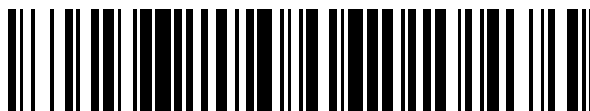


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 469**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2010 PCT/US2010/048789**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11032155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2010 E 10816275 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2478360**

54 Título: **Marcadores autoanticuerpos para el diagnóstico de traumatismo craneoencefálico**

30 Prioridad:

**17.06.2010 US 355779 P**

**14.06.2010 US 354504 P**

**14.09.2009 US 242123 P**

**03.09.2010 US 380158 P**

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

**25.10.2018**

73 Titular/es:

**BANYAN BIOMARKERS, INC. (50.0%)**

**13400 Progress Blvd.**

**Alachua, FL 32615, US y**

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, AS**

**REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE**

**ARMY U.S. ARMY MEDICAL RESEARCH AND**

**MATERIEL COMMA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WANG, KEVIN, KA-WANG;**

**ZHANG, ZHIQUN;**

**LIU, MING, CHENG;**

**HAYES, RONALD, L. y**

**DAVE, JITENDRA**

74 Agente/Representante:

**RIZZO , Sergio**

ES 2 687 469 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Marcadores autoanticuerpos para el diagnóstico de traumatismo craneoencefálico

## CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente descripción se refiere a la identificación de marcadores de traumatismo craneoencefálico (TCE) u otras afecciones neurológicas, incluidos accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y encefalopatía traumática crónica (ETC). Entre los marcadores se incluyen autoanticuerpos, ADN, ARN o miARN que pueden participar en la función y el tratamiento del sistema nervioso central. La invención se refiere también a materiales y métodos de diagnóstico y terapéuticos, que incluyen  
10 métodos para detectar biomarcadores en lesiones cerebrales, y al método de diagnóstico para facilitar y monitorizar la propensión o progreso de lesiones cerebrales.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0002]** El campo de la neurología clínica continúa frustrado debido a que se reconoce que se podrían reducir las lesiones secundarias en un tejido del sistema nervioso central asociado a una respuesta fisiológica al traumatismo inicial si se pudiera diagnosticar rápidamente el traumatismo inicial o, en el caso de un trastorno progresivo, antes de que el estrés en los tejidos del sistema nervioso central alcance un umbral predeterminado. Todas las lesiones traumáticas, isquémicas y químicas neurotóxicas, así como los trastornos genéricos, presentan la perspectiva de daño cerebral. Aunque el diagnóstico de las formas graves de cada una de estas causas de daño cerebral resulta sencillo a través de las pruebas de respuesta clínica, tomografía computarizada (TC), e imagen por resonancia magnética (IRM), los diagnósticos por imagen se ven limitados tanto por el elevado coste de la imagen espectroscópica como por el largo tiempo de diagnóstico. Las pruebas de respuesta clínica de personas incapacitadas son de valor limitado e impiden a menudo un diagnóstico matizado. De forma adicional, debido a las limitaciones del diagnóstico existente, surgen situaciones en las que un sujeto experimenta una acentuación de su afección neurológica, aunque a menudo no son conscientes de que se han producido daños o de que no se ha procedido a buscar tratamiento debido a que los síntomas sutiles a menudo se resuelven de forma rápida. La falta de tratamiento de estas exposiciones de leves a moderadas a una afección neurológica en un sujeto puede presentar un efecto acumulativo o resultar de otra manera en un caso de daño cerebral grave, presentando de cualquier forma un pronóstico clínico desfavorable.

**[0003]** Para superar las limitaciones asociadas al diagnóstico espectroscópico y de respuesta clínica de la afección neurológica, existe una creciente atención en cuanto al uso de biomarcadores como indicadores internos de cambio a nivel molecular o celular de la afección médica de un sujeto. Debido a que la detección de biomarcadores utiliza una muestra obtenida a partir de un sujeto, normalmente líquido cefalorraquídeo, sangre o plasma, y detecta los biomarcadores en esa muestra, la detección de biomarcadores ofrece la posibilidad de medición de una afección médica de forma económica, rápida y objetiva. La obtención de indicadores de afección neurológica rápidos y objetivos permite determinar la gravedad de una afección cerebral anómala con un grado de objetividad no realizado anteriormente, predecir el resultado, orientar la terapia de la afección, así como monitorizar la respuesta y la recuperación por parte del sujeto. De forma adicional, dicha información obtenida a partir de numerosos sujetos permite lograr un cierto grado de comprensión respecto al mecanismo de lesión cerebral.

**[0004]** Los biomarcadores de lesión del sistema nervioso central (SNC) podrían proporcionar a los médicos y a los estudios de laboratorio marcadores neuroquímicos cuantificables para ayudar no solo a determinar la gravedad y la patología celular de la lesión, sino también para proporcionar un marcador indirecto de intervenciones terapéuticas. A pesar de que se han propuesto una serie de marcadores bioquímicos potenciales para el TCE, ningún marcador o proceso definitivo ha resultado ser capaz de diagnosticar el TCE, de distinguir entre el TCE leve y el TCE, o de demostrar una ventaja eficaz o terapéutica respecto a la administración terapéutica. Esta deficiencia resulta además evidente en caso de que un individuo padezca también una lesión multiorgánica. Habitualmente, las lesiones cerebrales son difíciles de tratar de manera eficaz, y los resultados satisfactorios dependen normalmente de la rapidez con la que haya sido diagnosticada una persona con un subtipo de lesión en concreto. Por consiguiente, existe la necesidad de obtener marcador(es) bioquímico(s) sensible(s) y específico(s) del TCE con la capacidad diagnóstica para evaluar la patología intracraneal de posconmoción con el fin de mejorar la gestión del paciente y para facilitar la evaluación terapéutica.

**[0005]** En Chekhonin *et al.* (Enzyme immunoassay of antibodies to neurospecific proteins in examination of blood-brain barrier function, *Immunologia*, páginas 67-69, 1996, ISSN 0206-4952), se describe un ensayo con una elevada sensibilidad para la detección de autoanticuerpos para cuatro proteínas específicas del cerebro, incluyendo GFAP en el suero de pacientes con trastornos neurológicos que se caractericen por la alteración de la BHE.

## SUMARIO DE LA INVENCION

**[0006]** La invención se define mediante el método definido en las reivindicaciones.

**[0007]** En el presente documento, se dan a conocer materiales y procesos para detectar una afección neurológica en un sujeto, que incluyen medir una cantidad de uno o más biomarcadores específicos de neurona en una muestra biológica, donde la síntesis o la producción del biomarcador se ve alterada tras una lesión, y detectar una afección neurológica en función de una proporción de la cantidad de uno o más de los biomarcadores presentes en dicha muestra biológica. Se da a conocer que un biomarcador específico de neurona es opcionalmente una proteína, un producto de degradación de proteínas, una molécula de ácido nucleico (p. ej., un oligonucleótido, como ADN, ARN o miARN), o un autoanticuerpo para cualquiera de estos. Opcionalmente, se miden combinaciones de múltiples biomarcadores en una o más muestras biológicas. Entre los ejemplos ilustrativos de biomarcadores se incluye un autoanticuerpo dirigido a una proteína, donde dicha proteína es: GFAP; Tau; S100β; βIII-tubulina; polipéptido ligero, medio o pesado de neurofilamento (NF-L, -M y -H); protón ATPasa de tipo V; Gamma-enolasa (NSE); vimentina; endofilina-A1; proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2); alfa-internexina; neuroserpina; neuromodulina; sinaptotagmina-1; canal de potasio regulado por voltaje; proteínas mediadoras de respuesta a la colapsina (CRMP-1 a 5); αII-espectrina; neurofascina; PBM; esterasa ubiquitina carboxi-terminal; Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP); productos de degradación de estos; derivados de los mismos; o combinaciones de estos. Un biomarcador puede ser un ácido nucleico que codifica al menos una parte de una proteína, como un oligonucleótido de ADN o ARN, donde la proteína es GFAP; all-espectrina; un producto de degradación de all-espectrina; neurofascina; PBM; MAP2; esterasa ubiquitina carboxi-terminal; una hidrolasa ubiquitina carboxi-terminal; una proteína intracelular localizada neuronalmente; MAP-tau; C-tau; Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP); una proteína mediadora de respuesta a la colapsina; productos de degradación de estos; derivados de los mismos, o combinaciones de estos. Un biomarcador es opcionalmente un miARN. Un miARN es opcionalmente enriquecido de cerebro o específico de cerebro. Un miARN es opcionalmente al menos una porción de un miARN que regula la expresión de una proteína, donde la proteína es GFAP; all-espectrina; un producto de degradación de all-espectrina; neurofascina; PBM; MAP2; esterasa ubiquitina carboxi-terminal; una hidrolasa ubiquitina carboxi-terminal; una proteína intracelular localizada neuronalmente; MAP-tau; p53; SYTL1; calpastatina; Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP); CAPN1, 2 o 6; IRS-1; SMAD5; una proteína mediadora de respuesta a la colapsina; sinaptotagmina-1 o -9; quinasa Rho; sinapsina 1; sintafilina; ATXN1; derivados de los mismos, o combinaciones de estos. Un miARN es opcionalmente uno de SEQ ID N.ºs 51-113, opcionalmente uno de SEQ ID N.ºs 51-60 u 84-93, u opcionalmente miR-9, miR-34, miR-92b, miR-124a, miR-124b, miR-135, miR-153, miR-183, miR-219, miR-222, miR-125a, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-135, miR-137, miR-139, miR-218a, o combinaciones de estos.

**[0008]** La invención se refiere a un proceso para detectar un daño celular neuronal de un sujeto que comprende: medir una cantidad de uno o más biomarcadores específicos de neurona en una muestra biológica recogida a partir del sujeto, donde la síntesis de dicho biomarcador se ve alterada tras el daño celular neuronal en el sujeto; y detectar un daño celular neuronal en función de una proporción de la cantidad de uno o más de tales biomarcadores en dicha muestra biológica, donde dicho biomarcador es un autoanticuerpo dirigido a GFAP o productos de degradación de este; donde dicho daño celular neuronal es provocado por un traumatismo craneoencefálico (TCE).

**[0009]** Un producto de degradación de GFAP se produce opcionalmente mediante escisión en Asn59, Thr383, o ambos, en la SEQ ID N.º 114. Un producto de degradación de Tau (TBDP) se produce opcionalmente mediante escisión del C-terminal del aminoácido 25, 44, 129, 157, 229, 421, o combinaciones de estos, cada uno en la SEQ ID N.º 11.

**[0010]** La concentración medida de uno o más biomarcadores se compara opcionalmente con el nivel del biomarcador en una muestra biológica similar a partir de uno o más sujetos control para ofrecer una proporción de concentraciones. La proporción es opcionalmente positiva cuando el nivel de biomarcador en una muestra biológica de un sujeto es más elevado que en el de un sujeto control, o negativa cuando el nivel de biomarcador en una muestra biológica de un sujeto es menor que el de un sujeto control.

**[0011]** Se puede apreciar que cualquier muestra biológica adecuada resulta operativa. Entre los ejemplos ilustrativos se incluye sangre, plasma, suero, LCR, orina, saliva, o tejido. Una muestra biológica es opcionalmente plasma libre de células o suero libre de células.

**[0012]** Se induce una lesión opcionalmente mediante un compuesto. De manera ilustrativa, se administra un compuesto a un sujeto como un agente terapéutico, o como un candidato terapéutico, tal como en el descubrimiento o desarrollo de fármacos.

**[0013]** Los materiales y procesos detectan, diagnostican, o miden el nivel de una o más afecciones tales como lesión cerebral (p. ej., traumatismo craneoencefálico), lesión multiorgánica, accidente cerebrovascular, enfermedad neurodegenerativa, o combinaciones de estos.

**[0014]** En el presente documento se da a conocer también un agente de detección para detectar y, opcionalmente, cuantificar un biomarcador en una muestra biológica. Un agente de detección se une opcionalmente a una porción de GFAP en 10 aminoácidos del sitio de escisión en la posición de aminoácido 59 o 383 de la SEQ ID N.º 114 o variantes de esta. Un agente de detección se une opcionalmente a la secuencia

amino Tau humana (SEQ ID N.º 11) en diez aminoácidos del sitio de escisión en la posición de aminoácido 25, 44, 129, 157, 229 o 421. Opcionalmente, un agente de detección se une a una secuencia de aminoácidos SEQ ID N.º 11 o variantes de esta en 10 aminoácidos C-terminal de Ser129, en 10 aminoácidos N-terminal de Val229, en 10 aminoácidos N-terminal de Asp421, en 10 aminoácidos C-terminal de Lys44, en 10 aminoácidos N-terminal de Ser129. Se puede apreciar que un agente de detección se une opcionalmente a una secuencia de aminoácidos que es al menos una porción de las SEQ ID N.ºs 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44.

**[0015]** También se da a conocer un agente de detección que se une a una secuencia de aminoácidos que es SEQ ID N.º 5 o una variante de esta en: diez aminoácidos del sitio de escisión en la posición de aminoácido 43, 121, 229, 38 o 412; opcionalmente, en 10 aminoácidos N-terminal de Asp421, en 10 aminoácidos N-terminal de Val220, en 10 aminoácidos C-terminal de Ser120, en 10 aminoácidos C-terminal de Lys43, o en 10 aminoácidos C-terminal de Arg370. Un agente de detección se une opcionalmente a al menos una porción de las SEQ ID N.ºs 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 38, 39, 40 o 41.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

**[0016]**

La figura 1 son transferencias Western para GFAP y GBDP en tejido de rata tras un traumatismo craneoencefálico y su cuantificación;

La figura 2 son transferencias Western de GFAP y GBDP en LCR de rata tras un traumatismo craneoencefálico;

La figura 3 son transferencias Western de lisados cerebrales asimilados *in vitro* en comparación con muestras de CCI de rata y una muestra humana asimilada que ilustra niveles de GBDP (A) y SBDP (B);

La figura 4 representa proteólisis diferencial de GFAP respecto a GBDP tras diversas lesiones neurotóxicas;

La figura 5 representa escisiones de GFAP humana recombinante inducidas por calpaína;

La figura 6 es un diagrama de la escisión de Tau en neuronas para producir TBDP;

La figura 7 representa anticuerpos específicos de TBDP mediante transferencia Western utilizando Tau anti-total (A), anti-TauBDP-45K (B), y anti-TauBDP-35K (C);

La figura 8 representa productos de degradación de Tau de humano y de rata sondados mediante anticuerpo total de Tau (A); anticuerpo de TBDP-35K de rata (B) o anticuerpo específico de TBDP-13K de rata (C);

La figura 9 representa cultivos cerebrocorticales de rata expuestos a diversos agentes mediante (A) microscopía de contraste de fase o (b) evaluados utilizando tinción con yoduro de propidio en los núcleos a 24 h para la necrosis, y el ADN nuclear condensado teñido con Hoechst 33342 como prueba del % de apoptosis;

La figura 10 representa cultivos cerebrocorticales de rata expuestos a diversos agentes y sondados para Tau y TBDP;

La figura 11 representa Tau y TBDP tras la exposición a CCI en ratas tanto en la corteza (A, B) como en el hipocampo (C, D);

La figura 12 ilustra la escisión específica de calpaína-1 en corteza cerebral de rata tras el CCI experimental;

La figura 13 muestra la activación de calpaína-1 y calpaína-2 en corteza cerebral de rata tras el CCI;

La figura 14 ilustra la especificidad a la calpaína de Tau-BDP35K mediante la administración de SNJ-1945 *in vivo* inmediatamente después del CCI según se observa mediante transferencia Western (A) y los análisis densitométricos de esta (B);

La figura 15 muestra transferencias Western de LCR humano para GFAP y GBDP en dos pacientes (A y B) en diversos momentos tras la lesión;

La figura 16 ilustra la presencia de autoanticuerpos de suero humano dirigidos a proteínas específicas del cerebro halladas en lisado proteico de cerebro humano *post mortem* donde (A) es la carga proteica total medida mediante tinción azul brillante de Coomassie, (B) sonda de transferencia Western con suero control, o (C) sonda de transferencia Western con suero acumulado de paciente tras el TCE;

La figura 17 muestra la presencia de autoanticuerpos en suero de sujetos humanos a 72 horas y 30 días después del TCE;

La figura 18 representa la presencia de autoanticuerpo en el suero de un sujeto humano detectable en un periodo de 5 días a partir del TCE (A) y se confirma su especificidad a IgG (B);

La figura 19 muestra que los autoantígenos inducidos por TCE son específicos del cerebro;

- La figura 20 muestra que los autoanticuerpos en suero humano reconocen productos de escisión específicos de la calpaína en cerebro de rata;
- La figura 21 muestra la presencia de autoanticuerpos para GFAP, neurofascina, y PBM en suero de un sujeto humano con TCE obtenidos 10 días después de la lesión;
- 5 La figura 22 representa fracciones de intercambio iónico de lisado cerebral humano teñidas con azul de Coomassie (A) y sondadas mediante transferencia Western (B) utilizando suero de un sujeto humano obtenido 10 días después del TCE, donde la secuenciación de bandas superpuestas indica que los autoanticuerpos se dirigen a GFAP y a otras proteínas listadas en la Tabla 2;
- 10 La figura 23 ilustra experimentos de competencia de antígenos que indican la presencia de autoanticuerpos para GFAP en suero humano tras el TCE;
- La figura 24 ilustra el reconocimiento preferente de autoanticuerpos de productos de degradación de GFAP mediados por calpaína en lugar de los de GFAP intacta;
- La figura 25 muestra la presencia de autoanticuerpos en suero de pacientes humanos con TCE a través de varios grupos de estudio;
- 15 La figura 26 representa diferencias de género y de edad con respecto a los niveles de autoanticuerpos en suero tras el TCE en un estudio en humanos;
- La figura 27 representa niveles incrementados de autoanticuerpos en sujetos diagnosticados con TCE desglosados mediante la escala de coma de Glasgow (GCS, por sus siglas en inglés);
- La figura 28 representa la correlación de autoanticuerpos con supervivencia a 6 meses;
- 20 La figura 29 representa la correlación entre niveles séricos de GFAP y UCHL1 e intensidad de autoanticuerpos, (A) muestra diagramas de dispersión y (B) muestra correlaciones;
- La figura 30 representa la correlación entre GFAP, UCHL1 y SBDP145 de LCR, y la intensidad de autoanticuerpos;
- 25 La figura 31 ilustra la intensidad de autoanticuerpos en función del género (A); la intensidad de autoanticuerpos en función del resultado (B); y la intensidad de autoanticuerpos y la mortalidad en función del género (C);
- La figura 32 muestra la intensidad de autoanticuerpos en función de la supervivencia (A) y la intensidad y la predisposición de autoanticuerpos en función de la supervivencia para mujeres (B) y hombres (C);
- La figura 33 representa la intensidad de autoanticuerpos en función de la escala GCS;
- 30 La figura 34 es un diagrama de liberación nucleica a través de células neuronales durante una lesión neuronal;
- La figura 35 muestra el nivel de GFAP, UCHL1 y S100 $\beta$  en suero de sujetos humanos con TCE con una magnitud de lesión leve y moderada;
- La figura 36 representa los resultados de análisis de conglomerados de miARN;
- 35 La figura 37 es un diagrama del número de miARN identificados en muestras biológicas.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

**[0017]** La lesión en el tejido cerebral o la BHE deriva en la liberación de moléculas intracelulares tales como proteínas, fragmentos de proteínas degradadas, ADN y ARN (incluido miARN) al líquido cefalorraquídeo (LCR) o al torrente sanguíneo. La fuga de estos antígenos puede derivar en la formación de los autoanticuerpos frente a estos. La presente invención se aprovecha de la medición de la cantidad incrementada o reducida de estos biomarcadores inventivos específicos de neurona en una muestra biológica, y como tal, presenta utilidad para el diagnóstico y gestión de afección neurológica anómala. En concreto, la invención posee utilidad como un diagnóstico para identificar o clasificar una lesión neuronal, incluida una lesión relacionada con una enfermedad, por ejemplo, un traumatismo craneoencefálico (TCE) y subtipos de este, así como para identificar potenciales agentes terapéuticos efectivos para el tipo concreto de lesión cerebral que haya padecido el sujeto.

