; e

 instrucciones impresas para hacer reaccionar dicho agente específico de primer biomarcador con una primera parte de dicha muestra biológica con el fin de detectar una cantidad de dicho primer biomarcador y hacer reaccionar dicho al menos un agente específico de biomarcador neuroactivo adicional con una segunda parte de dicha muestra biológica y dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional en dicha muestra biológica con el fin de detectar una cantidad de dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional para determinar el estado neurológico del sujeto de acuerdo con el proceso de conformidad con la reivindicación 1.
- 40 7. Producto de ensayo de conformidad con la reivindicación 6, donde el agente específico de primer biomarcador es un anticuerpo anti-GFAP.
8. Producto de ensayo de conformidad con la reivindicación 6, donde dicho agente aglutinante específicamente del primer biomarcador y dicho agente de unión específica a al menos un biomarcador neuroactivo adicional se unen ambos al sustrato, optativamente con superposición espacial.
- 45 9. Producto de ensayo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8, que comprende además una especie distinta de detección de primer biomarcador para dicho primer biomarcador y una especie distinta, discernible, de detección del al menos un biomarcador neuroactivo adicional para dicho al menos un biomarcador neuroactivo adicional.
- 50 10. Proceso para determinar si un sujeto ha sufrido traumatismo craneoencefálico leve o traumatismo craneoencefálico moderado en un evento, que comprende:

 medir mediante ELISA una muestra biológica obtenida de dicho sujeto para una cantidad de GFAP, donde dicha muestra biológica es sangre entera, suero o plasma; y

 comparar la cantidad medida de dicho GFAP con niveles normales de GFAP en un grupo de control que no había sufrido ningún tipo de traumatismo craneal, donde si la cantidad medida de GFAP se

encuentra entre 0,082 y 0,492 nanogramos por milímetro, el sujeto ha sufrido traumatismo craneoencefálico leve o traumatismo craneoencefálico moderado en el evento.