40

45

**[0018]** Los procesos presentan utilidad para detectar un trauma o afección neurológica que sea predictivo o indicativo de futura enfermedad o lesión. De forma ilustrativa, los procesos poseen utilidad como un protocolo de cribado de seguridad o de eficacia para el desarrollo de fármacos *in vivo* o *in vitro*. El desarrollo de fármacos no se limita a fármacos orientados a afecciones neurológicas. Los biomarcadores de la invención presentan también utilidad para detectar efectos secundarios neurológicos esperados o inesperados en estudios *in vivo* en animales como un medio de selección de un compuesto principal para análisis o como un medio de evaluación de seguridad de un fármaco candidato previamente identificado.

50

**[0019]** Según se utiliza en el presente documento, una «lesión» es una alteración de la integridad, actividad, nivel, solidez o estado celular o molecular, u otra alteración que se pueda localizar para un acontecimiento singular o continuado, opcionalmente una pluralidad de acontecimientos. Una lesión incluye, de manera ilustrativa, un acontecimiento de carácter físico, mecánico, químico, biológico, funcional, infeccioso, u otro modulador de características celulares o moleculares. De forma ilustrativa, una lesión es el resultado de un trauma físico tal como un impacto (p. ej., percusivo) o una anomalía biológica tal como un accidente cerebrovascular, ya sea como resultado de un bloqueo o de una fuga de un vaso sanguíneo. Un ejemplo de lesión por impacto es el traumatismo craneoencefálico (TCE). Opcionalmente, una lesión es una infección por un agente infeccioso. Un experto en la materia reconoce numerosas lesiones equivalentes que se encuentran abarcadas por los términos lesión o acontecimiento.

**[0020]** Opcionalmente, una lesión es un acontecimiento físico tal como un impacto percusivo. Un impacto es similar a una lesión percusiva, tal como el resultado de un golpe en la cabeza que deja la estructura craneal intacta o bien resulta en una brecha en esta. De forma experimental, se utilizan de forma ilustrativa varios métodos de impacto, incluido el impacto cortical controlado (CCI), tal como con una profundidad de depresión de 1,6 mm, equivalente a TCE grave en humanos. Este método se describe con detalle en Dixon, CE, *et al.*, J Neurotrauma, 1999; 16(2):109-22. Se podrá apreciar que otros métodos experimentales que producen lesión por impacto son operativos de forma similar.

**[0021]** El TCE también puede ser resultado de un accidente cerebrovascular. El accidente cerebrovascular isquémico se forma opcionalmente mediante oclusión de la arteria cerebral media (OACM) en roedores. Los niveles de proteína UCHL1, por ejemplo, aumentan tras la OACM leve, que aumentan además tras la exposición a OACM grave. La exposición a OACM leve puede derivar en un incremento de los niveles de biomarcadores en un plazo de dos horas que sea transitorio, y retornan a niveles de control en 24 horas. En cambio, la exposición a OACM grave da como resultado un aumento de los niveles de biomarcador en un plazo de dos horas tras la lesión y pueden ser mucho más persistentes, mostrando niveles estadísticamente significativos hasta 72 horas o más.

**[0022]** Sin limitarse a una teoría o modelo, una delimitación propuesta entre el traumatismo craneoencefálico leve (TCE leve) y el TCE es el incremento o la reducción apreciable de biomarcadores moleculares en fluidos biológicos tras una lesión. Entre los ejemplos representativos de marcadores moleculares se incluyen aquellos descritos en Kobeissy FH, *et al.*, Mol Cell Proteomics, 2006; 5:1887-1898. Un ejemplo de definición de TCE es la presencia de al menos un biomarcador reconocible con al menos niveles de biomarcador el doble de incrementados o disminuidos.

**[0023]** El término «biomarcador» según se utiliza en el presente documento es una proteína, ácido nucleico, u otro diferenciador útil para la medición de actividad o respuesta biológica. Un biomarcador específico de neurona es un biomarcador con relevancia para la estructura, función o actividad neuronal o glial. De forma ilustrativa, una proteína es un anticuerpo o un producto de degradación de una proteína fisiológica. Un «ácido nucleico» u «oligonucleótido» se define en el presente documento como una macromolécula compuesta por dos o más nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Los biomarcadores utilizados en el presente documento son de forma ilustrativa biomarcadores específicos o enriquecidos de neuronas, es decir, los biomarcadores son moléculas que no se encuentran normalmente en niveles considerables más allá de uno o más tipos de neuronas. De forma representativa, entre los biomarcadores se incluyen: uno o más productos de degradación de una proteína, por ejemplo, GFAP,  $\alpha$ -espectrina, UCHL1, entre otras; anticuerpos; ADN; ARN; miARN; o uno o más fragmentos de ARN, ADN, péptidos, proteínas, u otro material biológico cuya presencia, ausencia, nivel o actividad sea correlativa o predictiva de daño o enfermedad neurológica.

**[0024]** El biomarcador es un autoanticuerpo. Un autoanticuerpo es un anticuerpo que reconoce, se une, o interactúa de otra manera con un antígeno que se encuentra normalmente en un sujeto, o un tejido o célula de un sujeto. A modo de ejemplo, un antígeno es GFAP;  $\alpha$ -espectrina; neurofascina; PBM; MAP2; una esterasa ubiquitina carboxi-terminal; una hidrolasa ubiquitina carboxi-terminal; una proteína intracelular localizada neuronalmente; proteína tau asociada a microtúbulos (MAP-tau); Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP); proteínas mediadoras de respuesta a la colapsina (CRMP-1 a 5); productos de degradación de estas, cualquier otro marcador listado en una o más tablas o referencias en el presente documento, y combinaciones de los mismos.

**[0025]** De forma alternativa o adicional, un biomarcador es una porción de una proteína que es GFAP, enolasa específica de neurona (NSE), hidrolasa ubiquitina C-terminal L1 (UCHL1), proteína nuclear neuronal (NeuN), 2', 3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa), molécula de adhesión intercelular soluble-1 (sICAM-1), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), cualquier otro biomarcador listado en una o más tablas o referencias en el presente documento, y combinaciones de estos. De forma ilustrativa, la enolasa específica de neurona (NSE) se halla principalmente en neuronas; la GFAP se halla en astrocitos; y la CNPasa se halla en la mielina del sistema nervioso central. Así, un biomarcador es, por ejemplo, un producto de degradación (BDP, por sus siglas en inglés) de una proteína. En la técnica se conocen numerosos métodos para producir productos de degradación. De manera ilustrativa, la escisión proteolítica de calpaína o caspasa de una proteína específica neuronal produce uno o más BDP de esa proteína.

**[0026]** Un biomarcador es opcionalmente un ácido nucleico. De forma ilustrativa, los ácidos nucleicos son oligorribonucleótidos u oligodesoxirribonucleótidos. Como tal, un biomarcador de ácido nucleico es opcionalmente ADN o ARN que codifica al menos una porción de una proteína expresada en una neurona. Se ha utilizado ADN circulante para estudios en lupus sistémico y artritis reumatoide debido a que en estas enfermedades la cantidad de ADN en la sangre es bastante elevada (Tan *et al.*, 1966). También se ha sugerido el ADN libre en suero como un biomarcador para cánceres específicos (Leon *et al.*, 1977). Se han encontrado ADN metilado (Muller *et al.*, 2003) y ADN libre con mutaciones específicas (Silva *et al.*, 1999) en plasma y se han relacionado con cáncer. Asimismo, ha sido posible hallar ADN fetal en plasma y suero maternos (Lo *et al.*, 1997). Se ha hallado ADN circulante en el plasma de pacientes con accidente cerebrovascular agudo (Rainer *et al.*, 2003). Así, los niveles circulantes de ADN se pueden correlacionar con enfermedades. Los inventores han descubierto que la lesión neuronal deriva en incrementos de los niveles de ADN circulante de origen neuronal. La medición de niveles incrementados de ADN en el LCR o el suero es un indicador de lesión neuronal y de gravedad de la lesión.

**[0027]** Se ha considerado que el ARN no funcionaría como un marcador de enfermedad o lesión debido a que el ARN se degrada fácilmente en la sangre. Aunque este es el caso del ARN añadido de forma exógena, el ARN endógeno de tejidos que han sufrido traumatismo puede mostrar una mayor estabilidad y, por consiguiente, ser útil como un biomarcador. Sin limitarse a una teoría concreta, el ARN endógeno puede formar un complejo con proteínas y protegerse de la degradación cuando se encuentra en cuerpos apoptóticos (Hasselman *et al.*, 2001). Además, el ARN puede ser más específico del sitio de lesión y el tipo de enfermedad debido a la capacidad para identificar rápidamente su secuencia y para correlacionar esta secuencia con una expresión del ARN específica del tipo de célula. De este modo, un biomarcador es opcionalmente una molécula de ARN. Entre las moléculas de ARN se incluyen ARNm, ARNr, miARN, ARNt, y miARN.

**[0028]** Un biomarcador es opcionalmente un miARN. Los microARN (miARN) son moléculas de ARN no codificante que son capaces de regular la expresión génica de forma postranscripcional a través de la degradación del ARN mensajero, reduciendo así la expresión de proteínas. Un biomarcador de miARN es un miARN que regula la expresión de un gen que codifica una o más proteínas específicas de neurona, tales como cualquiera de aquellas listadas en las tablas o de otra manera en el presente documento.

**[0029]** Un proceso incluye medir la cantidad de uno o más biomarcadores en una muestra biológica. Un biomarcador se mide mediante cualquier método o proceso conocido en la técnica o descrito en el presente documento para determinar una cantidad absoluta, una cantidad relativa, o un valor representativo de cantidad, p. ej., un aumento o disminución de la fluorescencia en relación con los antecedentes o con otro comparador. Opcionalmente, se miden uno, dos, tres, cuatro o más biomarcadores de forma simultánea o secuencial a partir de una o más muestras biológicas. Un segundo biomarcador o un biomarcador adicional es opcionalmente distinto de un primer biomarcador.

**[0030]** De forma ilustrativa, un biomarcador es un producto de degradación de una proteína, se une a una proteína o porción de esta, codifica una proteína o porción de la misma, o regula la expresión de una proteína, donde la proteína es: esterasa ubiquitina carboxi-terminal L1 (UCHL1); enolasa específica de neurona (NSE); un producto de degradación de espectrina (SBDP), por ejemplo SBDP150, SBDP150i SBDP145, o SBDP120; proteína S100 B de unión al calcio (S100β); proteína asociada a microtúbulos (MAP), opcionalmente MAP2, MAP1, MAP3, MAP4, MAP5; proteína básica de mielina (PBM); Tau, por ejemplo MAP-tau o BDP de tau; proteína del neurofilamento (NF); receptor cannabinoide (CB); proteínas CAM; proteína sináptica; proteínas mediadoras de respuesta a la colapsina (CRMP-1 a 5); óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); proteína nuclear neuronal (NeuN); peptidasa específica del cisteinilo (CSPasa); neuroserpina; alfa-internequina; proteína de cadena ligera 3 (LC3); neurofascina; los transportadores de glutamato (EAAT); nestina; cortin-1,2,3'- nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa); βIII-tubulina, o cualquier biomarcador listado en la Tabla 1, o en otra tabla del presente documento, o combinaciones de estos.

**Tabla 1:**

UCHL1	Glucógeno fosforilasa (forma BB) GP-BB	Precerebelina
Isoformas de PBM	CRMP-2	Cortexina
SBDP150 (calpaína)	NP25, NP22; Transgelina-3	EMAP-II
SBDP120 (caspasa)	SBDP150i (caspasa)	BDP de calcineurina
Fragmento de PBM (10/8K)	CaMPK-IIα	MAP2
SBDP145	MOG	N-Cadherina
Sinaptofisina	PLP	N-CAM
βIII-Tubulina	PTPasa (CD45)	Sinaptobrevina
Tau-BDP-35K (calpaína)	BDP de nesprina	MAP1A (MAP1)

NF-L-BDP1	OX-42	MAP1B (MAP5)
NF-M-BDP1	OX-8	Proteína de prion
NF-H-BDP1	OX-6	PEP19; PCP4
Sinaptotagmina	CaMPKIV	Sinaptotagmina-BDP1
PSD93-BDP1	Dinamina	BDNF
AMPA-R-BDP1	Clatrina HC	Nestina
BDP de NMDA-R	SNAP25	IL-6
SBDP150i (caspasa)	Profilina (¿BDP?)	IL-10
MAP2-BDP1 (calpaína)	Cofilina (¿BDP?)	$\alpha$ II-espectrina SBDP 150+145
MAP2-BDP2 (caspasa)	BDP de APP (Calpaína)	NG2; Fosfacano, neurocano; versicano
alfa-sinucleína	NSF	Fragmento de receptor de Ach (Nicotínico, Muscarínico)
Sinapsina 1	IL-6	I-CAM
BDP de sinapsina 2	MMP-9	V-CAM
NeuN	S100 $\beta$	AL-CAM
GFAP	Neuroglobina	CNPasa
p24; VMP	Autoanticuerpo de UCHL1	Neurofascinas
PSD95	Tau-BDP-35K (calpaína)	Neuroserpina
$\alpha$ 1,2-Tubulina	Tau-BDP-45K (caspasa)	EAAT (1 y 2)
$\beta$ 1,2-Tubulina	Huntingtin-BDP-1 (calpaína)	Nestina
Estatmina-2,3,4 (Dendrítica)	Huntingtin-BDP-2 (caspasa)	Sinaptopodina
Estriatina-BDP1	BDP de proteína de prion	
Sinaptojanina-1,2-BDP1	PBM (mitad de N-terminal)	
betall-Espectrina		$\beta$ -sinucleína
betall-Espectrina-BDP110 (calpaína)	Calbindina-9K	Resistina
betall-Espectrina-BDP85 (caspasa)	Tau-Total	Neuropilinas
Receptor cannabinoide 1 (CB1)	NSE	Orexina
Receptor cannabinoide 2 (CB2)	CRMP-1	Fractalquina
Isoformas de PBM 14K+17K	CRMP-3	$\beta$ -NGF
Neurocalcina-delta (Glía)	CRMP-4	L-selectina
Iba1 (Microglía)	CRMP-5	iNOS
		DAT
Periferina (PNS)		Vimentina
LC3	Cerebelina 3	Beclina-1

5 [0031] La secuencia de aminoácidos de GFAP humana se encuentra en los n.<sup>os</sup> de acceso de GenBank NP\_002046 y NP\_001124491 para las isoformas 1 y 2 respectivamente. La secuencia de aminoácidos de tau humana se encuentra en los n.<sup>os</sup> de acceso de GenBank NP\_005901 y NP\_776088. La secuencia de aminoácidos de tau de rata se encuentra en el n.<sup>o</sup> de acceso de GenBank NP\_058908 para la versión de aminoácido 374. Las secuencias halladas en cada uno de estos números de acceso y en otros números de acceso que se encuentran en el presente documento se incorporan en la presente mediante referencia como si cada secuencia se hubiera listado de forma completa y explícita.

10 [0032] Un biomarcador es opcionalmente cualquier proteína o porción de esta, ácido nucleico, o anticuerpo que muestre una expresión aumentada o bien una expresión reducida durante o después de una lesión o acontecimiento. La expresión se reconoce como síntesis, por lo que un aumento de la expresión implica un aumento de la síntesis del biomarcador. Opcionalmente, la síntesis es la generación de un producto de escisión donde la proteasa, p. ej. calpaína o caspasa, descompone una proteína para sintetizar o producir un producto de degradación. A modo de ejemplo, la lesión neuronal puede activar una calpaína o caspasa que a su vez



descompone enzimáticamente GFAP para producir uno o más GBDP. Por consiguiente, se entiende que se producen GBDP, esto es, se sintetizan, durante o después de la lesión o acontecimiento. De forma similar, se producen autoanticuerpos a lo largo del período posterior o durante una lesión o acontecimiento. Así, se entiende que se sintetizan autoanticuerpos. Normalmente, no se expresan ácidos nucleicos a ningún nivel, o se expresan a ciertos niveles dentro de una célula. Una lesión o acontecimiento puede alterar el ritmo con el que se traduce ARN, tal como miARN, a partir de ADN genómico. Así, se entiende que los ácidos nucleicos muestran un aumento o bien una disminución de la síntesis durante o después de una lesión o acontecimiento.

**[0033]** Se puede detectar o medir cualquier cantidad de biomarcadores, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. La detección puede ser simultánea o bien secuencial, y puede ser de la misma muestra biológica o de múltiples muestras del mismo sujeto o de distintos sujetos. La detección de múltiples biomarcadores se lleva a cabo opcionalmente en la misma cámara de ensayo. Opcionalmente, el proceso de la invención incluye además comparar la cantidad de un primer biomarcador y la cantidad del al menos un biomarcador neuroactivo adicional frente a niveles normales de cada uno del primer biomarcador y el un biomarcador neuroactivo adicional para determinar la afección neurológica del sujeto.

**[0034]** La presente exposición se describe con respecto a UCHL1 o GFAP.

**[0035]** En el presente documento se describe también un biomarcador que es un producto de degradación de GFAP (GBDP). GFAP se asocia con células gliales tales como astrocitos. Un biomarcador es opcionalmente uno o más GBDP. Los GBDP presentan opcionalmente un peso molecular que oscila entre 38 y 52 kDa. Un GBDP es opcionalmente un producto de digestión proteolítica de GFAP. Entre las proteasas representativas se incluyen calpaína y caspasa.

**[0036]** En el presente documento se describe también un biomarcador que es un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido. Un oligonucleótido es una molécula de ADN o de ARN. Ejemplos preferidos de moléculas de ARN son moléculas de ARNm y de miARN.

**[0037]** Históricamente se creía que las moléculas de ARN presentaban vidas medias cortas en el plasma. Más recientemente, estudios han indicado que las moléculas de ARN pueden estar protegidas en plasma mediante vesículas de proteínas o de lípidos. De este modo, las moléculas de ARN liberadas durante o después de una lesión, por ejemplo, se pueden detectar en sangre entera, plasma, suero, LCR, u otro material biológico y relacionarse con la presencia de lesión en los procesos. En la técnica se conocen numerosos métodos para aislar ARN de una muestra biológica. Por ejemplo, los métodos descritos en E1-Hefnaway, T, *et al.*, *Clinical Chem.*, 2004; 50(3):564-573. Opcionalmente, una muestra biológica se filtra antes de detectar o medir un ácido nucleico. El filtrado elimina material celular adicional, produciendo mediciones más precisas de ácidos nucleicos del biomarcador. En la técnica se conocen métodos para filtrar una muestra biológica; por ejemplo, según se describe en Rainer, TH, *Clin. Chem.*, 2004; 50:206-208.

**[0038]** En el presente documento se describe ARN que codifica o regula la expresión de UCHL1 o GFAP detectada o medida. El ARN de UCHL1 humana o el ADNc derivado de este es de secuencia conocida y se puede encontrar en la base de datos del NCBI con el número de acceso NM\_004181. Un experto en la materia sabe que otras secuencias de ARN relevantes en el TCE se pueden encontrar de forma similar en la base de datos del NCBI, tales como aquellas que codifican proteínas listadas en las tablas del presente documento. Como otros ejemplos, la secuencia de ARNm para GFAP se encuentra en el número de acceso NM\_001131019.1 y NM\_002055.3 para dos isoformas de GFAP.

**[0039]** Entre los ejemplos de métodos para detectar o medir ácidos nucleicos se incluyen métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo, PCR o RT-PCR. Se pueden medir ácidos nucleicos utilizando metodologías independientes de PCR, por ejemplo, espectrometría de masas, fluorescencia, tinción, u otro método conocido en la técnica. El uso de chips de ADN se emplea opcionalmente para detectar o medir el nivel de uno o muchos biomarcadores de ácido nucleico en una muestra. El hecho de crear y utilizar chips de ADN para la detección y medición de ácidos nucleicos se conoce en la técnica. Los diseños de cebadores y sondas también se encuentran dentro del nivel de conocimiento de la técnica. Cualquier sonda y cebador adecuados, así como marcas en los mismos, son operativos para la detección de ácido nucleico. De forma ilustrativa, el diseño de cebador y sonda se puede llevar a cabo utilizando programas automatizados disponibles a partir de fuentes comerciales. De forma alternativa, numerosos proveedores comerciales proporcionan servicios de diseño de cebadores y sondas, incluido Applied Biosystems (Foster City, California).

**[0040]** Un proceso para detectar una afección neurológica incluye opcionalmente obtener una muestra biológica a partir de un sujeto que se puede sospechar que presenta una afección neurológica; medir una cantidad de un biomarcador específico de neuronas en la muestra; comparar el nivel del biomarcador detectado con el nivel del mismo o de distinto biomarcador de un sujeto sin una afección neurológica para obtener una proporción; y diagnosticar o detectar la presencia o ausencia de una afección neurológica en el sujeto en función de la proporción.

**[0041]** Opcionalmente, un proceso implica analizar la muestra biológica para determinar la presencia de una pluralidad de biomarcadores. Una pluralidad puede ser cualquier número superior a uno. Opcionalmente, se analizan dos biomarcadores. De forma ilustrativa, los biomarcadores son biomarcadores relacionados con

UCHL1 y GFAP. Se pueden analizar de forma simultánea o secuencial más biomarcadores en los procesos de la invención, incluyendo por ejemplo tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 20, 50, 100, 1000, o cualquier número comprendido entre estos o superior.

- 5 **[0042]** Entre los métodos representativos para la detección y cuantificación de biomarcadores se incluye la PCR en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés). La RT-PCR permite la amplificación simultánea y la cuantificación de una pluralidad de biomarcadores de manera simultánea. De forma alternativa, resultan del mismo modo operativas la espectrometría de masas, tal como espectrometría de masas con ionización por electrospray junto con la detección del tiempo de vuelo, y la cromatografía líquida de alta resolución. Se estima que otros métodos son igualmente operativos para la detección, como podrá apreciar un experto en la materia.
- 10 **[0043]** En el presente documento se describen numerosas moléculas de miARN que son operativas como biomarcadores. El término «miARN» se utiliza de acuerdo con su significado simple y habitual, y hace referencia a una molécula de microARN hallada en eucariotas que está implicada en la regulación génica basada en ARN. Entre los ejemplos se incluyen moléculas de miARN que regulan la expresión de una o más proteínas listadas en la Tabla 1. Se han identificado varias moléculas de miARN y son operativas como biomarcadores en los
- 15 métodos. Por ejemplo, moléculas de miARN descritas en Redell, JB, *et al.*, J. Neurosci. Res., 2009; 87:1435-48; Lei, P., *et al.*, Brain Res., doi:10.1016/j.brainres.2009.05.074; Lu, N, *et al.*, Exp. Neurology, 2009; doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.015; y Jeyaseelan, K, *et al.*, Stroke, 2008; 39:959-966. Estos métodos, o modificaciones de los mismos, son reconocidos por un experto en la materia y se pueden utilizar en el presente método.
- 20 **[0044]** Un proceso para determinar una afección neurológica incluye opcionalmente la detección o medición de uno o más anticuerpos en una muestra biológica. Un anticuerpo es opcionalmente un autoanticuerpo. Los autoanticuerpos se dirigen a antígenos liberados desde un sitio de trauma neurológico como TCE, enfermedad, lesión u otra anomalía. Sin limitarse a una teoría concreta, un TCE provoca daño celular que libera contenidos de la membrana intracelular o celular en el LCR o en el torrente sanguíneo. Los niveles de muchas de estas
- 25 proteínas, como aquellas listadas en la Tabla 1, y otras tablas en el presente documento, o ácidos nucleicos que codifican las proteínas o regulan su expresión, no se encuentran normalmente presentes en fluidos biológicos que no sean del citoplasma o la membrana celular de tejido neuronal, tal como tejido cerebral. La presencia de estos antígenos deriva en la producción de autoanticuerpos para estos antígenos en un sujeto. La detección de un autoanticuerpo como un biomarcador se utiliza opcionalmente para diagnosticar la presencia de una afección
- 30 neurológica anómala en un sujeto.
- [0045]** En el documento de patente americana n.º 6,010,854 se describen métodos para producir antígenos y métodos de cribado de autoanticuerpos para receptores de glutamato neuronales. Estos métodos son igualmente aplicables a la presente descripción. Se reconoce que, del mismo modo, resultan operativos otros métodos de detección de anticuerpos, incluidos por ejemplo ELISA, transferencia Western, espectrometría de masas,
- 35 cromatografía, tinción, y otras conocidas en la técnica.
- [0046]** Se ha descubierto que varios antígenos producen autoanticuerpos tras el comienzo de una afección neurológica. Dichos antígenos son aquellos que se listan, por ejemplo, en la Tabla 2.

**Tabla 2: Ejemplos de autoantígenos proteicos identificados mediante MS/MS en la figura 22**

GFAP y GBDP  
 Polipéptido ligero de neurofilamento (NF-L)  
 Polipéptido medio de neurofilamento (NF-M)  
 Polipéptido pesado de neurofilamento (NF-H)  
 Protón ATPasa de tipo V  
 Endofilina-A1  
 Vimentina  
 Gamma-enolasa (NSE)  
 Proteína 2 asociada a microtúbulos  
 Proteína 2 relacionada con dihidropirimidinas  
 Alfa-internexina  
 Neuroserpina  
 Neuromodulina  
 Sinaptotagmina-1  
 Canal de potasio regulado por voltaje

**[0047]** Además, varios de estos y otros antígenos están asociados a lesión cerebral. En la Tabla 3 se listan ejemplos concretos ilustrativos de autoantígenos relacionados con lesión cerebral.

**Tabla 3: Ejemplos de autoantígenos relacionados con lesión cerebral**

αII-espectrina  
 SBDP  
 NSE  
 UCHL1  
 MAP2  
 PBM  
 Tau  
 NF-L,M,H  
 S100B  
 βIII-tubulina

**Tabla 4: Ejemplos de autoantígenos inducidos por lesión cerebral en función de la antigenicidad presente**

Canal de calcio regulado por voltaje VGCC (tipo P/Q) (como en el síndrome miasténico de Lambert-Eaton)  
 Canal de potasio regulado por voltaje (VGKC) (como en la encefalitis límbica, el síndrome de Isaac, la neuromiotonía autoinmune).  
 Ri (anticuerpo-2 nuclear antineuronal) (como en la opsoclonia)  
 Hu y Yo (células cerebelosas de Purkinje) (como en el síndrome cerebeloso paraneoplásico)  
 Anfifisina (como en el síndrome cerebeloso paraneoplásico)  
 Ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (como en la diabetes mellitus tipo 1, el síndrome de la persona rígida)  
 Acuaporina-4 (neuromielitis óptica; enfermedad de Devic)  
 Neuronas de los ganglios basales (como en la corea de Sydenham, trastorno pediátrico neuropsiquiátrico autoinmune asociado a estreptococo (PANDAS))  
 Homer 3 (ataxia cerebelosa idiopática subaguda)  
 Proteínas Zic (proteínas con dedo de zinc) (como en el síndrome de Joubert - malformación del cerebelo)  
 ANNA 3 (autoantígeno cerebral)  
 Anticuerpo de célula de Purkinje (PCA-2)  
 PKC  $\gamma$  (degeneración cerebelosa paraneoplásica)  
 SOX1 (síndrome miasténico de Lambert-Eaton (LEMS))  
 Gefirina (síndrome de la persona rígida)  
 Ma2  
 CV2 (= CRMP5)  
 N-metil-D-aspartato (NMDA) - desarrollo de deterioro de memoria  
 mGluR1 (ataxia cerebelosa)  
 Receptor nicotínico de acetilcolina (como en miastenia gravis)  
 Recoverina  
 Enolasa  
 TULIP-1 (proteína 1 similar a Tubby)

- 5 **[0048]** En el presente documento se da a conocer una proteína de longitud completa, como cualquier proteína listada en las Tablas 1-4, o un producto de degradación de esta, que es operativa como un antígeno de cribado para autoanticuerpos. Por ejemplo, UCHL1 es antigénica y produce autoanticuerpos en un sujeto. La secuencia para la proteína UCHL1 humana se encuentra en el número de acceso de NCBI NP\_004172.2. Del mismo modo, la secuencia para GFAP humana se halla en el número de acceso de NCBI NP\_002046.1. Entre otros antígenos
- 10 ilustrativos se incluyen por ejemplo  $\alpha$ II-espectrina o productos de degradación de esta, MAP, Tau, Neurofascina, CRMP-2, muestra bruta de MAP2, PBM, y lisado cerebral humano o cualquier subfracción del mismo.

**[0049]** Cualquier método adecuado para producir péptidos y proteínas de las Tablas 1-4 es operativo en el presente documento. De manera ilustrativa, se utilizan de forma opcional sistemas de clonación y expresión proteica utilizados con o sin etiquetas de purificación. Los métodos ilustrativos para la producción de péptidos

5 inmunogénicos incluyen síntesis peptídica sintética mediante métodos conocidos en la técnica. En la técnica se conocen métodos químicos de síntesis peptídica e incluyen síntesis peptídica de fase sólida y síntesis peptídica de fase de solución o mediante el método de Hackeng, TM, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997; 94(15):7845-50. Cualquiera de los métodos es operativo para la producción de antígenos operativos para el cribado de muestras biológicas respecto a la presencia de autoanticuerpos.

[0050] Según se utiliza en el presente documento, «péptido» hace referencia a péptidos de cualquier longitud e incluye proteínas. Los términos «polipéptido» y «oligopéptido» se utilizan en el presente documento sin pretender ninguna limitación de tamaño concreta, a no ser que, por el contrario, se indique un tamaño en particular.

10 [0051] Se aprecia que los patrones de biomarcadores tales como ARN, miARN, ADN, y autoanticuerpos resultan operativos para localizar el sitio y la gravedad de la anomalía neuronal. De manera ilustrativa, el daño en el cerebro revela un patrón distinto de una pluralidad de biomarcadores respecto al daño causado en otras regiones del sistema nervioso central. Asimismo, el daño en el hipocampo producirá un patrón diferente de biomarcadores con respecto al daño en el lóbulo frontal. Así, la localización de lesión se consigue mediante la detección comparativa de una pluralidad de biomarcadores. Por ejemplo, los niveles de miARN en células se alteran con patrones específicos en respuesta a TCE. (Véase Redell, J, *et al.*, J. Neurosci. Res., 2009; 87:1435-1448.) Los inventores han descubierto sorprendentemente que los niveles de biomarcadores de miARN que regulan la expresión de las proteínas de la Tabla 1 se alteran de forma similar mediante la regulación por aumento o bien la regulación negativa dependiendo de la gravedad de lesión o del tiempo transcurrido desde el inicio de la lesión. El patrón de miARN y de otros biomarcadores varía conforme progresa la lesión o enfermedad. Esto puede ser un resultado de acontecimientos de lesiones secundarias, apoptosis celular tardía, o de otro mecanismo que altere la liberación de ARN, ADN o proteína. Redell, J, ilustra la alteración de biomarcadores de miARN en células tras 3 horas y tras 24 horas. Algunos miARN se regulan por aumento a las 3 horas, mientras que otros únicamente se regulan por aumento a las 24 horas. Se observan resultados similares para la regulación negativa de miARN. Así, la regulación de biomarcadores de miARN, el método para su detección, y la alteración temporal de la expresión de Redell, J, *et al.*, J. Neurosci. Res., 2009; 87:1435-1448 se pueden aplicar igualmente en la presente descripción. Sucede lo mismo con el carácter temporal de la expresión de miARN en respuesta a un accidente cerebrovascular, según se ha observado en Jeyaseelan, K, *et al.*, Stroke, 2008; 39:959-966. Algo que ni apreciaron ni contemplaron investigadores anteriores es que el ácido nucleico y las proteínas migran a la sangre o al LCR tras una lesión. Se consideraba que los niveles de biomarcadores, ARN en concreto, permanecerían localizados en el núcleo o posiblemente en el citoplasma de una célula. La capacidad del inventor para detectar niveles de estos biomarcadores en muestras biológicas no celulares tales como sangre (o una fracción de esta) o LCR proporcionó un proceso de detección mucho más sólido y simplificado para determinar la afección neurológica o el riesgo de afección neurológica en un sujeto.

35 [0052] Se describen cribados de una muestra biológica para un primer y un segundo biomarcador. Del mismo modo, son operativas cantidades superiores. Los autoanticuerpos de GFAP son los primeros biomarcadores. Debido a que GFAP se asocia a células gliales como astrocitos, preferiblemente el otro biomarcador se asocia a la salud de un tipo de célula diferente relacionada con la función neuronal. Más preferiblemente, el otro tipo de célula es un axón, neurona o dendrita. A través del uso de un ensayo de la invención que incluye biomarcadores asociados a células gliales, así como a al menos un otro tipo de célula neural, el tipo de células neurales se estresa o se destruye, y además se cuantifican los resultados de la afección neurológica. Una medición sinérgica de biomarcador de GFAP, opcionalmente junto con al menos un biomarcador adicional, y la comparación de la cantidad de biomarcador de GFAP y el biomarcador adicional con niveles normales de los marcadores proporcionan una determinación de la afección neurológica del sujeto. Entre los niveles de biomarcador específicos que al medirse junto con un biomarcador de GFAP permiten una mejor evaluación de la afección neurológica de un sujeto se incluyen de manera ilustrativa SBDP145 (necrosis neuronal aguda mediada por calpaína), SBDP120 (apoptosis neuronal tardía mediada por caspasa), UCHL1 (marcador de daño del cuerpo celular neuronal), y MAP-2.

50 [0053] La naturaleza de una proteína concreta asociada a un biomarcador permite una determinación ajustada de la extensión, ubicación y gravedad de la lesión. La Tabla 5 representa ubicaciones biológicas de proteínas relacionadas con biomarcadores de la invención. Se entiende que los incrementos de autoanticuerpos o ARN, por ejemplo, respecto a periferina equivalen a distintas anomalías que las de los incrementos de autoanticuerpos o ARN respecto a UCHL1.