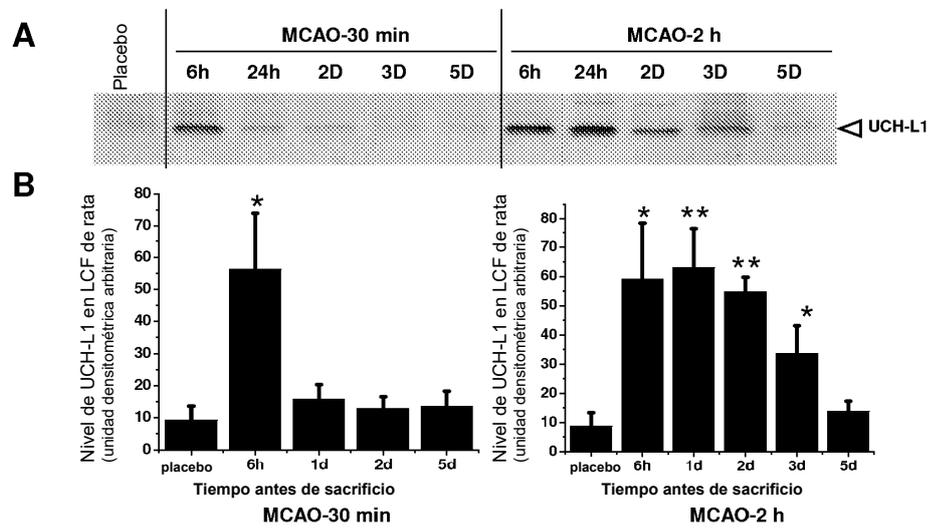


Figura 1

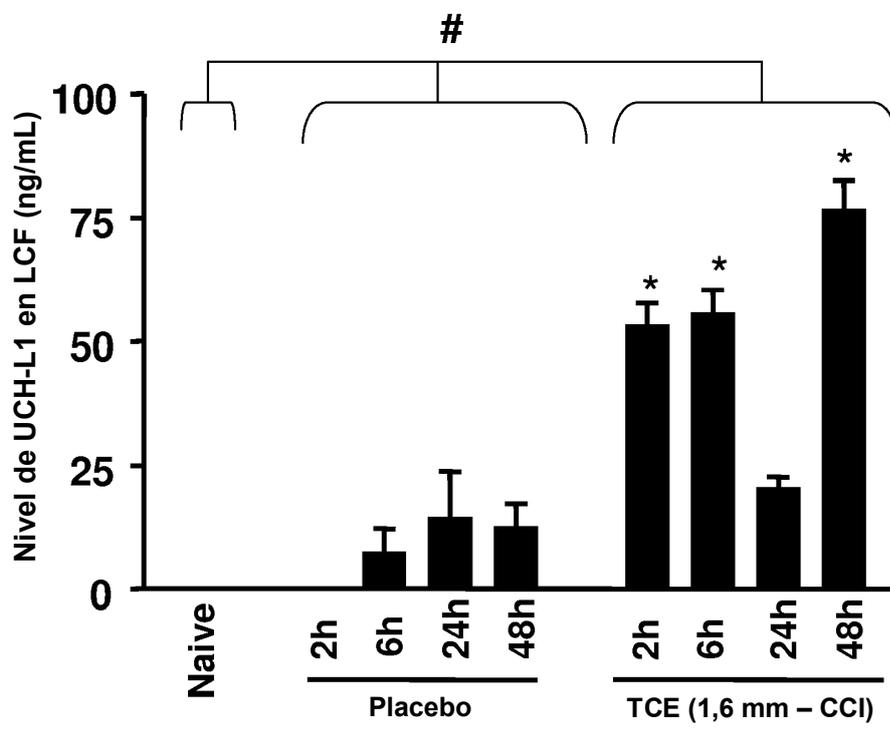


Figura 2

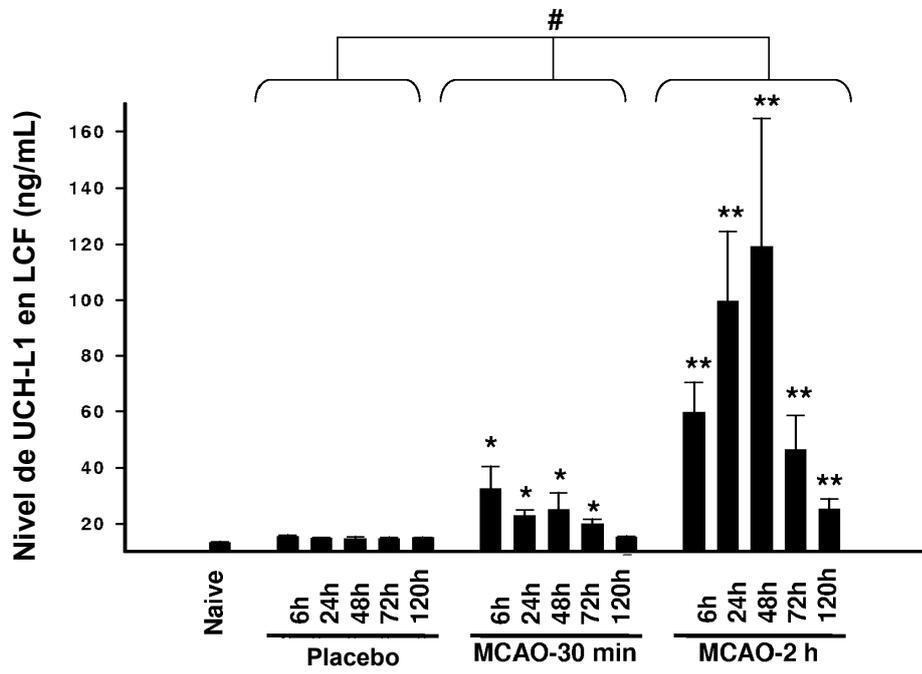


Figura 3

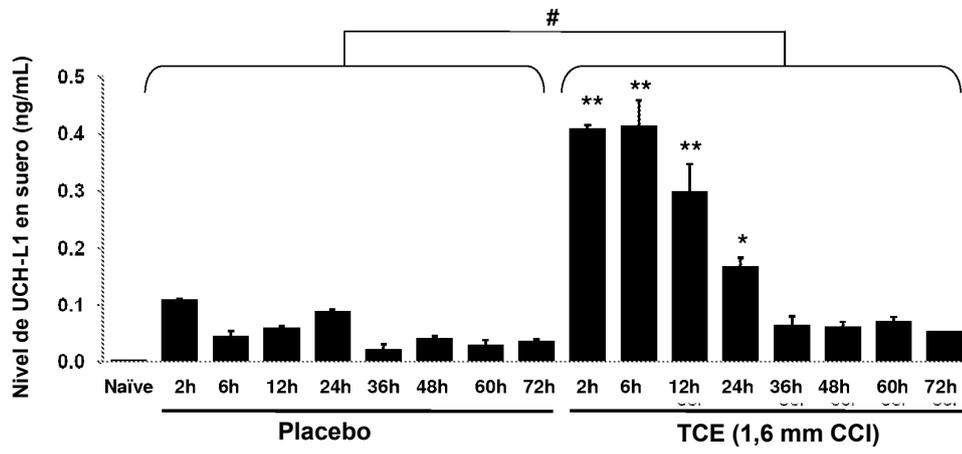


Figura 4

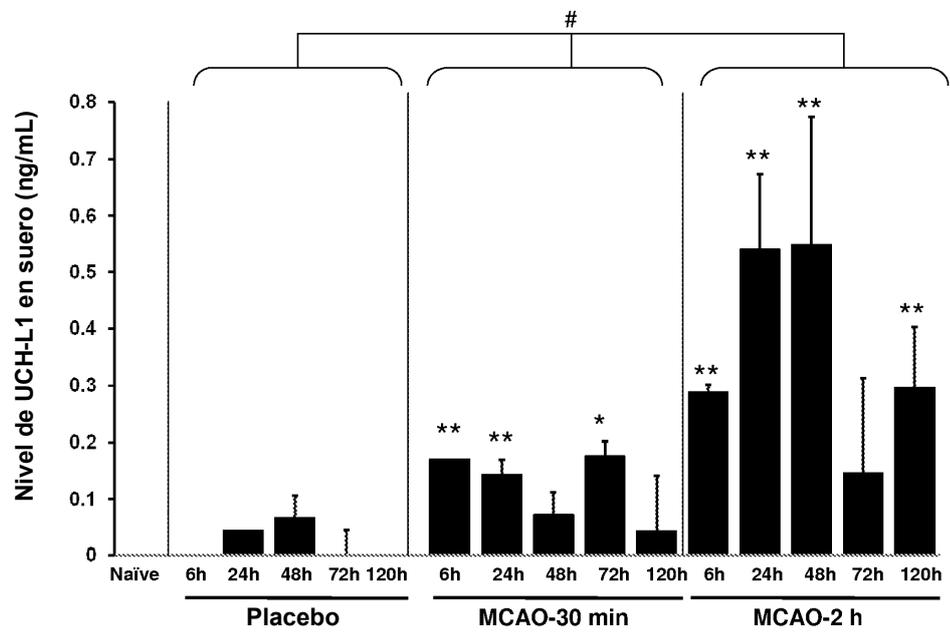
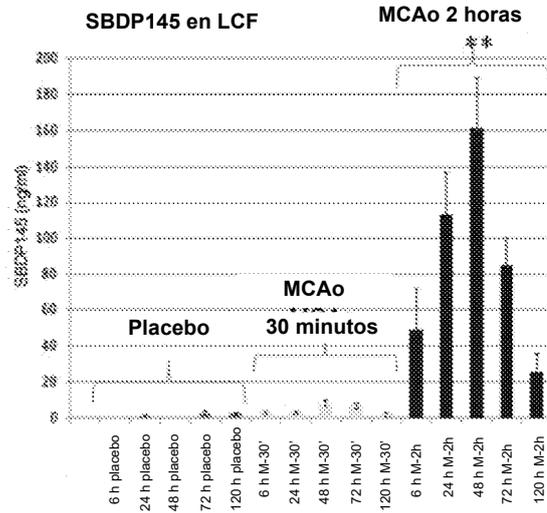