Tabla 5:

Clase	Gen#1	Gen#2	Gen#3
Axonal	<b>SBDP145</b> <b>SBDP120</b> <b><math>\alpha</math>II-Espectrina</b>	<b><math>\beta</math>II-SBDP110, <math>\beta</math>II-SBDP-108, -85 SBDP150</b>	<b>Tau-BDP-14K(calp)</b> <b>Tau-BDP-40K (casp)</b>

Dendrítica	$\beta$ III-tubulina de MAP2	P24	BDP de MAP2
Cuerpo celular	UCH-L1	GP-BB Estatmina-2,3 Proteína de prion	NP25 $\alpha$ -sinucleína $\beta$ -sinucleína
Neuroregen.	CRMP-2	Nestina	
Núcleo	NeuN		Ox-GAPDH
Presináptica	Sinaptotagmina	Sinaptofisina	Sinapsina1,2
Postsináptica	CaMKIIa	PSD-93 PSD-95	
Mielina	PBM de fragmento PBM	MOG	Frag. de PBM (Nuevo-C)
Glía	GFAP		
Microglía	IL-6	Iba1	OX-8, OX-6 OX-42
Neurovascular.	N-CAM	N-Cadherina	I-CAM, L-CAM
PNS		Periferina	

- [0054]** La detección de biomarcadores de la invención también resulta operativa para cribar potenciales fármacos candidatos o para analizar la seguridad de fármacos candidatos identificados anteriormente. Estos ensayos pueden ser o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Los protocolos de cribado o de ensayo *in vivo* incluyen por ejemplo la medición de un biomarcador en un animal, incluido por ejemplo un ratón, una rata o un humano. Opcionalmente, se combinan estudios para determinar o monitorizar niveles, tales como de biomarcadores de UCHL1 o GFAP, con análisis de comportamiento o análisis de déficit motor tales como: pruebas de coordinación motriz, incluyendo por ejemplo Rotarod, prueba de marcha en barra, análisis de la marcha, prueba de la cuadrícula, prueba de suspensión y prueba de la cuerda; pruebas de sedación, incluyendo por ejemplo aquellas que detectan actividad locomotora espontánea en el examen de campo abierto; pruebas de sensibilidad para alodinia (pruebas de baño frío, pruebas de placa caliente a 38 °C y pruebas de Von Frey); pruebas de sensibilidad para hiperalgnesia (pruebas de placa caliente a 52 °C y pruebas Randall-Sellito); y análisis de EMG, como de conducción nerviosa motora y sensitiva, de potencial de acción muscular compuesto (CMAP) y de reflejo de onda h.
- [0055]** Los análisis de biomarcador descritos resultan operativos, por ejemplo, para detectar, diagnosticar, o tratar un estado patológico o para el cribado de químicos o de otros agentes terapéuticos para tratar la enfermedad. Entre las enfermedades o afecciones se incluyen por ejemplo, sin carácter limitativo; enfermedades neurodegenerativas; enfermedades relacionadas con la mielina, como esclerosis múltiple; accidente cerebrovascular; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); quimioterapia; cáncer; enfermedad de Parkinson; anomalías de la conducción nerviosa derivadas de anomalías químicas o fisiológicas, tales como neuritis cubital y síndrome del túnel carpiano; otras neuropatías periféricas, que incluyen por ejemplo el aplastamiento del nervio ciático (neuropatía traumática), estreptozocina (STZ) (neuropatía diabética), y neuropatías inducidas por antimitóticos (neuropatía inducida por quimioterapia); encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE); hipersensibilidad de tipo retardado (DTH); artritis reumatoide; epilepsia; dolor; dolor neuropático; y trauma intrauterino.
- [0056]** Los análisis de lesión por explosión en un sujeto revelan varias correlaciones entre biomarcadores y lesión neuronal. La lesión neuronal es opcionalmente el resultado de una explosión de cuerpo entero, la fuerza de explosión en una porción concreta del cuerpo, o el resultado de otro trauma o enfermedad neuronal que produce niveles detectables o diferenciables de biomarcadores. Así, la identificación de vías patógenas de lesión cerebral por explosión primaria (BBI) en modelos experimentales reproducibles resulta útil para el desarrollo de algoritmos de diagnóstico para diferenciar entre TCE grave, moderado y leve (TCE leve) del trastorno de estrés

postraumático (TEPT). Por consiguiente, se han implementado una serie de modelos experimentales en animales para estudiar mecanismos de impacto por onda expansiva e incluyen roedores y animales más grandes, como ovejas. No obstante, debido al carácter más bien genérico de los generadores de explosiones utilizados en los distintos estudios, los datos sobre mecanismos de lesión cerebral y biomarcadores putativos han sido difíciles de analizar y comparar.

**[0057]** Para proporcionar correlaciones entre afección neurológica y cantidades medidas de biomarcadores, se recogen, por ejemplo, muestras de LCR o suero a partir de sujetos, estando sometidas las muestras a medición de biomarcadores. Una muestra es opcionalmente una muestra biológica. Los niveles detectados de biomarcadores de GFAP están por tanto opcionalmente correlacionados con los resultados de la tomografía computarizada, así como de la escala GCS. En función de estos resultados, se ha desarrollado y validado un ensayo (Lee *et al.*, Pharmacological Research 23:312-328, 2006). Se reconoce que los biomarcadores de GFAP, además de obtenerse a partir de LCR y suero, también se obtienen fácilmente a partir de sangre, plasma, saliva, orina, así como biopsia de tejido sólido. A pesar de que el LCR es un fluido de muestreo utilizado de forma habitual debido a su contacto directo con el sistema nervioso, se podrá apreciar que otros fluidos biológicos presentan ventajas al obtener muestras para otros propósitos y, por consiguiente, permiten la determinación inventiva de afección neurológica como parte de una serie de exámenes llevados a cabo en una única muestra, como sangre, plasma, suero, saliva u orina.

**[0058]** Se obtiene una muestra biológica de un sujeto por medio de técnicas convencionales. Por ejemplo, se obtiene opcionalmente LCR mediante punción lumbar. La sangre se obtiene opcionalmente mediante venopunción, mientras que el plasma y el suero se obtienen fraccionando sangre entera de acuerdo con métodos conocidos. Se aprecia que el LCR se obtiene de forma opcional mediante canulación u otra técnica. La sangre se obtiene opcionalmente mediante otra técnica, por ejemplo, punción cardíaca. Las técnicas quirúrgicas para la obtención de muestras de tejido sólido se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos para obtener una muestra de tejido del sistema nervioso en textos de neurocirugía convencionales, 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, 1.<sup>a</sup> ed., de David G. T. Thomas, WB Saunders Co., 1993; y Cranial Microsurgery: Approaches and Techniques, de L. N. Sekhar y E. De Oliveira, 1.<sup>a</sup> ed., Thieme Medical Publishing, 1999. También se describen métodos para obtener y analizar tejido cerebral en Belay *et al.*, Arch. Neurol. 58: 1673-1678 (2001); y Seijo *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38: 3892-3895 (2000).

**[0059]** Opcionalmente, un biomarcador es selectivo para detectar o diagnosticar afecciones neurológicas tales como lesión cerebral y similares. Un biomarcador es opcionalmente tanto específico como efectivo para detectar y distinguir niveles de TCE. Dichos biomarcadores se denominan de forma opcional biomarcadores neuroespecíficos o neuroactivos.

**[0060]** Se podrá apreciar que el carácter temporal de la presencia o actividad de biomarcador resulta operativo como un indicador o distinguidor de subtipo de TCE. En un ejemplo no limitativo, la gravedad de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) experimental se correlaciona con el mantenimiento temporal de biomarcadores de UCHL1 en LCR. La OACM de 30 minutos produce niveles máximos transitorios de biomarcador de UCHL1 en 6 horas y disminuyen rápidamente, mientras que la OACM de 2 horas produce niveles de biomarcador de UCHL1 sostenidos durante hasta tres días. Del mismo modo, la prevalencia de otros biomarcadores en diversos momentos tras la lesión resulta operativa para distinguir un subtipo de TCE. Aparecen GBDP en muestras biológicas que incluyen LCR humano después de una lesión percusiva por explosión en un plazo de 24 horas tras la lesión, e incrementan su intensidad hasta 7 días como máximo después de la lesión. Se observan resultados similares para SBDP, tal como SBDP 150/145. Por lo general, se observan autoanticuerpos en un plazo de cinco días tras la lesión, con cantidades crecientes hasta 30 días después de la lesión.

**[0061]** Los análisis de biomarcador se llevan a cabo de forma opcional utilizando muestras o fluidos biológicos. Entre las muestras biológicas representativas y operativas en el presente documento se incluyen, por ejemplo, células, tejidos, líquido cefalorraquídeo (LCR), LCR artificial, sangre entera, suero, plasma, fluido citosólico, orina, heces, fluidos estomacales, fluidos digestivos, saliva, fluido nasal u otro fluido de las vías respiratorias, fluidos vaginales, semen, tampón salino, solución salina, agua, u otro fluido biológico reconocido en la técnica. Se podrá apreciar que dos o más muestras biológicas separadas se analizan opcionalmente para determinar la afección neurológica del sujeto. Opcionalmente, una muestra biológica no es una célula, ni un material citoplasmático o nucleoplasmático celular.

**[0062]** Además de en el aumento de la expresión celular, también aparecen biomarcadores en fluidos biológicos que se comunican con células dañadas. La obtención de fluidos biológicos como líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, plasma, suero, saliva y orina de un sujeto resulta normalmente mucho menos invasiva y traumática que la obtención de una muestra para biopsia de tejido sólido. En concreto, se utiliza frecuentemente LCR para detectar daño neurológico en un sujeto, debido a que se encuentra en contacto inmediato con el sistema nervioso y se puede obtener fácilmente. El suero es una muestra biológica utilizada habitualmente debido a que se puede obtener fácilmente y presenta un riesgo mucho menor de posterior lesión o efecto secundario para un sujeto donante.

**[0063]** Para proporcionar correlaciones entre afección neurológica y cantidades medidas de biomarcadores, se recogen muestras de LCR o suero de sujetos como ejemplos concretos, sometiéndose las muestras a medición de autoanticuerpos relativos a GFAP. Los sujetos varían según la afección neurológica. Por lo tanto, los niveles de biomarcadores detectados se correlacionan opcionalmente con los resultados de tomografía computarizada o de escala GCS. En función de estos resultados, se ha desarrollado y validado un ensayo (Lee *et al.*, Pharmacological Research 23:312-328, 2006). Se aprecia que los biomarcadores, además de obtenerse a partir de LCR y suero, se pueden obtener fácilmente a partir de sangre, plasma, saliva, orina, así como de biopsia de tejido sólido. Aunque el LCR es un fluido de muestreo que está en contacto directo con el sistema nervioso, se podrá apreciar que otros fluidos biológicos presentan ventajas al tomar muestras para otros fines, y, por consiguiente, permiten la determinación de afección neurológica opcionalmente como parte de una serie de exámenes llevados a cabo en una única muestra, como sangre, plasma, suero, saliva u orina.

**[0064]** Tras un traumatismo, las células nerviosas en un sujeto expresan niveles o actividades alteradas de una o más proteínas o moléculas de ácido nucleico respecto a las que muestran células no sometidas al traumatismo. Así, las muestras que contienen células nerviosas, p. ej., una biopsia de un tejido del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico son muestras biológicas adecuadas. Sin embargo, además de células nerviosas, otras células que expresan de forma ilustrativa GFAP incluyen, por ejemplo, cardiomiocitos, miocitos en músculos esqueléticos, hepatocitos, células renales y células de los testículos. Una muestra biológica que incluye dichas células o fluido secretado de estas células se podría utilizar también en una adaptación de los métodos para determinar y/o caracterizar una lesión en tales células no nerviosas.

**[0065]** De manera ilustrativa, un sujeto incluye un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pollo, un primate no humano, un humano, una rata, una cobaya, un hámster y un ratón. Debido a que la presente invención se refiere de forma opcional a sujetos humanos, un sujeto para los métodos de la invención es opcionalmente un humano.

**[0066]** Los sujetos que se benefician de la presente invención son aquellos que se sospecha que han sufrido un traumatismo craneoencefálico, como las víctimas de lesión cerebral provocada por lesiones traumáticas (p. ej., heridas de bala, accidentes de tráfico, accidentes deportivos, síndrome del niño sacudido, otras lesiones percusivas).

**[0067]** Los niveles de referencia de biomarcadores son aquellos niveles obtenidos en la muestra biológica objetivo en la especie de sujeto deseado en ausencia de una afección neurológica conocida. No es necesario que estos niveles se expresen en concentraciones fuertes, sino que, en cambio, se puedan conocer a raíz de experimentos de control paralelos y se expresen en términos de unidades fluorescentes, unidades de densidad, y similares. Normalmente, en ausencia de una afección neurológica, los GBDP están presentes en muestras biológicas en una cantidad insignificante. De forma ilustrativa, autoanticuerpos para GFAP o GBDP están ausentes en una muestra biológica de un sujeto que no se sospecha que presenta una afección neurológica. No obstante, GFAP y GBDP son a menudo muy abundantes en neuronas. La determinación de los niveles de referencia de GFAP, GBDP, autoanticuerpos y ARN en neuronas, plasma o LCR, por ejemplo, de especies concretas se abarca en el conocimiento de la técnica. Del mismo modo, la determinación de la concentración de niveles de referencia de otros biomarcadores se abarca en el conocimiento de la técnica.

**[0068]** Según se utiliza en el presente documento, el término «diagnosticar» hace referencia al reconocimiento de la presencia o ausencia de una afección neurológica u otra afección, tal como una lesión o enfermedad. De forma opcional, se hace referencia a diagnosticar como el resultado de un ensayo donde se detecta una proporción o nivel concreto de un biomarcador o que está ausente.

**[0069]** Según se utiliza en el presente documento, una «proporción» es o bien una proporción positiva donde el nivel del biomarcador objetivo es mayor que el del biomarcador objetivo en una segunda muestra o bien en relación con un nivel de referencia conocido o identificado del mismo biomarcador objetivo. Una proporción negativa describe el nivel del biomarcador objetivo como inferior al del biomarcador objetivo en una segunda muestra o en relación con un nivel de referencia conocido o identificado del mismo biomarcador objetivo. Una proporción neutral no describe ningún cambio observado en el biomarcador objetivo. Por lo tanto, una cantidad de biomarcador medida en una muestra biológica se compara opcionalmente con el nivel presente en un sujeto control para determinar si el nivel en el sujeto está alterado. Así, una cantidad alterada de un biomarcador es un cambio en el nivel de biomarcador en el fluido biológico con respecto a un valor medido o esperado en un sujeto control. Un sujeto control es un sujeto que no presenta lesión o enfermedad neurológica conocida.

**[0070]** Según se utiliza en el presente documento, el término «administrar» es el suministro de un agente terapéutico a un sujeto. El agente terapéutico se administra mediante una ruta determinada como apropiada para un sujeto concreto por un experto en la materia. Por ejemplo, el agente terapéutico se administra por vía oral, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, mediante inyección intramuscular, mediante inyección intraperitoneal, por vía intratumoral, por inhalación, o por vía transdermal. La cantidad exacta de agente terapéutico necesaria variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad, el peso y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección neurológica que está siendo tratada, el agente terapéutico concreto utilizado, su modo de administración, etc. Una cantidad apropiada puede ser determinada por un experto en la materia utilizando

únicamente experimentación rutinaria a partir de las enseñanzas incluidas en el presente documento, o mediante el conocimiento en la materia sin experimentación injustificada.

5 **[0071]** Un ejemplo de proceso para detectar la presencia o ausencia de uno o más biomarcadores neuroactivos en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto, como un humano, poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el biomarcador que se está analizando (p. ej., un agente de detección), incluyendo por ejemplo un cebador, una sonda, anticuerpo, aptámero, o un antígeno, como en el caso de la detección de biomarcadores autoanticuerpos, y analizar la unión del compuesto o agente a la muestra tras el lavado. Esas muestras que se han unido de forma específica al compuesto o agente expresan el marcador que se está analizando. Se aprecia que otros métodos de detección son igualmente operativos, por ejemplo, el contacto con una tinción específica de una proteína o ácido nucleico.

15 **[0072]** Se puede utilizar un proceso para detectar biomarcadores en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. La cantidad de biomarcador en una muestra se compara con controles apropiados tales como una primera muestra que se sabe que expresa niveles detectables del marcador que está siendo analizado (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, entre las técnicas *in vitro* para la detección de un marcador se incluyen ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo, radioensayo, transferencia Western, transferencia de Southern, transferencia Northern, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, espectrometría de masas, RT-PCR, PCR, cromatografía líquida, cromatografía líquida de alta resolución, ensayo de actividad enzimática, ensayo celular, tomografía por emisión de positrones, espectroscopía de masas, combinaciones de estas, 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 de forma específica al marcador en una muestra biológica o en un sujeto de ensayo. Por ejemplo, el agente puede estar marcado con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en una muestra biológica o sujeto de ensayo puede ser detectada mediante técnicas de imagen convencionales.

25 **[0073]** Cualquier molécula adecuada que se pueda unir específicamente o que se pueda utilizar de otra manera para reconocer un biomarcador de acuerdo con la descripción es operativa en el proceso. Un agente para detectar un autoanticuerpo es por ejemplo un antígeno capaz de unirse a un autoanticuerpo o un anticuerpo capaz de unirse a un biomarcador que se esté analizando. Opcionalmente, un anticuerpo se conjuga con una marca detectable. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. También se puede utilizar un anticuerpo intacto, un fragmento de este (p. ej., Fab o F(ab')<sub>2</sub>), o una variante modificada de este (p. ej., sFv). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de estas. Hay disponibles anticuerpos para numerosos biomarcadores a través de proveedores conocidos por un experto en la materia. De forma ilustrativa, hay disponibles anticuerpos dirigidos a biomarcadores de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California).

35 **[0074]** En la técnica se conocen anticuerpos de unión al ARN y al ADN. De forma ilustrativa, un anticuerpo de unión al ARN se sintetiza a partir de una serie de fragmentos de anticuerpos de una biblioteca de expresión en fago. Ejemplos representativos de los métodos utilizados para sintetizar anticuerpos de unión al ARN se encuentran en Ye, J, *et al.*, PNAS USA, 2008; 105:82-87. Así, el conocimiento de la técnica abarca generar anticuerpos para biomarcadores basados en ARN.

40 **[0075]** Del mismo modo, en la técnica se conocen anticuerpos de unión al ADN. Métodos ilustrativos para generar anticuerpos de unión al ADN se encuentran en Watts, RA, *et al.*, Immunology, 1990; 69(3): 348-354.

45 **[0076]** Opcionalmente, se marca un agente o compuesto para detectar o medir un biomarcador. Un experto en la materia reconoce numerosas marcas operativas en el presente documento. Las marcas y los kits de marcaje se encuentran disponibles comercialmente de forma opcional a través de Invitrogen Corp., Carlsbad, California. Entre las marcas se incluyen, por ejemplo, marcas fluorescentes, biotina, peroxidasa, radionucleótidos, u otra marca conocida en la técnica.

50 **[0077]** Los ensayos basados en anticuerpos resultan útiles para analizar una muestra biológica para determinar la presencia de uno o más biomarcadores. Métodos adecuados de transferencia Western se describen más adelante en la sección de ejemplos o se conocen en la técnica. Para un análisis más rápido (como puede resultar importante en situaciones de emergencia médica), se pueden utilizar ensayos de inmunoabsorción (p. ej., ELISA y RIA) y ensayos de inmunoprecipitación. A modo de ejemplo, la muestra biológica o una porción de esta se inmoviliza en un sustrato, tal como una membrana hecha de nitrocelulosa o PVDF; o un sustrato rígido hecho de poliestireno o de otro polímero plástico, como una placa de microtitulación, y el sustrato está en contacto con un anticuerpo que se une de forma específica a un biomarcador de GFAP, o a uno de los otros biomarcadores en condiciones que permitan la unión del anticuerpo al biomarcador que se está analizando. Tras el lavado, la presencia del anticuerpo en el sustrato indica que la muestra contenía el marcador que estaba siendo evaluado. Si el anticuerpo está directamente conjugado con una marca detectable, como una enzima, fluorocromo, o radioisótopo, la presencia de la marca se detecta opcionalmente examinando el sustrato en busca de la marca detectable. De forma alternativa, se añade al sustrato un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une al anticuerpo específico del marcador. La presencia de marca detectable en el sustrato tras el lavado indica que la muestra contenía el marcador. De forma alternativa, se utiliza un ensayo sándwich donde un



anticuerpo primario específico dirigido a un biomarcador se une a un sustrato sólido. Una muestra biológica se incuba con la placa, y el material unido de forma no específica se elimina mediante lavado. Un anticuerpo secundario marcado o detectable de otra forma se utiliza para unir el biomarcador adherido al sustrato por medio del anticuerpo primario. La detección de unión al anticuerpo secundario indica la presencia del biomarcador en la muestra biológica.

**[0078]** Numerosas permutaciones de estos inmunoensayos básicos son también operativas en la invención. Estas incluyen el anticuerpo específico de biomarcador, al contrario que la muestra que se inmoviliza en un sustrato, y el sustrato está en contacto con un biomarcador conjugado con una marca detectable en condiciones que provocan la unión del anticuerpo al marcador marcado. El sustrato se pone a continuación en contacto con una muestra en condiciones que permiten la unión del marcador que está siendo analizado al anticuerpo. Una reducción en la cantidad de marca detectable en el sustrato tras el lavado indica que la muestra contenía el marcador.

**[0079]** Aunque los anticuerpos son útiles en la invención debido a su amplia caracterización, cualquier otro agente adecuado (p. ej., un péptido, un aptámero, o una molécula orgánica pequeña) que se une de forma específica a un biomarcador se utiliza opcionalmente en lugar del anticuerpo en los inmunoensayos anteriormente descritos. Por ejemplo, se podría utilizar un aptámero. Los aptámeros son moléculas basadas en ácido nucleico que se unen a ligandos específicos. Se conocen métodos para realizar aptámeros con una especificidad de unión concreta, como se detalla en las patentes americanas n.ºs 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.

**[0080]** En la técnica se conocen una pluralidad de marcas detectables que son operativas en un ensayo diagnóstico para la expresión de biomarcadores. Los agentes utilizados en métodos para detectar biomarcadores relacionados con GFAP u otros biomarcadores relacionados con proteínas específicas de neuronas se conjugan con una marca detectable, p. ej., una enzima tal como peroxidasa de rábano. Se pueden detectar agentes marcados con peroxidasa de rábano añadiendo un sustrato apropiado que produce un color naranja en presencia de peroxidasa de rábano. Se conocen otras varias marcas detectables que se pueden utilizar. Entre los ejemplos comunes de estas se 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 anticuerpos primario/secundario se utiliza opcionalmente para detectar uno o más biomarcadores. Un anticuerpo primario que reconoce específicamente uno o más biomarcadores se expone a una muestra biológica que puede contener el biomarcador en cuestión. Un anticuerpo secundario con una marca apropiada que reconoce la especie o isótopo del anticuerpo primario se pone en contacto entonces con la muestra de tal forma que se logra una detección específica del uno o más biomarcadores en la muestra.

**[0081]** En algunas formas de realización, se utiliza un antígeno para detectar un autoanticuerpo. De forma ilustrativa, un antígeno tal como GFAP o uno o más GBDP se separan o se colocan sobre un sustrato tal como una membrana de PVDF, se sonda la membrana con una muestra biológica tal como suero derivado de un sujeto que se sospecha que presenta una afección neurológica, y se detecta la presencia de un autoanticuerpo poniendo en contacto un autoanticuerpo con un anticuerpo específico del tipo de anticuerpo, tal como un anti-IgG solo o combinado con anticuerpo anti-IgM que puede o no presentar una marca detectable adjunta a este.

**[0082]** Un proceso emplea opcionalmente un paso de correlación de la presencia o cantidad de biomarcador, tal como GBDP, o autoanticuerpos para estos, en una muestra biológica con la gravedad y/o tipo de lesión celular nerviosa. La cantidad de biomarcador en la muestra biológica se asocia a una afección neurológica tal como traumatismo craneoencefálico. Los resultados de un ensayo para medir biomarcadores pueden facilitar que un médico o veterinario determine el tipo y gravedad de lesión con implicaciones respecto a los tipos de células que se han visto afectadas. Estos resultados están en consonancia con los resultados de tomografía computarizada y de la GCS, aunque son cuantitativos, se obtienen más rápidamente y con un coste mucho más bajo.

**[0083]** La presente descripción da a conocer una etapa de comparación de la cantidad de uno o más biomarcadores con respecto a niveles normales para determinar la afección neurológica del sujeto. Se aprecia que la selección de biomarcadores adicionales permite identificar los tipos de células implicadas en una afección neurológica anómala, así como la naturaleza de la muerte celular, como en el caso de un marcador de lesión axonal. La práctica de un proceso de la invención da a conocer una prueba que puede ayudar a un médico a determinar agentes terapéuticos o tratamientos adecuados que se administran para el beneficio óptimo del sujeto. A pesar de que los datos proporcionados en los ejemplos del presente documento se ofrecen con respecto a un espectro completo de traumatismo craneoencefálico, se aprecia que estos resultados son aplicables para eventos isquémicos, trastornos neurodegenerativos, enfermedad relacionada con priones, epilepsia, etiología química y patologías del sistema nervioso periférico. Opcionalmente, se considera una diferencia de género.

**[0084]** Se da a conocer también un ensayo para analizar daño celular en un sujeto. El ensayo incluye de forma opcional: (a) un sustrato para mantener una muestra biológica 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 con anterioridad a su aislamiento del sujeto; (b) un agente de unión específico de biomarcador; (c) opcionalmente, un agente de unión específico para otro biomarcador; y (d) instrucciones impresas para la

reacción: el agente con la muestra biológica o una porción de la muestra biológica para detectar la presencia o cantidad de biomarcador, y opcionalmente el agente específico para otro biomarcador con la muestra biológica o una porción de la muestra biológica para detectar la presencia o cantidad del al menos un biomarcador en la muestra biológica.

- 5 **[0085]** El ensayo incluye opcionalmente 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.

**[0086]** En el presente documento se da a conocer también la presencia de uno o más agentes terapéuticos tales como compuestos que pueden alterar una o más características de un biomarcador objetivo. Un agente terapéutico sirve opcionalmente como un agonista o antagonista de un biomarcador objetivo o efector ascendente de un biomarcador. Un agente terapéutico afecta opcionalmente a una función descendente de un biomarcador. Por ejemplo, la acetilcolina (ACh) desempeña una función en la excitación neuronal patológica y la activación del receptor colinérgico muscarínico inducido por TCE puede contribuir a los procesos excitotóxicos. Así, los biomarcadores se relacionan de manera opcional con niveles o actividad de ACh o de receptores muscarínicos. Opcionalmente, un biomarcador operativo es una molécula, proteína, ácido nucleico u otro que sea efectuado por medio de la actividad de receptor(es) muscarínico(s). Así, los agentes terapéuticos operativos en la presente descripción incluyen de forma ilustrativa aquellos que modulan diversos aspectos de la activación de receptor colinérgico muscarínico.

**[0087]** Entre los receptores muscarínicos específicos que funcionan como objetivos terapéuticos o moduladores de objetivos terapéuticos se incluyen los receptores muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, y M<sub>5</sub>.

20 **[0088]** La idoneidad de la ruta del receptor colinérgico muscarínico para la detección y el tratamiento de TCE surge a raíz de estudios que mostraron ACh elevada en el fluido cefalorraquídeo (LCR) cerebral tras el TCE experimental (Gorman *et al.*, 1989; Lyeth *et al.*, 1993a) y la isquemia (Kumagae y Matsui, 1991), así como el carácter lesivo de niveles elevados de activación del receptor colinérgico muscarínico a través de la aplicación de colinomiméticos (Olney *et al.*, 1983; Turski *et al.*, 1983). Asimismo, la administración aguda de antagonistas muscarínicos mejora la recuperación conductual tras el TCE experimental (Lyeth *et al.*, 1988a; Lyeth *et al.*, 1988b; Lyeth y Hayes, 1992; Lyeth *et al.*, 1993b; Robinson *et al.*, 1990).

**[0089]** Un compuesto terapéutico operativo en la presente descripción es de forma ilustrativa cualquier molécula, compuesto, familia, extracto, solución, fármaco, profármaco, u otro mecanismo que sea operativo para cambiar, preferiblemente para mejorar, el resultado terapéutico de un sujeto que esté en riesgo de padecer o sea víctima de una lesión neuronal como TCE o TCE leve. Un agente terapéutico es opcionalmente un modulador de receptor colinérgico muscarínico, tal como un agonista o antagonista. Un agonista o antagonista puede ser directo o indirecto. Un agonista o antagonista indirecto es opcionalmente una molécula que descompone o sintetiza acetilcolina u otra molécula relacionada con el receptor muscarínico, por ejemplo, moléculas utilizadas actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En el presente documento, resultan operativas moléculas colinomiméticas o similares. Un ejemplo de lista de agentes terapéuticos operativos en el presente documento incluye: dicitolmina, escopolamina, milamelina, N-metil-4-piperidinbencilato NMP, pilocarpina, pirenzepina, acetilcolina, metacolina, carbacol, betanecol, muscarina, oxotremorina M, oxotremorina, tapsigargina, bloqueadores o agonistas del canal de calcio, nicotina, xanomelina, BuTAC, clozapina, olanzapina, cevimelina, aceclidina, arecolina, tolterodina, rociverina, IQNP, alcaloides indólicos, himbacina, ciclosteletaminas, derivados de estos, profármacos de estos, y combinaciones de los mismos. Un agente terapéutico es opcionalmente una molécula operativa para alterar el nivel o actividad de una calpaína o caspasa. Dichas moléculas y su administración se conocen en la técnica.

**[0090]** Un método descrito de forma ilustrativa en el presente documento incluye un proceso para diagnosticar una afección neurológica en un sujeto, tratar a un sujeto con una afección neurológica, o ambos. En algunas formas de realización, un proceso incluye por ejemplo obtener una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica se analiza mediante mecanismos conocidos en la técnica para detectar o medir la presencia de uno o más biomarcadores presentes en la muestra biológica. En función de la cantidad o la presencia de un biomarcador objetivo en una muestra biológica, se calcula opcionalmente una proporción de uno o más biomarcadores. La proporción es opcionalmente el nivel de uno o más biomarcadores en relación con el nivel de otro biomarcador en la misma muestra o en una muestra paralela, o la proporción de la cantidad del biomarcador con respecto a un nivel de referencia medido o previamente establecido del mismo biomarcador en un sujeto que se sabe que no padece una afección neurológica patológica. La proporción permite el diagnóstico de una afección neurológica en el sujeto. Opcionalmente, un proceso administra también un agente terapéutico al sujeto que, ya sea de forma directa o indirecta, alterará la proporción de uno o más biomarcadores.

55 **[0091]** Un agente terapéutico se diseña opcionalmente para modular la respuesta inmune en un sujeto. De forma ilustrativa, los niveles, producción, descomposición u otros parámetros relacionados con autoanticuerpos se alteran por medio de terapia inmunomoduladora. En la técnica se conocen ejemplos representativos de terapias inmunomoduladoras que son aplicables a la presencia de autoanticuerpos para, por ejemplo, GFAP o uno o más GBDP, tales como terapias utilizadas para la esclerosis múltiple. Dichas terapias incluyen por ejemplo la administración de acetato de glatiramer (AG), interferones beta, laquinimod, u otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica. Opcionalmente, se administran combinaciones de agentes terapéuticos como una forma

de terapia inmunomoduladora. Entre las combinaciones ilustrativas se incluyen IFN $\beta$ -1a y metotrexato, IFN $\beta$ -1a y azatioprina, y mitoxantrona con metilprednisolona. En la técnica se conocen otras combinaciones adecuadas.

5 **[0092]** Asimismo, se da a conocer un proceso para diagnosticar y, opcionalmente, para tratar una lesión multiorgánica. Entre los múltiples órganos se incluyen por ejemplo subconjuntos de tejido neurológico, como de cerebro, médula espinal y similares, o regiones específicas del cerebro como la corteza, el hipocampo y similares. Las lesiones multiorgánicas incluyen de forma ilustrativa daño celular apoptótico que sea detectable mediante la presencia de GBDP inducidos por caspasa, y muerte celular oncótica que sea detectable mediante la presencia de GBDP inducidos por calpaína. El proceso incluye de forma ilustrativa analizar una pluralidad de biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un sujeto donde el fluido biológico muestreado se  
10 encontraba opcionalmente en contacto fluido con un órgano que se sospecha que ha experimentado lesión o con un órgano control cuando la muestra biológica se ha obtenido del sujeto. El proceso determina un primer subtipo de lesión de órgano en función de una primera proporción de una pluralidad de biomarcadores. El proceso determina también un segundo subtipo de una segunda lesión de órgano en función de una segunda proporción de la pluralidad de biomarcadores en la muestra biológica. De manera ilustrativa, se determinan las  
15 proporciones mediante procesos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

**[0093]** El tratamiento de una lesión multiorgánica en el proceso se consigue de forma ilustrativa administrando a un sujeto al menos un antagonista o agonista terapéutico efectivo para modular la actividad de una proteína o ácido nucleico cuya actividad o nivel se altera en respuesta a la primera lesión de órgano, y administrando al  
20 menos un agonista o antagonista terapéutico efectivo para modular la actividad o nivel de una proteína o ácido nucleico cuya actividad se altera en respuesta a una segunda lesión de órgano.

**[0094]** La descripción incluye de forma ilustrativa una composición para distinguir la magnitud de una afección neurológica en un sujeto. Una composición descrita es o bien una entidad agente o una mezcla de múltiples agentes. Se describe una composición que es una mezcla. La mezcla contiene opcionalmente una muestra biológica derivada de un sujeto. Se sospecha opcionalmente que el sujeto presenta una afección neurológica. La muestra biológica está en comunicación con el sistema nervioso del sujeto con anterioridad a que se aisle del  
25 sujeto. Se describe una composición que también contiene opcionalmente al menos dos agentes primarios, opcionalmente anticuerpos o ácidos nucleicos, que se unen de forma específica e independiente a al menos dos biomarcadores que pueden estar presentes en la muestra biológica. En algunas partes de la descripción, el primer agente primario es un anticuerpo que se une de forma específica a GFAP o a uno o más GBDP. Un segundo agente primario es opcionalmente un anticuerpo que une de forma específica una hidrolasa ubiquitina carboxi-terminal, preferiblemente UCHL1, o un producto de degradación de espectrina.  
30

**[0095]** Opcionalmente, los agentes de la composición se inmovilizan o están en contacto de otra manera con un sustrato. Los agentes están también marcados opcionalmente con al menos una marca detectable. En algunas partes de la descripción, la marca detectable en cada agente es única y detectable de forma independiente, ya sea en la misma cámara de ensayo o en cámaras alternativas. Opcionalmente, un agente secundario específico para detectar o para unirse al agente primario está marcado con al menos una marca detectable. En el ejemplo no limitativo, el agente primario es un anticuerpo derivado de conejo. Un agente secundario es opcionalmente un anticuerpo específico para un anticuerpo primario proveniente de conejo. En la técnica se conocen mecanismos de detección de anticuerpo que se une a un antígeno, y un experto en la materia concibe rápidamente  
40 numerosos métodos y agentes adecuados para detectar antígenos o biomarcadores en una muestra biológica.