Figura 5

A



B

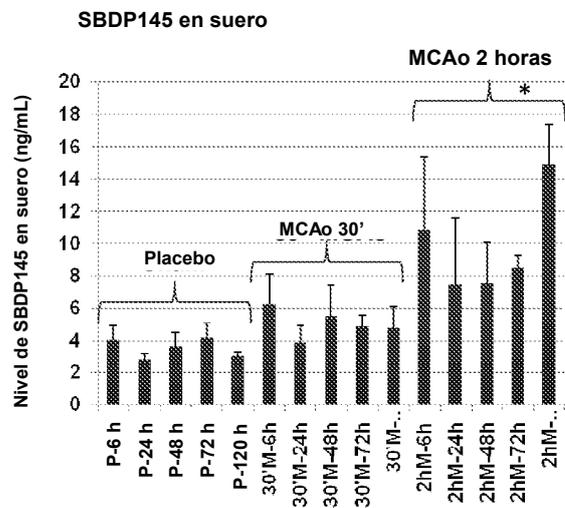


Figura 6

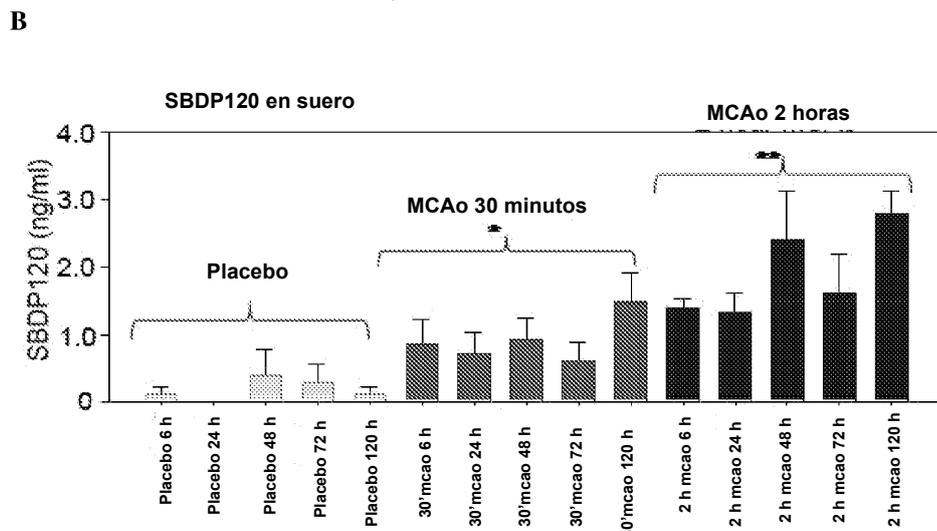
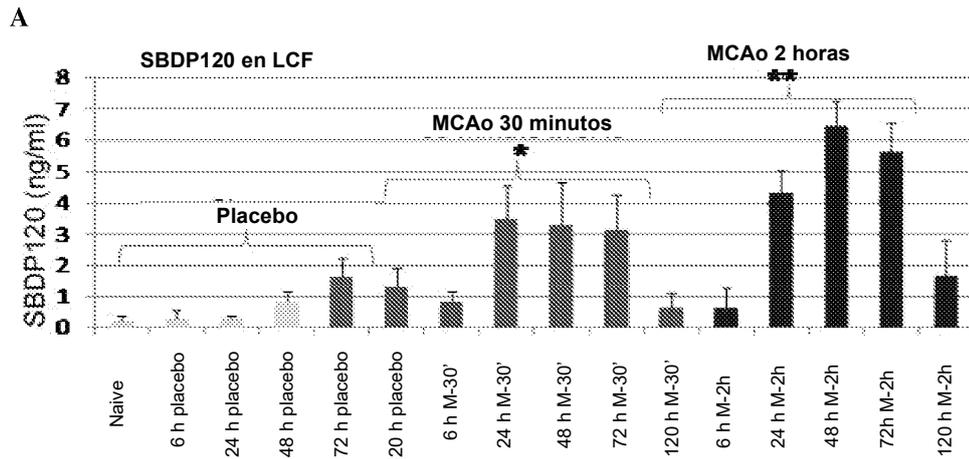


Figura 7

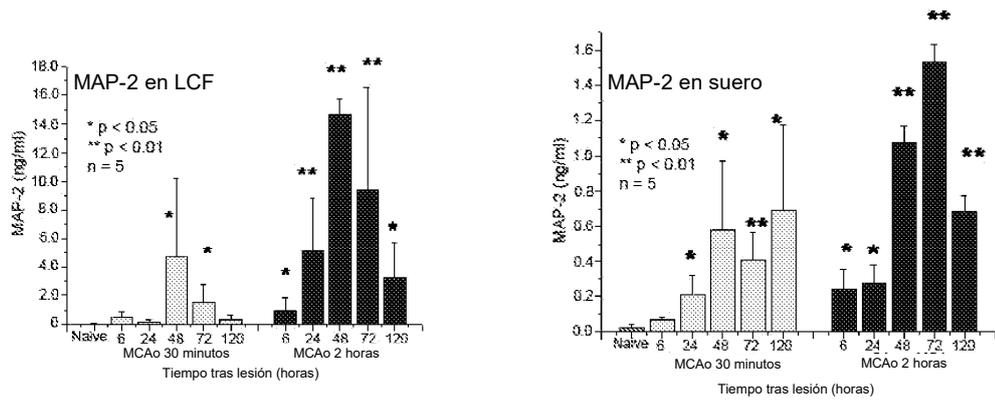


Figura 8

Utilidad diagnóstica de biomarcadores mediante la utilización de primera muestra de LCF disponible