**[0096]** Además, se da a conocer un kit que abarca un sustrato adecuado para asociarse con el biomarcador objetivo en una muestra biológica. La muestra biológica se proporciona opcionalmente con el kit o se obtiene por parte de un médico para su uso con un kit. Un kit incluye opcionalmente al menos dos anticuerpos que se unen de forma específica e independiente a al menos dos biomarcadores. Los anticuerpos pueden distinguir entre los  
45 dos biomarcadores. Opcionalmente, un primer anticuerpo es específico e independiente para unirse a un primer biomarcador y para detectarlo. Un segundo anticuerpo es específico e independiente para unirse a un segundo biomarcador y para detectar un segundo biomarcador. En este sentido, se puede determinar o distinguir la presencia o ausencia de múltiples biomarcadores en una única muestra biológica. Entre los anticuerpos presentes en la muestra biológica se incluyen por ejemplo aquellos para biomarcadores de all-espectrina, un producto de degradación de all-espectrina (SBDP), una ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal, GFAP, GBDP y una proteína MAP2. Un kit incluye también instrucciones para hacer reaccionar los anticuerpos con la muestra biológica o una porción de la muestra biológica con el fin de detectar la presencia o la cantidad de los biomarcadores en la muestra biológica.  
50

**[0097]** En el kit, la muestra biológica puede ser LCR, sangre, orina o saliva, y el agente puede ser un anticuerpo, aptámero, cebador, sonda, u otra molécula que se una específicamente a al menos un biomarcador en caso de una afección neurológica. En el presente documento se describen agentes adecuados. El kit puede incluir también una marca detectable tal como una conjugada con el agente, o una conjugada con una sustancia que se une específicamente al agente (p. ej., un anticuerpo secundario).  
55

**[0098]** Se describe una etapa de correlación de la presencia o cantidad de un biomarcador en una muestra biológica con la gravedad y/o tipo de lesión celular nerviosa (o de otra célula que exprese el biomarcador). La cantidad de biomarcador(es) en la muestra biológica está directamente relacionada con la gravedad de la lesión  
60

- de tejido nervioso, ya que una lesión más grave daña una mayor cantidad de células nerviosas, que a su vez provoca que se acumule una mayor cantidad de biomarcador(es) en la muestra biológica (p. ej., LCR; suero). El hecho de si una lesión de célula nerviosa desencadena una muerte celular de tipo apoptótico y/o necrótico también se puede determinar examinando, por ejemplo, los GBDP presentes en la muestra biológica. La muerte celular necrótica activa preferentemente calpaína, mientras que la muerte celular apoptótica activa preferentemente caspasa-3. Debido a que se pueden distinguir GBDP de calpaína y caspasa-3, la medición de estos marcadores indica el tipo de daño celular en el sujeto. Asimismo, el nivel o alcance cinético de UCHL1 y/o GFAP presente en una muestra biológica puede distinguir opcionalmente una lesión leve de una lesión más grave. A modo de ejemplo ilustrativo, la OACM grave (2 h) produce un aumento de UCHL1 tanto en LCR como en suero en relación con una exposición leve (30 min), mientras que ambas producen niveles de UCHL1 superiores a los de sujetos sin lesiones. Además, la persistencia o el alcance cinético de los marcadores en una muestra biológica indica la gravedad de la lesión, con una mayor lesión indicando un aumento de la persistencia de, por ejemplo, GBDP, UCHL1 o SBDP en el sujeto que se mide mediante un proceso en muestras biológicas tomadas en varios momentos tras la lesión.
- 15 **[0099]** Los resultados de tal prueba pueden ayudar a un médico a determinar si la administración de un agente terapéutico concreto tal como inhibidores de calpaína y/o caspasa o antagonistas de receptores colinérgicos muscarínicos o cualquier inmunomodulador podría resultar beneficiosa para un paciente. Este método puede resultar especialmente importante para detectar diferencias de edad y de género en el mecanismo de muerte celular.
- 20 **[0100]** Se aprecia que otros reactivos tales como agua de grado de ensayo, agentes tampones, membranas, placas de ensayo, anticuerpos secundarios, sales y otros reactivos auxiliares se encuentran disponibles a través de proveedores que conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, las placas de ensayo se encuentran disponibles a través de Corning, Inc. (Corning, Nueva York) y los reactivos están disponibles a través de Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Misuri).
- 25 **[0101]** En el presente documento se describen métodos que implican técnicas biológicas convencionales. Por lo general, tales técnicas se conocen en la técnica y se describen con detalle en tratados metodológicos, como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.<sup>a</sup> ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas); y Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel *et al.*, 52 ed., Wiley-Interscience, Nueva York, 2002. Se describen métodos inmunológicos (p. ej., preparación de anticuerpos específicos de antígenos, inmunoprecipitación e inmunotransferencia), p. ej. en Current Protocols in Immunology, ed. Coligan *et al.*, John Wiley e Hijos, Nueva York, 1991; y Methods of Immunological Analysis, ed. Masseyeff *et al.*, John Wiley e Hijos, Nueva York, 1992.
- 30 **[0102]** Se pueden encontrar protocolos adicionales tales como protocolos de PCR en A Guide to Methods and Applications Academic Press, Nueva York. Entre los métodos para la purificación de proteínas se incluyen tales métodos como precipitación de sulfato de amonio, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización, y otros. Véase, p. ej., Ausubel, *et al.* (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification," Methods in Enzymology vol. 182, y otros volúmenes de esta serie; Current Protocols in Protein Science, John Wiley e Hijos, Nueva York, (Nueva York); y los documentos del fabricante en lo que respecta al uso de productos de purificación de proteínas conocidos por los expertos en la materia.
- 35 **[0103]** Se describen ensayos para actividades biológicas de células neurales, p. ej., en Wouterlood (ed. 1995) Neuroscience Protocols modules 10, Elsevier; Methods in Neurosciences Academic Press; y Neuromethods Humana Press, Totowa (Nueva Jersey).
- 40 **[0104]** Se ilustran diversos aspectos de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos no limitativos. Los ejemplos se destinan a fines ilustrativos y no suponen una limitación para ninguna práctica de la presente invención. Aunque los ejemplos están orientados por lo general a tejido de mamíferos, en concreto, al análisis de tejido de ratas, un experto en la materia reconoce que técnicas similares y otras técnicas conocidas en la técnica trasladan rápidamente los ejemplos a otros mamíferos, tales como humanos. Los reactivos representados en el presente documento son habitualmente de reacción cruzada entre especies de mamíferos o reactivos alternativos con propiedades similares que se encuentran disponibles comercialmente, y un experto en la materia comprende rápidamente dónde se pueden obtener tales reactivos.
- 45 **Ejemplo 1:** Materiales para análisis de biomarcadores.
- 50 **[0105]** Entre los reactivos ilustrativos utilizados para llevar a cabo el presente ejemplo se incluyen bicarbonato de sodio (Sigma Cat. #: C-3041), tampón de bloqueo (Startingblock T20-TBS) (Pierce Cat. #: 37543), tampón salino Tris con Tween 20 (TBST; Sigma Cat. #: T-9039). Tampón fosfato salino (PBS; Sigma Cat. #: P-3813); Tween 20 (Sigma Cat. #: P5927); ELISA Ultra TMB (Pierce Cat. #: 34028); y placas de ELISA Nunc maxisorp (Fisher). Los anticuerpos monoclonales y policlonales de GFAP y UCHL1 son de fabricación doméstica o se obtienen a través de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (California). Los anticuerpos dirigidos a  $\alpha$ -II espectrina, GFAP y productos de degradación, así como a MAP2, PBM, neurofascina, IgG e IgM, se encuentran disponibles a través de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (California).
- 60

**[0106]** El anticuerpo anti-tau dirigido a tau de longitud completa se adquiere a través de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (California). Para generar anticuerpos específicos para BDP de tau, el péptido sintético (Cys-C<sub>6</sub>-SIDMVD-COOH) (SEQ ID N.º 1), que es la secuencia del producto de degradación de tau C-terminal generado por caspasa-3 (tauBDP-45K) (Chung *et al.*, 2001), y el segundo péptido (NH<sub>2</sub>-KDRTGN-C<sub>6</sub>-Cys) (SEQ ID N.º 2) que representa el N-terminal de TauBDP-35K mediada por calpaína, se personalizan mediante síntesis de péptidos (California Peptide, Napa, California). Se introducen un enlazador C<sub>6</sub> y cisteína N-terminal para el posterior acoplamiento del péptido con la proteína hemocianina de lapa californiana (KLH) utilizando un reactivo de reticulación de enlace sulfuro (Pierce). Tras las determinaciones de eficacia de acoplamiento, los péptidos se dializan y se concentran. Se inmunizan conejos con 2 mg de proteína conjugada mediante inyección. Se recogen muestras de suero tras tres meses y se purifican por afinidad utilizando el péptido sintético frente al cual se han tratado acoplado a resinas con enlaces sulfuro (Pierce). El anticuerpo purificado por afinidad se dializa entonces frente a TBS (20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl) y se concentra para su almacenamiento en 50 % de glicerol a -20 °C.

**[0107]** Hay disponibles marcas para anticuerpos de numerosos subtipos a través de Invitrogen, Corp., Carlsbad, (California). Las concentraciones de proteínas en muestras biológicas se determinan utilizando ensayos de microproteínas de ácido bicinónico (Pierce Inc., Rockford, Illinois, EE. UU.) con estándares de albúmina. Los expertos en la materia conocen la totalidad del resto de reactivos y materiales necesarios y se pueden determinar fácilmente.

#### **Ejemplo 2:** Desarrollo de ensayo de biomarcador

**[0108]** Los anticuerpos monoclonales y policlonales de conejo específicos de antibiomarcador, así como los antígenos, se producen en el laboratorio o se adquieren comercialmente. 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 sonda un panel de tejido mediante transferencia Western. Se utiliza una ELISA indirecta con la proteína recombinante biomarcadora acoplada en la placa de ELISA para determinar la concentración óptima de los anticuerpos utilizados en el ensayo. Se recubren pocillos de microplacas 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 indirecta para cada anticuerpo. Una muestra diluida apropiada se incuba con un anticuerpo biomarcador antihumano policlonal de conejo durante 2 horas y posteriormente se lava. A continuación, se añade un anticuerpo biomarcador antihumano monoclonal marcado con biotina y se incuba con biomarcador capturado. Tras un lavado a fondo, se añade estreptavidina peroxidasa de rábano conjugada. Después de 1 hora de incubación y tras la última etapa de lavado, se permite que el conjugado restante reaccione con sustrato de tetrametilbenzidina peróxido de hidrógeno. La reacción se detiene añadiendo la solución ácida y se mide la absorbancia del producto de reacción amarillo resultante en 450 nanómetros. La absorbancia es proporcional a la concentración del biomarcador. Se construye una curva estándar trazando valores de absorbancia en función de la concentración de biomarcador utilizando muestras de calibrador y las concentraciones de muestras desconocidas se determinan utilizando la curva estándar.

#### **Ejemplo 3:** Modelo de TCE *in vivo*:

**[0109]** Se utiliza un dispositivo de impacto cortical controlado (CCI) para mostrar un modelo de TCE en ratas según se ha descrito anteriormente (Pike *et al.*, 1998). Se anestesian ratas macho Sprague-Dawley adultas (280-300 g) (Harlan: Indianápolis, Indiana) con un 4 % de isoflurano en un gas portador de 1:1 O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O (4 min) y se mantienen con un 2,5 % de isoflurano en el mismo gas portador. La temperatura corporal central se monitoriza de forma continua mediante una sonda termistor rectal y se mantiene a 37±1 °C colocando una almohadilla térmica ajustable bajo las ratas para el control de la temperatura. Los animales se montan en un marco estereotáctico en posición de decúbito prono y se sujetan mediante barras para orejas e incisivos. Tras una incisión en la línea media craneal y un reflejo de los tejidos blandos, se lleva a cabo una craneotomía (de 7 mm de diámetro) unilateral (ipsilateral al sitio de impacto) y adyacente a la sutura central, a medio camino entre el bregma y el lambda. La duramadre se mantiene intacta sobre la corteza. El trauma cerebral se produce impactando la corteza derecha (ipsilateral) con una punta de impactador 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 150 ms de tiempo de espera. Los animales control con lesiones simuladas se someten a procedimientos quirúrgicos idénticos, pero no reciben la lesión por impacto. La gestión apropiada antes y después de la lesión se lleva a cabo para asegurar el cumplimiento de las directrices expuestas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Florida (University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee) y las directrices de los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health) descritas con detalle en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Además, la investigación se lleva a cabo de conformidad con la Ley de Bienestar Animal (Animal Welfare Act) y otros estatutos y regulaciones federales en relación con animales y experimentos que impliquen animales y se adhieren a los principios indicados en la «Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Publicación NRC, edición de 1996».

#### **Ejemplo 4:** Modelo de lesión por oclusión de la arteria cerebral media (OACM):

**[0110]** Se incuban ratas con anestesia con isoflurano (5 % de isoflurano *a través de* la cámara de inducción y a continuación un 2 % de isoflurano *a través del* cono nasal), la arteria carótida común (ACC) derecha de la rata está expuesta a nivel de la bifurcación de la arteria carótida externa e interna (ACE y ACI) con una incisión en la línea media del cuello. Se sigue a la ACI a lo largo del rostro hacia la rama pterigopalatina y la ACE se liga y se corta en sus ramas lingual y maxilar. A continuación, se introduce una sutura de nailon 3-0 en la ACI *a través de* una incisión en el muñón de la ACE (se monitorizó visualmente la vía de sutura a través de la pared vascular) y esta avanza a través del canal carotídeo aproximadamente 20 mm desde la bifurcación carotídea hasta que se aloja en el estrechamiento de la arteria cerebral anterior bloqueando el origen de la arteria cerebral media. A continuación, se cierra la incisión cutánea y la sutura endovascular se deja colocada durante 30 minutos o 2 horas. Posteriormente, se vuelve a anestesiarse brevemente a la rata y el filamento de sutura se retrae para permitir la reperusión. Para operaciones quirúrgicas de OACM simulada, se sigue el mismo procedimiento, pero el filamento avanza únicamente 10 mm más allá de la bifurcación carotídea interna-externa, y se deja colocado hasta que se sacrifica a la rata. Durante la totalidad de los procedimientos quirúrgicos, los animales se mantienen a  $37 \pm 1$  °C empleando una manta eléctrica homeotérmica (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EE. UU.). Es importante señalar que, al concluir cada experimento, en caso de que los cerebros de las ratas muestren evidencia patológica de hemorragia subaracnoidea tras la necropsia, se excluyen del estudio. Se realiza de antemano una gestión apropiada antes y después de la lesión para asegurar el cumplimiento de la totalidad de las directrices sobre cuidado y uso de animales.

**Ejemplo 5:** Preparación de tejido y muestra:

**[0111]** En los momentos apropiados (2, 6, 24 horas y 2, 3, 5 días) después de la lesión, se anestesian los animales y se sacrifican inmediatamente mediante decapitación. Se extraen rápidamente los cerebros, se enjuagan con PBS helado y se parten por la mitad. El hemisferio derecho (corteza cerebral en torno a la zona del impacto e hipocampo) se disecciona rápidamente, se enjuaga en PBS helado, se congela rápidamente en nitrógeno líquido, y se almacena a -80 °C hasta su uso. Para la inmunohistoquímica, los cerebros se congelan rápidamente en suspensión en hielo seco, se seccionan mediante criostato (20 µm) en portaobjetos SUPERFROST PLUS GOLD® (Fisher Scientific), y a continuación se almacenan a -80 °C hasta su uso. Para el hemisferio izquierdo, se recoge el mismo tejido que en el lado derecho. Para el análisis de transferencia Western, las muestras cerebrales se pulverizan con un pequeño mortero colocado sobre hielo seco hasta formar un polvo fino. El polvo de tejido cerebral pulverizado se lisa a continuación durante 90 min a 4 °C en un tampón de 50 mM de Tris (pH 7,4), 5 mM de EDTA, 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 mM de DTT, 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche Biochemicals). Los lisados cerebrales se centrifugan a continuación a 15.000xg durante 5 min a 4 °C para aclarar y eliminar residuos insolubles, se congelan rápidamente, y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

**[0112]** Para la electroforesis en gel y la electrotransferencia, se prepararon muestras aclaradas de LCR (7 µl) para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con un tampón de carga 2X que contenía 0,25 M de Tris (pH 6,8), 0,2 M de DTT, 8 % de SDS, 0,02 % de azul de bromofenol, y 20 % de glicerol en H<sub>2</sub>O destilada. De forma rutinaria, se disuelven veinte microgramos (20 µg) de proteína por carril mediante SDS-PAGE en geles con 10-20 % de Tris/glicina (Invitrogen, Cat #EC61352) a 130 V durante 2 horas. Tras la electroforesis, se transfieren lateralmente proteínas separadas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en un tampón de transferencia que contiene 39 mM de glicina, 48 mM de Tris-HCl (pH 8,3), y un 5 % de metanol con un voltaje constante de 20 V durante 2 horas a temperatura ambiente en una unidad de transferencia semiseca (Bio-Rad). Tras la electrotransferencia, las membranas se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente en un 5 % de leche sin grasa en TBS y un 0,05 % de Tween-2 (TBST), y se incuban a continuación con el anticuerpo monoclonal primario GFAP en TBST con un 5 % de leche sin grasa en disolución 1:2000, según recomienda el fabricante, a 4 °C durante toda la noche. A esta etapa le siguen tres lavados con TBST, una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario enlazado biotinilado (Amersham, Cat # RPN1177v1), y una incubación durante 30 min con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (reactivo BCIP/NBT: KPL, Cat # 50-81-08). Los pesos moleculares de proteínas de biomarcador intactas se evalúan utilizando estándares de peso molecular multicolor (Amersham, Cat # RPN800V). La evaluación semicuantitativa de niveles intactos de proteínas GFAP, UCHL1 o SBDP se lleva a cabo a través del escáner densitométrico asistido por ordenador (escáner EPSON XL3500) y el análisis de imágenes con el *software* ImageJ (NIH).

**Ejemplo 6:** Productos de degradación como biomarcadores de lesión neuronal.

**[0113]** El LCR se prepara, como en el caso del Ejemplo 5, tras el CCI en ratas según se ha descrito en el Ejemplo 3. La transferencia Western que utiliza anticuerpos anti-GFAP revela un incremento de GFAP con un aumento del tiempo tras la lesión por CCI (figuras 1A, B). Del mismo modo, los niveles de GFAP aumentan con el tiempo tras el CCI con niveles máximos estadísticamente significativos 14 días después de la lesión (figura 1C). Los niveles de GFAP y GBDP en la corteza ipsilateral de rata se miden también y muestran un incremento de los niveles relativos a animales tratados de forma simulada (S) (figura 2). Estos datos muestran un incremento de GFAP y GBDP en el LCR y en el tejido neuronal tras el CCI, de forma similar al TCE grave.

**[0114]** La descomposición de GFAP en las neuronas es específica de la lesión. Los lisados de tejido cerebral de ratas en animales tratados de forma simulada del Ejemplo 3, así como una muestra cerebral humana de un

cadáver sin TCE, se tratan con dos niveles de calpaína-2 y caspasa-3, y a continuación mediante transferencia Western utilizando anticuerpos primarios ya sean para GFAP y GBDP o SBDP. La figura 3 representa que la asimilación *in vitro* de lisados cerebrales de rata con calpaína-2 muestra GBDP superpuestos con lisado cerebral humano asimilado. La escisión de caspasa-3 del cerebro de rata reveló GBDP similares a los de las ratas con CCI tratadas (figura 3A).

**[0115]** Del mismo modo, los niveles de SBDP 150/145 aumentan en el LCR de rata tras el CCI tanto 24 horas después como 7 días después de la lesión (figura 3B).

**[0116]** Se examinan lisados de cultivos mezclados gliales/neuronales para determinar la presencia de GBDP tras diversos tratamientos. Para obtener los cultivos, se recogen células cerebrocorticales provenientes de cerebros de rata Sprague-Dawley de 1 día de antigüedad y se colocan sobre un recubrimiento de poli-L-lisina en placas de cultivo de 6 pocillos (Erie Scientific, Portsmouth, Nuevo Hampshire, EE. UU.) de acuerdo con el método de Nath *et al.*, J. Neurochem., 1998; 71:186-195 con una densidad de  $4,36 \times 10^5$  células/ml. Los cultivos se mantienen en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un 10 % de suero bovino fetal en una incubadora humidificada en una atmósfera de 10 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras 5 días en cultivo, los medios cambian a DMEM con un 5 % de suero de caballo. Los cambios posteriores en los medios se realizan tres veces por semana. Los experimentos se llevan a cabo en los días 10 a 11 *in vitro* cuando la astrogliá había formado una monocapa confluyente por debajo de neuronas morfológicamente maduras.

**[0117]** Además de los controles no tratados, se examinaron las siguientes condiciones: metotrexato (MTX) (1 µM); inductores de apoptosis con estaurosporina (STS) (0,5 µM; Sigma, San Luis, Misuri) que activa calpaína y caspasa-3 durante 24 horas (Zhang *et al.*, 2009); el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) quelante Ca<sup>2+</sup> (5 mM; Sigma) durante hasta 24 horas como una exposición dominada por caspasa (Waterhouse *et al.*, 1996; Chiesa *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 1998; McGinnis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009). Para la intervención farmacológica, se pretrataron cultivos una hora antes de la exposición a STS, EDTA o MTX con el inhibidor de calpaína SNJ1945 (Senju Pharmaceuticals, Kobe, Japón) (Shirasaki *et al.*, 2005; 3Oka *et al.* 2006; Koumura *et al.*, 2008), o el inhibidor de pan-caspasa Z-VAD (OMe)-FMK (R&D, Mineápolis, Minnesota).

**[0118]** Las células cultivadas tratadas con MTX mostraron escisión de GFAP específica de calpaína, según se representa mediante la reducción de GBDP utilizando tratamiento con SJA y la falta de inhibición mediante tratamiento con VID (figura 4). En cambio, el tratamiento con EDTA produce la formación de GBDP mediados por caspasa, según se representa mediante el no efecto con el tratamiento con SJA y la no formación de GBDP con el tratamiento con VAD. El tratamiento con el inductor de apoptosis STS representó una escisión equilibrada de GFAP tanto mediante calpaína como mediante caspasa.

**[0119]** Para identificar los sitios de escisión en GFAP mediados por calpaínas y caspasas en células neuronales, la GFAP recombinante se somete a escisión con distintos niveles de calpaína o caspasa. La figura 5 representa la asimilación de GFAP detectada con tinción de azul de Coomassie, la detección de una etiqueta C-terminal (DDK) asociada a GFAP recombinante o mediante transferencia Western con anticuerpo antiGFAP representa una escisión efectiva tanto mediante calpaína como mediante caspasa. La escisión de bandas de GBDP a partir de geles tintados con azul de Coomassie y el hecho de que se sometan las bandas a secuenciación N-terminal muestra escisión mediante calpaína 2 en Asn59 (GALN\*<sub>59</sub>AGFKETRASERAE) (SEQ ID N.º 3) para producir un GBDP con el nuevo C-terminal VDFSLAGALN-COOH (SEQ ID N.º 139) y un GBDP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-AGFKETRASE (SEQ ID N.º 140), y Thr383 (TIPVQT\*<sub>383</sub>FSNLQIRET) (SEQ ID N.º 4) produciendo un GBDP con el nuevo C-terminal ENRITIPVQT-COOH (SEQ ID N.º 141) y un GBDP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-FSNLQIRETS (SEQ ID N.º 142), produciendo en total múltiples GBDP entre 49 y 38 kDa en la GFAP recombinante humana.

**[0120]** En el documento de patente americana n.º 7,456,027 se identifican productos de degradación de Tau en el hipocampo de rata 48 horas después del CCI. Se ha demostrado que tras el TCE experimental mediante lesión por CCI, se escinde Tau de rata para producir TBDP de peso molecular 40-55 kDa, 36 kDa, 26 kDa, 18 kDa y 13 kDa. No se conocían los sitios de escisión y su relevancia en tipos específicos de lesión neuronal. Los sitios de escisión en Tau se identifican mediante asimilación *in vitro* de tau recombinante de rata utilizando calpaína 2 o calpaína 1. Tras la digestión, los fragmentos de escisión se separan mediante SDS-PAGE, se tiñen con azul de Coomassie y las bandas se retiran y se someten a secuenciación N-terminal. Los resultados de la secuencia se comparan con la secuencia conocida de tau de rata. En la Tabla 6 se representa Tau de rata de longitud completa con sitios de escisión de calpaína y caspasa.

**Tabla 6:** (SEQ ID N.º 5) El \* representa un sitio de escisión; los caracteres en negrita representan un epítipo utilizado para aumentar un anticuerpo específico de TBP.

**Tau de rata**

1 MAEPRQEFDT MEDQAGDYTM LQDQEGDMDHGLK \* **ESPPQPPADD** GSEEPGS ETSDAKSTPT  
 61 AEDVTAPLVE ERAPDKQATA QSHTEIPEGT TAEAEAGIGDT PNMEDQAAG HVTQARVAGVS\*  
 121 **KDRTGNDEK** KAKGADGKTGA KIATPRGAAT PGQKGTSNAT RIPAKTTPSP KTPPGSGEPP  
 181 KSGERSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTP **PTREPKKVAVV** \* RTPPKSPSAS KSRLQTAPVP  
 241 MPDLKNVRSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN KKLDSLNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV  
 301 YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK  
 361 **KIETHKLTFR**\***ENAKAKTDHG** AEIVYKSPVV SGTSPRHLSNV **SSTGSIDMVD** \* SPQLATLA  
 421 DEVSASLAKQ GL

**[0121]** La calpaína escinde tau de rata en Lys43 (LK\*<sub>43</sub>ESPPQPPADD (SEQ ID N.º 6)), produciendo un TBP con el nuevo C-terminal QEGDMDHGLK-COOH (SEQ ID N.º 115) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-QEGDMDHGLK (SEQ ID N.º 116); Ser120 (AGHVTQARMVS\*<sub>120</sub>KDRTGNDEK (SEQ ID N.º 7) produciendo un TBP con el nuevo C-terminal VTQARVAGVS-COOH (SEQ ID N.º 117) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-KDRTGNDEK (SEQ ID N.º 118), Val220 (PTREPKKVAVV\*<sub>220</sub>RTPPKSPSAS (SEQ ID N.º 8)) produciendo un TBP con el nuevo C-terminal TREPKKVAVV-COOH (SEQ ID N.º 119) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-RTPPKSPSAS (SEQ ID N.º 120); y Arg370 (KIETHKLTFR\*<sub>370</sub>ENAKAKTDHGAEI (SEQ ID N.º 9)) (Fig. 5) produciendo un TBP con el nuevo C-terminal KIETHKLTFR-COOH (SEQ ID N.º 121) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-ENAKAKTDHG (SEQ ID N.º 122). La caspasa-3 escinde Tau de rata en Asp412 (SSTGSIDMVD\*<sub>412</sub>SPQLATLA (SEQ ID N.º 10)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal SSTGSIDMVD-COOH (SEQ ID N.º 123) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-SPQLATLADE (SEQ ID N.º 124).

**[0122]** La Tau humana se escinde mediante calpaína y caspasa en ubicaciones similares. La Tabla 7 representa los sitios de escisión en la tau humana.

**Tabla 7:** (SEQ ID N.º 11) El \* representa un sitio de escisión; los caracteres en negrita representan un epítipo utilizado para aumentar un anticuerpo específico de TBP.

**Tau de humano**

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKD\*QGGYTMHQD QEGDTDAGLK \* **ESPLQPTED** GSEEPG  
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG  
 121 **HVTQARMVS** \* **KSKDGTGSDDK** KAKGADGKTK IATPRG \*AAPP GQKQANATR IPAKTTPAPK  
 181 TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR SRTPSLPTP **PTREPKKVAVV** \* RTPPKSPSAK  
 241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV  
 301 PGGGSVQIVY KPVDSLKVT SKCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI  
 361 THVPGGGNKK IETHKLTFR\*E NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSNV **SSTGSIDMVD**\*  
 422 SPQLATLADEVSASLAKQGL

**[0123]** Los TBP humanos se producen a partir de Tau humana mediante escisión de calpaína en Ser129 (AGHVTQARMVS\*<sub>129</sub>KSKDGTGSDD (SEQ ID N.º 12)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal GHVTQARMVS-COOH (SEQ ID N.º 125) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-KSKDGTGSDD (SEQ ID N.º 126), Val229 (PTREPKKVAVV\*<sub>229</sub>RTPPKSPSSA (SEQ ID N.º 13)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal TREPKKVAVV-COOH (SEQ ID N.º 127) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-RTPPKSPSSA (SEQ ID N.º 128), Gly157 (GKTKIATPRG\*<sub>157</sub>AAPPGQKQANATRITA (SEQ ID N.º 14)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal GKTKIATPRG-COOH (SEQ ID N.º 129) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-AAPPGQKQQA (SEQ ID N.º 130), Lys44 (LK\*<sub>44</sub>ESPLQPTED (SEQ ID N.º 15)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal QEGDTDAGLK-COOH (SEQ ID N.º 131) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-ESPLQPTED (SEQ ID N.º 132), y Arg379 (KIETHKLTFR\*<sub>379</sub>ENAKAKTDHGAEI (SEQ ID N.º 16)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal KIETHKLTFR-COOH (SEQ ID N.º 133), y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-ENAKAKTDHG (SEQ ID N.º 134). Los sitios de escisión de caspasa en Tau humana son Asp25 (GDRKD\*<sub>25</sub>QGGYTMHQD (SEQ ID N.º 17)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal GTYGLGDRKD-COOH (SEQ ID N.º 135) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-QGGYTMHQDQ (SEQ ID N.º 136), y Asp421 (SSTGSIDMVD\*<sub>421</sub>SPQLATLA (SEQ ID N.º 18)) para producir un TBP con el nuevo C-terminal SSTGSIDMVD-COOH (SEQ ID N.º 137) y un TBP con el nuevo N-terminal NH<sub>2</sub>-SPQLATLADE (SEQ ID N.º 138). Las rutas generales de escisión de lesión neuronal de Tau humana se representan en la figura 6.

**[0124]** Se han planteado anticuerpos para TAUBDP-45K (caspasa) y TAUBDP-35K (calpaína). Se personaliza un péptido sintético (Cys-C<sub>6</sub>-SIDMVD) (SEQ ID N.º 1) en función del C-terminal Tau de tauBDP-45K generado mediante caspasa-3 (Chung *et al.*, 2001) y otro péptido (KDRTGNDEK-C<sub>6</sub>-Cys) (SEQ ID N.º 19) en función del nuevo N-terminal de la TauBDP-35K mediada por calpaína (California Peptide, Napa, California). En la Tabla 8 se listan otros ejemplos de epítomos para anticuerpos específicos para TBP.



**Tabla 8:**Epítomos peptídicos específicos de fragmento de Tau

Humano, rata: SSTGSIDMVD-COOH	(SEQ ID N.º 20)
Humano, rata: NH <sub>2</sub> -SPQLATLA	(SEQ ID N.º 21)
Rata: AGHVTQARVAGVS-COOH	(SEQ ID N.º 22)
Rata: NH <sub>2</sub> -KDRTGNDEK	(SEQ ID N.º 23)
Humano, rata: PTREPKKVAVV-COOH	(SEQ ID N.º 24)
Humano, rata: NH <sub>2</sub> -RTPPKSPSAS	(SEQ ID N.º 25)
Humano, rata, ratón: KIETHKLTFR-COOH	(SEQ ID N.º 26)
Humano, rata, ratón: NH <sub>2</sub> -ENAKAKTDHGAEI	(SEQ ID N.º 27)
Rata: QEGDMDHGLK-COOH	(SEQ ID N.º 28)
Rata: NH <sub>2</sub> -ESPPQPPADD	(SEQ ID N.º 29)
Humano: QEGDTDAGLK-COOH	(SEQ ID N.º 30)
Humano: NH <sub>2</sub> -ESPLQTPTED	(SEQ ID N.º 31)
Humano: GTYGLGDRKD-COOH	(SEQ ID N.º 32)
Humano: NH <sub>2</sub> -QGGYT MHQD	(SEQ ID N.º 33)
Humano: GKTKIATPRG-COOH	(SEQ ID N.º 34)
Humano: NH <sub>2</sub> -AAPPQKQQA	(SEQ ID N.º 35)
Humano: AGHVTQARMVS-COOH	(SEQ ID N.º 36)
Humano: NH <sub>2</sub> -KSKDGTGSDD	(SEQ ID N.º 37)

Epítomos peptídicos de sitio de escisión de calpaína

<u>Pro-calpaína-2 (humano, rata):</u>	SHERAIK	(SEQ ID N.º 38)
<u>Calpaína-1 activada (humano, rata):</u>	Péptido NH <sub>2</sub> -LGRHENA	(SEQ ID N.º 39)

**[0125]** Se introduce un enlazador C<sub>6</sub> y cisteína N-terminal para el posterior acoplamiento del péptido con la proteína hemocianina de lapa californiana (KLH) utilizando un reactivo de reticulación de enlace sulfo (Pierce).

5 Tras las determinaciones sobre la eficiencia de acoplamiento, los péptidos se dializan, se concentran, y se utilizan 2 mg de proteína conjugada para múltiples inyecciones de antígenos en dos conejos. Tras 3 meses, las muestras de suero recogidas de los conejos se someten a purificación por afinidad utilizando el mismo péptido sintético acoplado a resinas de enlace sulfo (Pierce). El anticuerpo purificado por afinidad se dializa frente a TBS (20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl), antes de concentrarse y almacenarse en 50 % de glicerol a -20 °C.

10

**[0126]** También se producen anticuerpos adicionales para productos de escisión específicos. Entre los antígenos utilizados se incluyen: Cys-eAhx-SSTGSIDMVD-OH (SEQ ID N.º 40) para producir un anticuerpo específico para TBDP-45K (caspasa) en humano y rata; Cys-C6-PTREPKKVAVV (SEQ ID N.º 41) para producir un anticuerpo específico para TBDP-14K-20K (calpaína) de humano y rata; NH<sub>2</sub>-KSKDGTGSDD-C6-Cys (SEQ ID N.º 42) para TBDP-35K (calpaína) humana; ESPLQTPTED-C6 (SEQ ID N.º 43) para TBDP-14k de humano; y Cs-Cy6-HVTQARMVS (SEQ ID N.º 44) para C-terminal de TBDP-10K humana. También se producen otros anticuerpos presentados en las solicitudes americanas con n.º de publicación 2005/0260697.

15

**[0127]** La proteína tau de rata (100 ng) se digiere ya sea con calpaína-2 o bien con caspasa-3. Los fragmentos resultantes se separan por medio de SDS-PAGE y se sondan mediante transferencia Western con los anticuerpos planteados. Tanto la calpaína-1 como la calpaína-2 digieren tau en varios fragmentos inmunorreactivos (42 kDa, 35 kDa y 15 kDa), mientras que la asimilación con caspasa-3 produce únicamente un doblete de fragmento limitado de 48kDa/45kDa (figura 7). Las sondas con anticuerpos de TauBDP-35K (calpaína) y TauBDP-45K (caspasa) confirman la especificidad de fragmento de los anticuerpos y ninguna reactividad cruzada con proteína intacta u otros fragmentos. (Figura 7).

20

**[0128]** Los anticuerpos de TBDP se analizan para determinar su reactividad cruzada con BDP de Tau humana. La Tau humana purificada permanece sin tratar, o bien se trata con calpaína-2, o bien se trata con caspasa-3 para producir TBDP. Estos se comparan con TBDP producidos mediante MTX, o células de cultivos cerebrocorticales de rata tratadas con EDTA (CTX) según se ha descrito anteriormente, así como para modelos sin tratar o con TCE ipsilateral en el hipocampo (IH) o con TCE ipsilateral en la corteza ipsilateral (IC). Los

25

fragmentos resultantes se separan mediante SDS-PAGE y se sondan con anticuerpo monoclonal de tau antitotal, según se representa en la figura 8. El tratamiento de tau humana con calpaína o caspasa produce numerosos productos de degradación. Las células CTX tratadas con MTX muestran escisiones de Tau específicas de calpaína y las células CTX tratadas con EDTA muestran escisiones de Tau específicas de caspasa. La escisión de Tau mediada por proteasa tras el TCE se representa tanto en el modelo IH como en el modelo IC de TCE. (Figura 8A). El anticuerpo específico anti-TBDP-35K no muestra reactividad cruzada con la Tau humana (figura 8B).