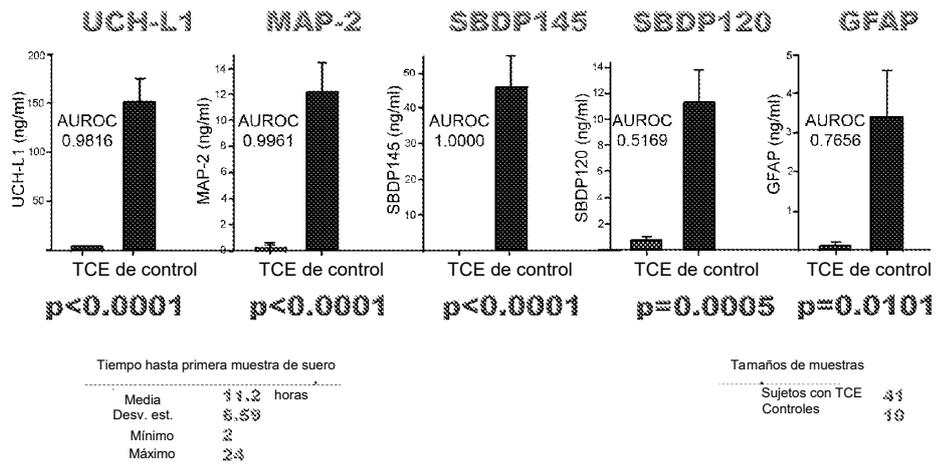


Figura 9

Utilidad diagnóstica de biomarcadores mediante la utilización de primera muestra de suero disponible

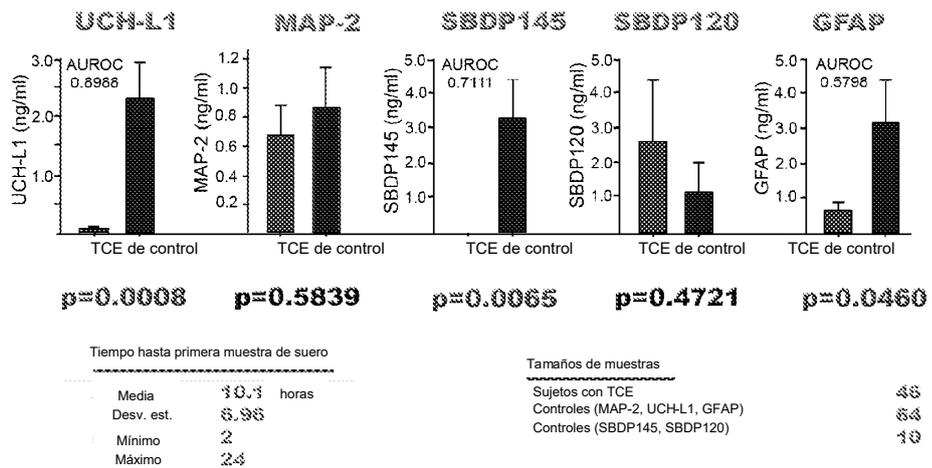


Figura 10

Utilidad diagnóstica de biomarcadores en las primeras 12 horas tras la lesión

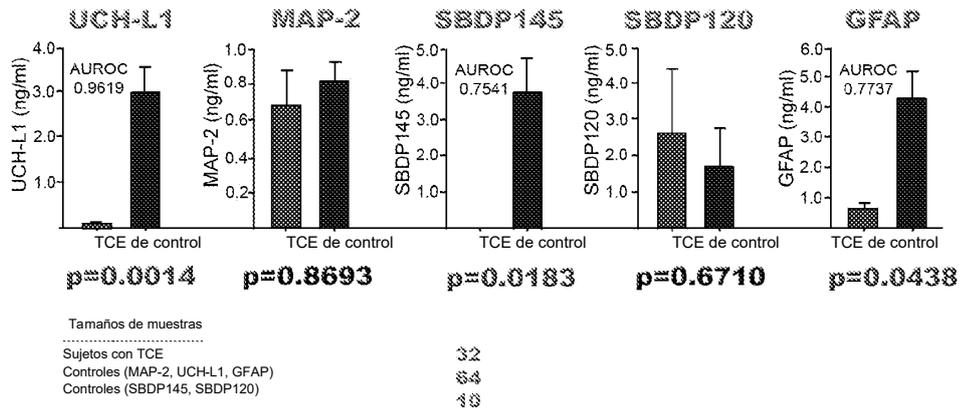


Figura 11

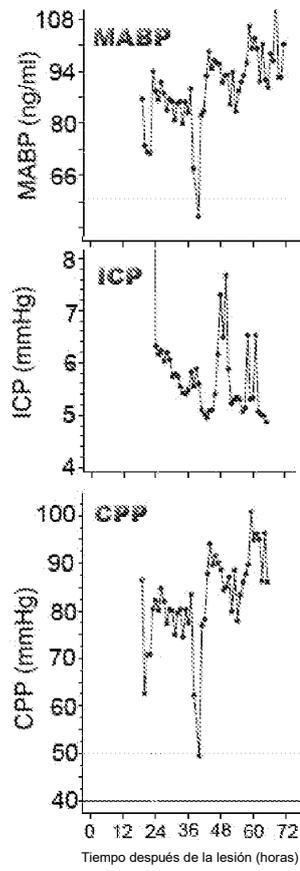


Figura 12

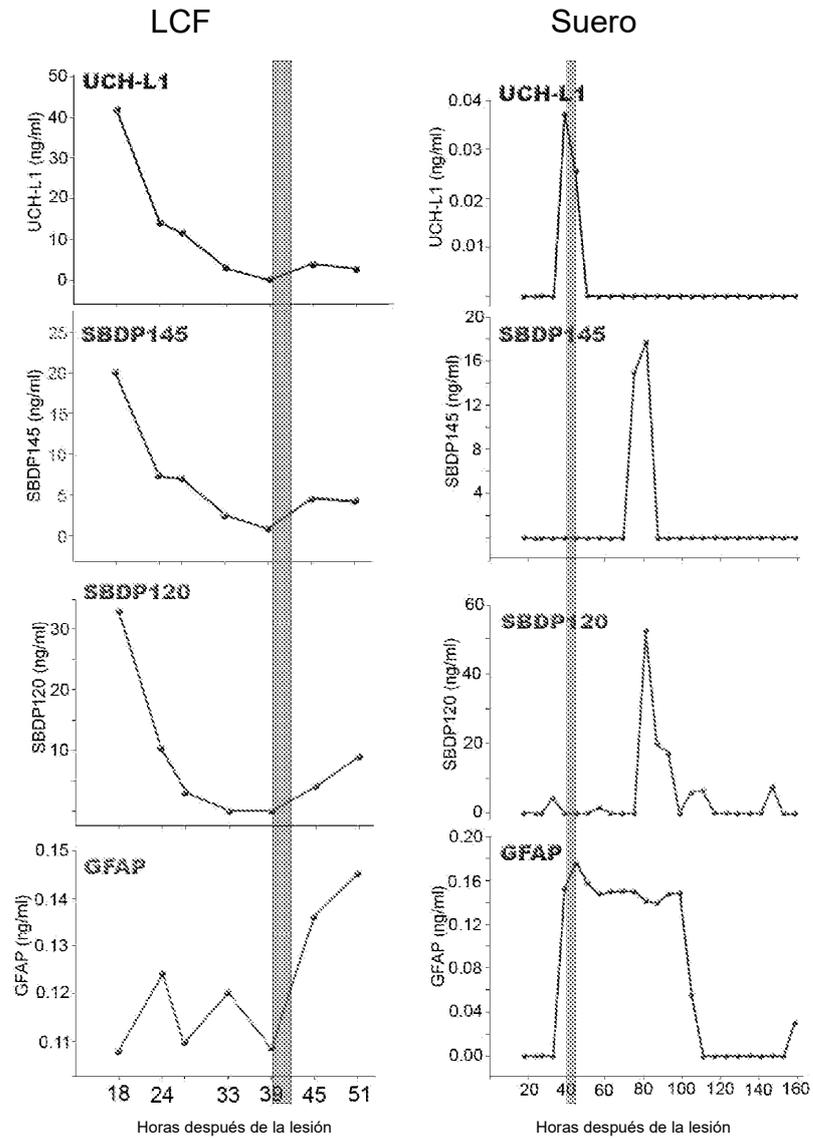


Figura 13

Sujeto UF-002

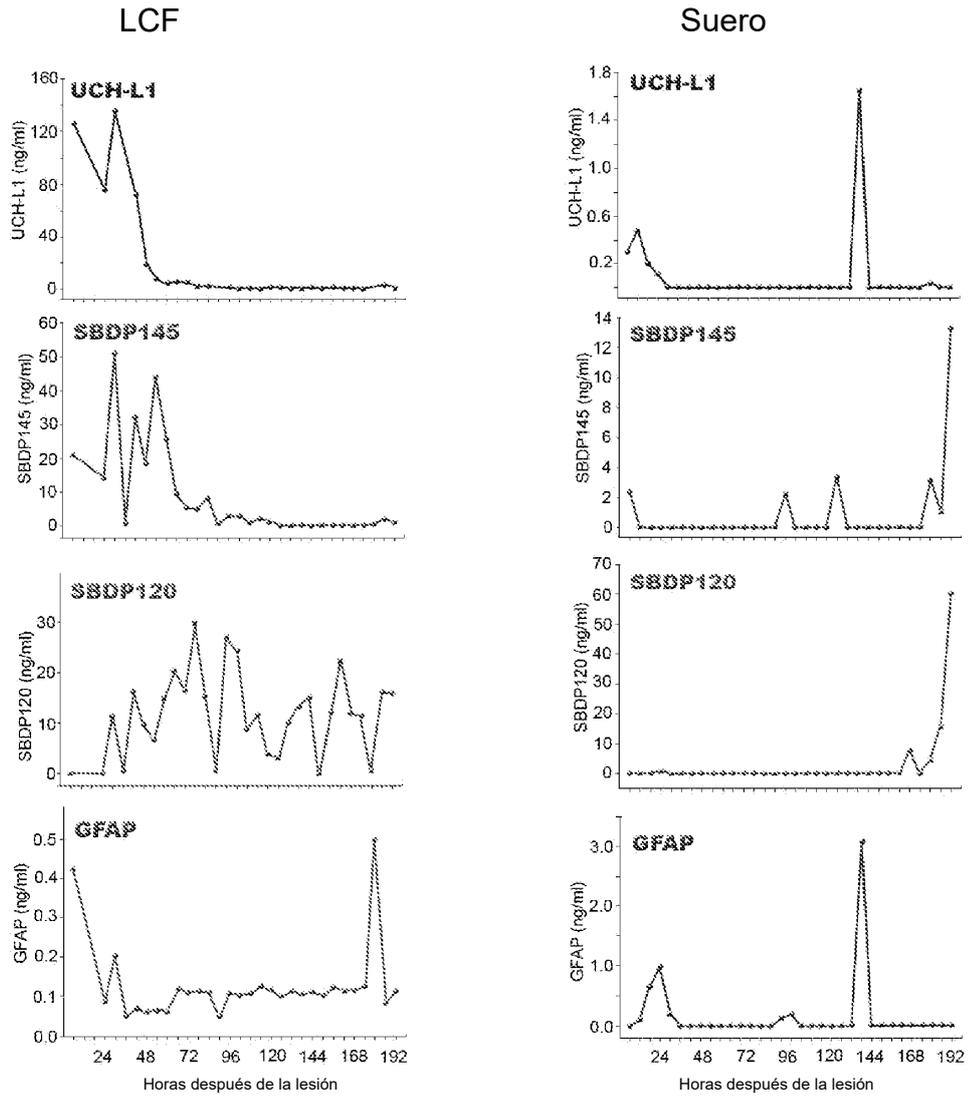


Figura 14

UCH-L1 – Confirmación preclínica
Modelo CCI

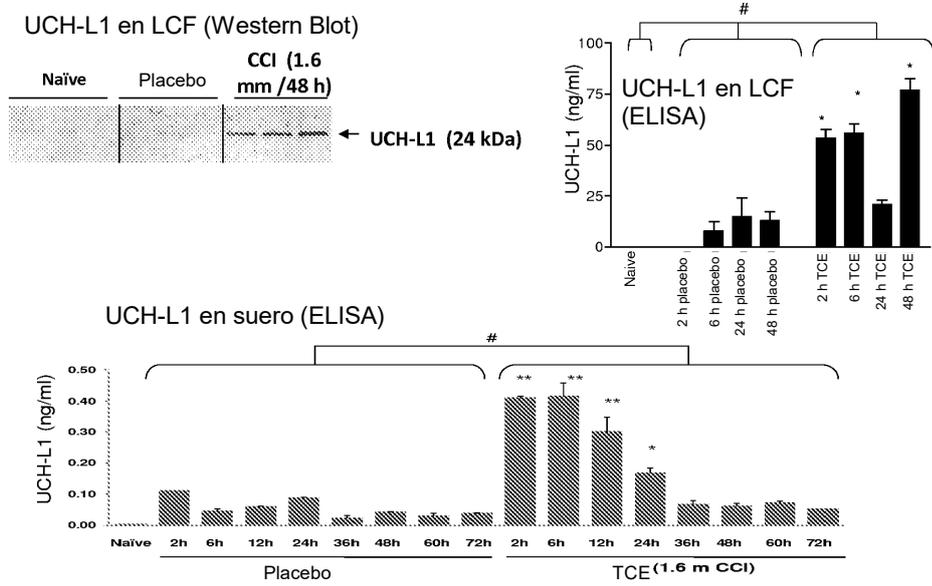


Figura 15

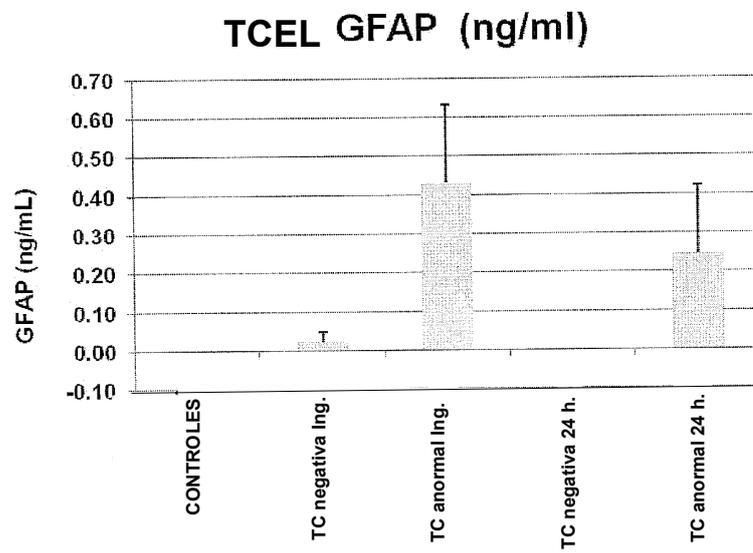


Figura 16

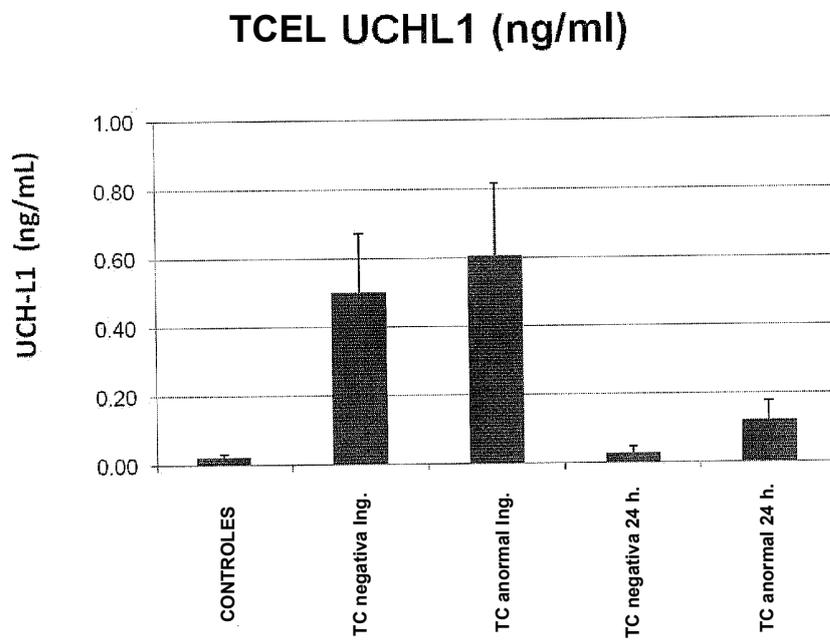
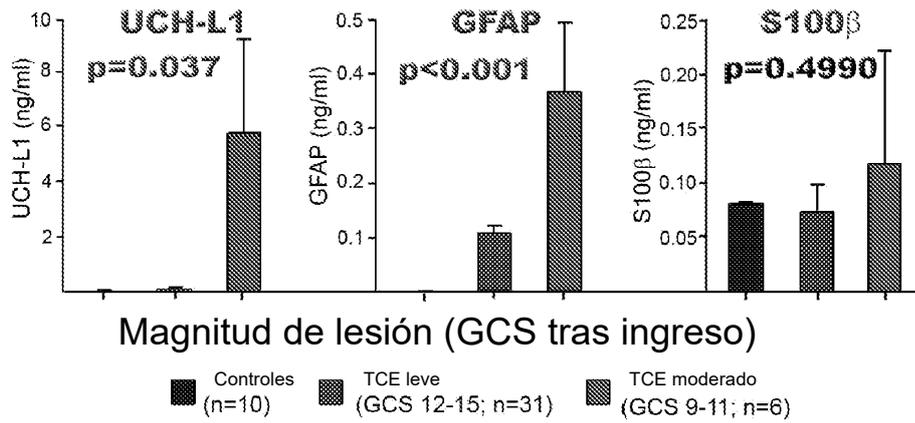


Figura 17

Utilidad diagnóstica de biomarcadores para detectar TCE leve y moderado
1. Relación con GCS

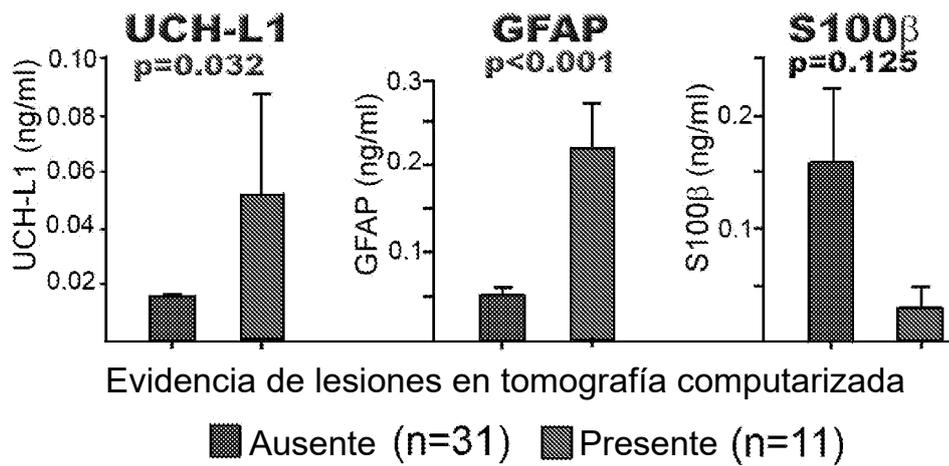


Biomarcadores cuantificados en muestras de suero tomadas tras ingreso en urgencias (a las 2 horas de la lesión)

Figura 18

Utilidad diagnóstica de biomarcadores para detectar TCE leve y moderado

2. Relación con tomografía computarizada



Biomarcadores cuantificados en muestras de suero tomadas tras ingreso en urgencias (a las 2 horas de la lesión)

Figura 19

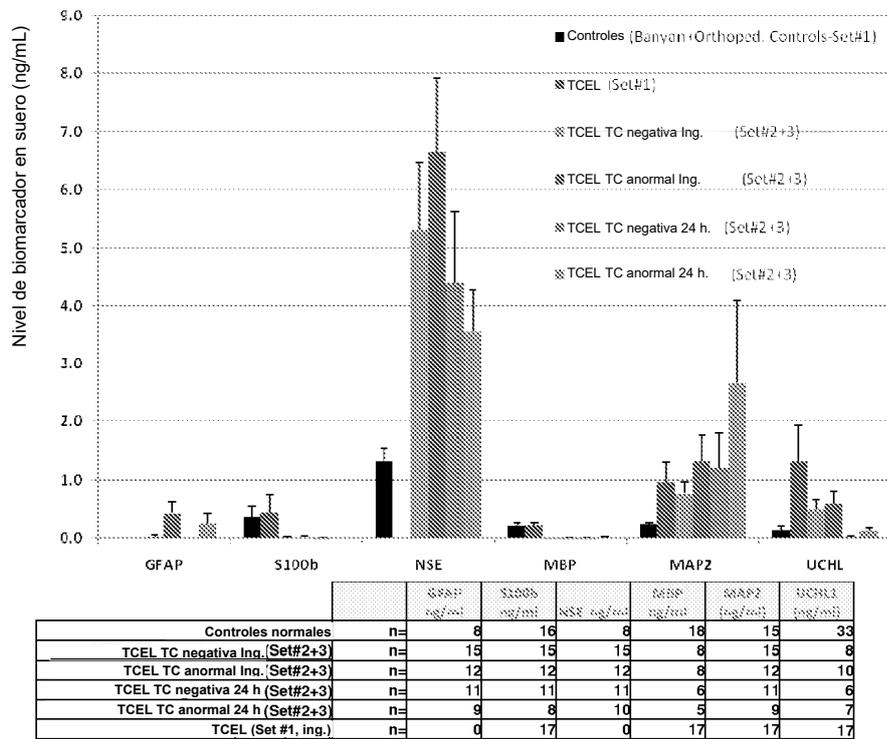


Figura 20

Curva ROC de **UCH-L1**, **GFAP** y **SBDP145** en LCF humano (TCE grave frente a Control A) las primeras 24 horas después de la lesión

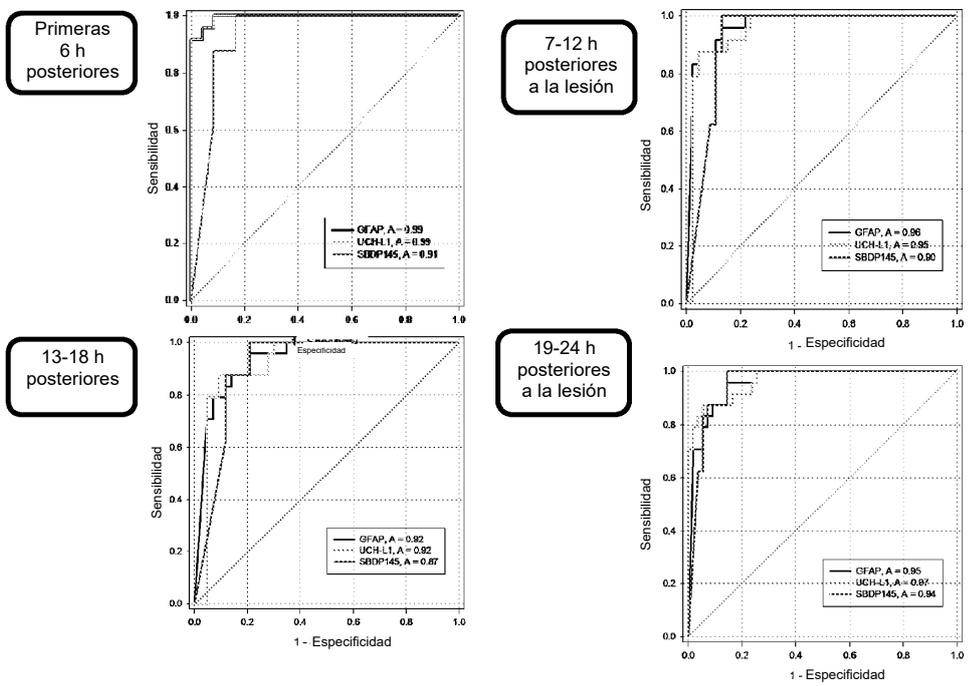


Fig. 21

Curvas ROC: biomarcadores en TCE leve

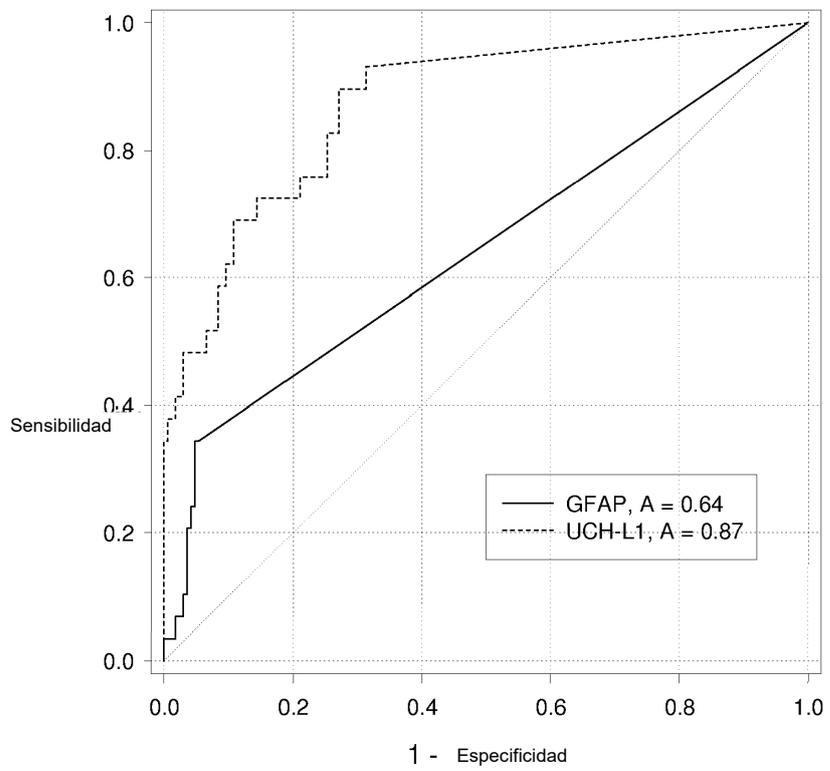


Fig. 22

Ascenso de biomarcadores de traumatismo craneal (GFAP, UCH-L1 y MAP2) en plasma de pacientes con apoplejía

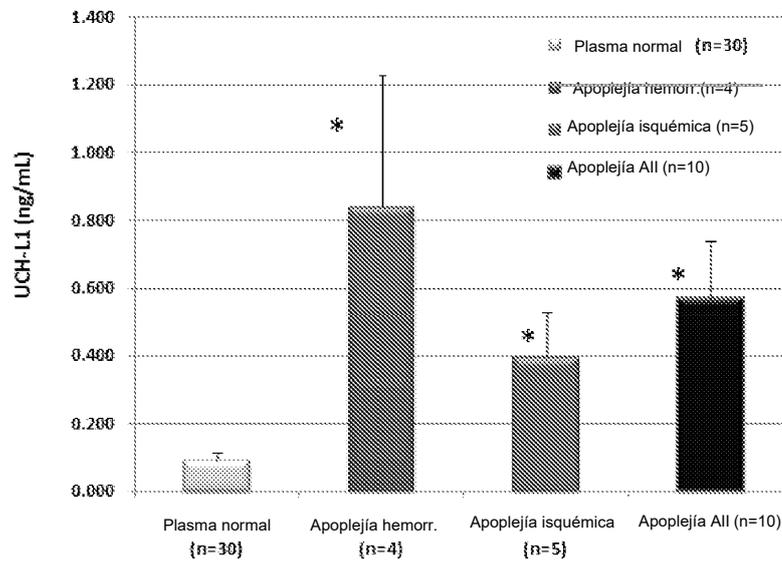
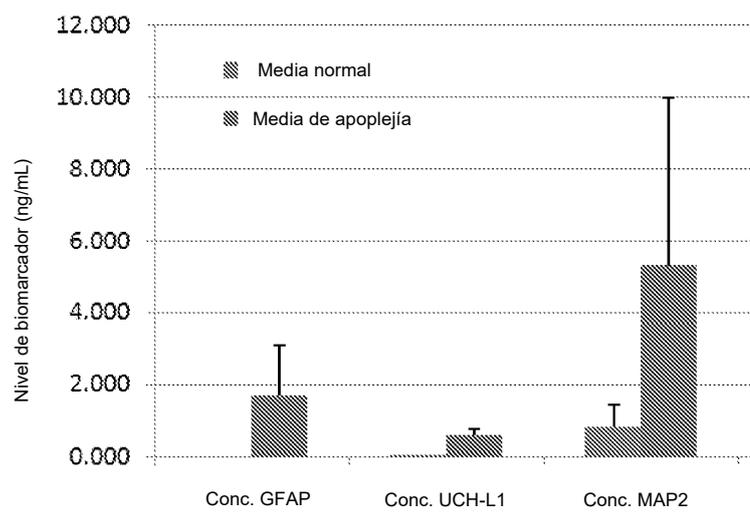


Fig. 23