**[0129]** Los anticuerpos específicos de TBDP se utilizan para sondar cultivos cerebrocorticales de ratas que no han recibido tratamiento o que han sido sometidas a tratamiento con: una exposición excitotóxica a NMDA - (Nath *et al.*, 1998); el inductor de apoptosis estaurosporina (STS) (0,5  $\mu$ M) que activa calpaína y caspasa-3 durante 24 horas (Zhang *et al.*, 2009); o el quelante  $Ca^{2+}$  y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) inductor de apoptosis como una exposición dominada por caspasa (Waterhouse *et al.*, 1996; Chiesa *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 1998; McGinnis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009). Cada uno de los tratamientos con NMDA, EDTA y STS produce una amplia neurodegeneración *in vitro*. El NMDA induce una mezcla de fenotipo necrótico/apoptótico, mientras que tanto STS como EDTA producen un fuerte fenotipo apoptótico (figura 9).

**[0130]** Los lisados de cultivos cerebrocorticales de rata se sondan con el anticuerpo total-Tau o bien con anticuerpos específicos del fragmento. Con el tratamiento de NMDA, la Tau se degrada de forma significativa en múltiples fragmentos (42K, 35K, y 15K) incluyendo una señal dominante de TauBDP-35K mediada por calpaína con una mínima Tau-BDP45K mediada por caspasa (figura 10). El inhibidor de caspasa (Z-VAD; 20  $\mu$ M) no produce cambios significativos en el patrón de degradación de Tau. El inhibidor (SNJ-1945; 20  $\mu$ M) reduce significativamente el fragmento de peso molecular inferior, incluyendo un bloqueo completo de la TauBDP-35K mediada por calpaína, aunque persisten algunos fragmentos con un elevado peso molecular (425-48K). Resulta interesante el hecho de que, cuando se sondó una transferencia con el anticuerpo de Tau-BDP45K mediado por anti-caspasa, se detecta TauBDP-45/48K en el carril de cotratamiento de NMDA con inhibidor de calpaína. El tratamiento con NMDA produce destacados SBDP150/SBDP145 mediados por calpaína, con bandas menores de SBDP120 mediado por caspasa-3. Estos fragmentos se inhiben intensamente con sus respectivos inhibidores de proteasa (SNJ, Z-VAD). En conjunto, estos datos sugieren que en el paradigma de NMDA, la calpaína es la ruta dominante en la fragmentación de tau, con una contribución de caspasa mucho menor.

**[0131]** Al utilizar el inductor de apoptosis EDTA, Tau se trunca únicamente a Tau-BDP48K/45K, según confirma la transferencia de tau total y la transferencia de anti-Tau-BDP45K mediada por caspasa (figura 10). Ambos fragmentos son sensibles al inhibidor de caspasa (Z-VAD), pero no son sensibles al inhibidor de calpaína (SNJ-1945). Así, la exposición a EDTA produce una condición directa de fragmentación de tau dominada con caspasa. El patrón de degradación de all-espectrina a partir de la exposición a EDTA confirma la presencia de SBDP120 mediado por caspasa, pero no de fragmento de SBDP145 generado por calpaína.

**[0132]** El tratamiento con estaurosporina representa un equilibrio de tau-BDP de mayor peso molecular (45-48K) y de menor peso molecular (35K, 15K) (figura 10). Los fragmentos 48/45K están mediados por caspasa según confirma la transferencia del anticuerpo específico del fragmento tau-45K, así como su sensibilidad al inhibidor de caspasa (Z-VAD). Del mismo modo, se confirma la implicación de calpaína por medio del anticuerpo específico de TauBDP-35K y su sensibilidad al inhibidor de calpaína SNJ-1945. Resulta importante que la presencia de inhibidor de calpaína elevó intensamente la Tau-DBP-48k/45K tanto por la transferencia de tau total como por la transferencia anti-Tau-48/45K, lo cual sugiere la implicación dual tanto de calpaína como de caspasa. Este hecho está también en consonancia con el patrón de degradación de all-espectrina. El tratamiento con STS produce un paradigma neurodegenerativo en el que existe una contribución dual y equilibrada tanto de calpaína como de caspasa en la fragmentación de tau.

**[0133]** Los TBDP se producen mediante lesión por CCI en ratas. Se lisan las muestras de tejido cortical e hipocampal obtenidas tras la lesión por CCI como en el Ejemplo 3, y las proteínas se separan mediante SDS-PAGE seguida de transferencia Western para identificar la presencia de TBDP específicos. En la corteza cerebral de rata, los TBDP-15K aumentan rápidamente con la presentación temprana a 2 horas y alcanza niveles máximos alrededor de 6 horas después del CCI (figuras 11A, B). Posteriormente, los niveles descienden tras 48 horas después de la lesión. TBDP-25K muestra aumentos más graduales, alcanzando un nivel máximo a las 48 horas (figuras 11A, B). También se observan otros BDP de Tau. Las numerosas bandas observadas tanto en las tratadas de forma simulada como en las tratadas tras el CCI representan los numerosos estados de fosforilación e isoformas de la proteína Tau. En la corteza contralateral, no se observa proteólisis de tau en la totalidad de los tres grupos incluso cuando las inmunotransferencias de tau están sobredesarrolladas intencionadamente (datos no mostrados). En el hipocampo de rata, TBDP-15K está presente pasadas 2 horas de la lesión con un nivel máximo observado a las 24 horas (figuras 11C, D). Se observan resultados similares para TBDP-35K (figuras 11C, D). En general, el patrón de fragmentación *in vitro* de la proteína tau mediada por calpaína (TauBDP-35K, 25K y 15K) (figura 7) coincide con la proteólisis de tau *in vivo* tras el TCE (figura 11). Puesto que el dispositivo de impacto cortical controlado se dirige a la corteza cerebral, tiene lugar una lesión focal mayor en el tejido de la corteza ipsilateral que en el tejido del hipocampo, el cual impacta de manera indirecta mediante fuerza contusiva. En consecuencia, existe una proteólisis de tau más amplia en la corteza que en el hipocampo.

**[0134]** Las mismas muestras se sondan utilizando los anticuerpos específicos para TBDP. La figura 12A representa actividad de calpaína específica que produce TBDP-35K en corteza de rata y ninguna escisión mediada por caspasa en la corteza de rata tras el CCI. Se observan resultados similares en el hipocampo de rata (figura 12B). Así, la neurodegeneración inducida por CCI viene acompañada de la formación y acumulación de T

5 TBDP mediados por calpaína con únicamente contribuciones menores de fragmentos de Tau generados por caspasa en la corteza dañada.

**[0135]** Los perfiles de activación temporal de calpaína-1 y calpaína-2 en tauBDP-35K se examinan utilizando anticuerpo del nuevo N-terminal de calpaína-1 antiactivado (anti-LGRHENA) (SEQ ID N.º 39), o anticuerpo de N-terminal de pro-calpaína-2 (anti-SHERAIK) (SEQ ID N.º 38). La figura 13 muestra la activación tanto de calpaína-1 (A) como de calpaína-2 (B) en corteza dañada. La calpaína-1 presenta un máximo temprano en los días 2 y 3 y disminuye posteriormente (figura 13A), mientras que la calpaína-2 presentaba también un máximo en el día 2 pero se mantuvo en los días 3 y 5 (figura 13.B). La activación de calpaína-1 coincide muy bien con la apariencia de TBDP-35K específica de calpaína.

10

**[0136]** La escisión de Tau mediada por calpaína se muestra además mediante su inhibición utilizando el inhibidor de calpaína SNJ-1945, que se administra (100 mg/kg, bolo intravenoso) inmediatamente después del CCI. La sonda del tejido cortical se somete a inmunotransferencia con el anticuerpo específico de TBDP-35K. El aumento de TBDP-35K se reprime por medio de SNJ-1945 (figura 14). Así, la calpaína-1 actúa como una importante proteasa de escisión de Tau tras el TCE.

15

Ejemplo 7: Estudio sobre traumatismo craneoencefálico grave en humanos

**[0137]** Un estudio incluía 46 sujetos humanos que padecían traumatismo craneoencefálico grave. Cada uno de estos sujetos se caracterizaba por ser mayor de 18 años, presentar una GCS inferior o igual a 8 y necesitar ventriculostomía y neuromonitorización como parte de los cuidados rutinarios. Un grupo control A, descrito de forma sinónima como controles LCR, incluía 10 individuos que eran también mayores de 18 años o más y no presentaban lesiones. Las muestras se obtuvieron durante la anestesia espinal para intervenciones quirúrgicas rutinarias o para el acceso a LCR asociado al tratamiento de hidrocefalia o meningitis. Un grupo control B, descrito de forma sinónima como controles normales, contaba en total con 64 individuos, cada uno de 18 años de edad o más y que padecían múltiples lesiones sin daño cerebral. En la Tabla 9 se exponen más detalles con respecto al universo del estudio:

20

25

**Tabla 9:** Demografía de los sujetos para el estudio de traumatismo craneoencefálico grave

	TCE	Controles LCR	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. Típ.	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 %)
<hr/>			
<u>GCS en Urgencias</u>			
Media	5,3		
<hr/>			
Desv. Típ.	1,9		
<hr/>			

30

**[0138]** El nivel de biomarcadores encontrado en las primeras muestras disponibles de LCR para un primer y un segundo paciente (figuras 15A y B) ilustra GFAP y GBDP elevados en la sala de ingreso de Urgencias en el caso de un primer paciente (figura 15A). Del mismo modo, un segundo paciente al que se le había extraído LCR en un plazo de 6 horas tras el TCE mostró la presencia de niveles elevados de GFAP y GBDP en este momento (figura 15B). El segundo paciente mostró también niveles detectables pero inferiores de GFAP y GBDP 18 horas después de la lesión. Los niveles de SBDP 150/145 y SBDP 120 son también elevados en el LCR del primer paciente en la sala de ingreso de Urgencias con niveles relativamente inferiores en momentos posteriores (figura 15A).

35

**Ejemplo 8:**

[0139] Identificación de autoanticuerpos como biomarcadores de TCE. A continuación, se producen autoanticuerpos de TCE grave para proteínas neuronales y son detectables en la sangre de sujetos. Se obtiene lisado cerebral de un sujeto humano con TCE *post mortem* y se solubiliza con tampón de lisis que contenía 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 5 mM de EGTA, 1 % de Triton X-100, 1 mM de NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, y un comprimido de cóctel inhibidor de proteasas (Roche, Indianápolis, Indiana). Los lisados se separan mediante SDS-PAGE y posteriormente se tiñen para determinar el total de proteína (figura 16A) y se traspasan a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad Laboratories) para sondarse. Las transferencias se sondan utilizando suero obtenido a partir de un donante control humano (B) o a partir de un humano obtenido 10 días después del TCE (C) y se detectan autoanticuerpos utilizando anti-IgG/IgM. Se observan varias bandas intensas en el suero del sujeto tras el TCE que indican la presencia de autoanticuerpos séricos.

[0140] El suero humano contiene autoanticuerpos que se observan a niveles crecientes tras el TCE. El suero de cinco controles humanos individuales y sujetos con TCE se sonda para determinar la presencia de autoanticuerpos. Las muestras de lisado cerebral humano solubilizado post-TCE según se han descrito anteriormente se separan mediante SDS-PAGE y se transfieren a membranas de PVDF mediante el método iBlot. La transferencia se sonda ya sea con suero de sujetos control humanos normales o bien de cinco sujetos con TCE en los que se obtienen muestras 72 horas después del TCE o bien 30 días después del TCE. Tras varios lavados con TBST, las membranas de PVDF se retiran del aparato de cribado múltiple y se lavan tres veces más, y después se incuban finalmente con una IgG+IgM antihumana de cabra conjugada con AP o IgG antihumana de asno conjugada con AP diluida 1:10.000 durante una hora y después se lava con TBST. Las señales positivas se visualizan utilizando sustrato de fosfatasa 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, EE. UU.). La figura 17 representa la presencia de autoanticuerpos para varias proteínas cerebrales humanas que están presentes tras el TCE. La cantidad de autoanticuerpo se incrementa desde las 72 horas hasta el día 30, según se representa mediante el aumento de la señal en el momento posterior.

[0141] El nivel de autoanticuerpo se incrementa con el tiempo tras el TCE. El suero de un único sujeto humano obtenido en el ingreso y hasta 30 días después del TCE se utiliza para sondear lisados cerebrales humanos cargados con concentraciones equivalentes en cada carril de un gel y se transfieren a PVDF. El autoantígeno es una IgG según se ha demostrado mediante la detección utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG (figura 18A). La velocidad con la que se produce autoanticuerpo es sorprendentemente rápida, apareciendo niveles detectables en el día 5 e incrementándose hasta el día 30 (figura 18A). La confirmación de que los autoanticuerpos son específicos de IgG se ilustra en la figura 18B, donde se sondan transferencias con anticuerpos secundarios para especies concretas de inmunoglobulina.

[0142] Los autoanticuerpos se dirigen a antígenos específicos cerebrales. Los lisados (30 µg de proteína) de cerebro, corazón, riñón, pulmón, bazo, intestino, piel, músculo y testículos humanos se separan mediante SDS-PAGE, se transfieren a PVDF y se detectan utilizando transferencia Western mediante sondas con el suero de un sujeto humano con TCE en una disolución de 1:100. Cualquier autoanticuerpo unido se detecta mediante IgG/IgM antihumana de cabra conjugada con AP en una disolución de 1:10.000. La figura 19 muestra que autoanticuerpos de sujetos con TCE reconocen autoantígenos que alternan entre 38 y 52 kDa únicamente de cerebro.

[0143] Los autoanticuerpos se dirigen a un producto de degradación como resultado de la digestión de calpaína. Los lisados cerebrales de ratas que no han recibido tratamiento se cargan en un gel y se sondan con el suero de un sujeto humano con TCE. En ausencia de productos de escisión de calpaína, no se observa ningún reconocimiento de antígeno (datos no mostrados). No obstante, el lisado cerebral de rata digerido por calpaína y cargado en concentraciones idénticas se reconoce por autoanticuerpo de paciente humano con TCE, detectable comenzando desde el día 5 (carril 12) y aumentando hasta el día 10 (carril 17) tras el TCE (figura 20).

[0144] Para identificar qué antígenos fueron reconocidos por autoanticuerpos en suero humano tras el TCE, se cargaron GFAP purificada, neurofascina y PBM en geles, se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a PVDF y se sondaron con suero de un sujeto humano con TCE obtenido 10 días después de la lesión, seguido por la detección utilizando un anticuerpo anti-IgG. Cada una de GFAP, neurofascina y PBM se detecta como autoantígenos reconocidos mediante autoanticuerpos generados en suero humano tras el TCE (figura 21).

[0145] Se confirma que GFAP es reconocida por autoanticuerpos en el suero de un sujeto humano obtenido 10 días después del TCE. Los lisados cerebrales humanos *post mortem* se someten a cromatografía de intercambio iónico y las fracciones eluidas se cargan en un gel y se separan. El total de proteínas en cada fracción se tiñe con azul de Coomassie (figura 22A). Las fracciones idénticas se separan y se transfieren a PVDF para la detección de autoantígenos mediante sondas con suero de un sujeto humano con TCE (figura 22B). Las bandas superpuestas en el gel teñido se extraen y se someten a análisis de secuencias. Los análisis de secuencias revelan que los autoanticuerpos presentes en suero humano tras el TCE reconocen la GFAP.

[0146] Los experimentos de competencia de antígenos confirman que autoanticuerpos presentes en suero humano tras el TCE reconocen GFAP y Tau. Los lisados cerebrales humanos (300 µg) se sondan con suero de tres sujetos humanos con TCE solos o preincubados con diversas concentraciones de GFAP (2,6 µg; 10 µg

(Banyan Biomarkers)) o Tau (2,6 µg o 10 µg (Cytoskeleton Co.)). La presencia de 2,5 µg de GFAP reduce la capacidad de autoanticuerpos específicos de GFAP para reconocer GFAP presente en lisados cerebrales (figura 23). La señal se reduce posteriormente mediante 10 µg de GFAP. Del mismo modo, la preincubación de suero con 10 µg de proteína Tau muestra un menor reconocimiento de antígenos que 2,6 µg de Tau, lo cual indica la presencia de autoanticuerpos específicos de Tau en suero humano tras el TCE (figura 23).

[0147] Los autoanticuerpos para GFAP reconocen preferiblemente GBDP. Los geles se cargan con lisados cerebrales humanos y GFAP recombinante y purificada intacta y se sondan con un anticuerpo anti-GFAP (figura 24A), suero humano tras el TCE que contiene autoanticuerpos para GFAP (figura 24B), y/o los geles se tiñen con azul de Coomassie (figura 23C). Los autoanticuerpos muestran un reconocimiento mucho mayor de GBDP naturalmente derivados de lisados cerebrales en comparación con la GFAP recombinante intacta.

**Ejemplo 9:**

[0148] Detección de autoanticuerpos en estudios de TCE humano. Se obtienen muestras de suero de sujetos humanos tras el TCE en diversos momentos. La Tabla 10 representa el número de pacientes con muestras proporcionadas en tres fases distintas de TCE: fase aguda + subaguda (desde la lesión hasta el día 10); fase subaguda de TCE grave (desde el día 1 hasta el día 30); y fase crónica de TCE grave (>1 mes después del TCE).

**Tabla 10:**

	Casos	Positivo a autoanticuerpo	Porcentaje (%)	95 % de CI
Normal	41	7	17,7	0,0821-0,3158
TCE grave (Día 1-10) - fase aguda + subaguda	28	21	75	0,5639-0,8758
TCE grave (Día 1, Día 7, Día 30) - fase subaguda	10	6	60	0,3116-0,8329
TCE grave (de 1 mes a 3 años tras la lesión) - fase crónica	28	21	75	0,5639-0,8758

[0149] Los intervalos de confianza se establecen mediante métodos de Wald modificados. En general, el número de pacientes con TCE que presentan autoanticuerpos en su suero es mucho mayor que en controles normales.

[0150] La intensidad de autoanticuerpos se mide mediante transferencia Western utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 8. Un nivel de intensidad de 5 se califica como el nivel más alto de autoanticuerpos, mientras que un nivel de intensidad de cero no representa ningún autoanticuerpo detectable mediante los procedimientos de transferencia Western. Los controles sanos se comparan con muestras de estudio obtenidas por los grupos de estudio de Banyan Biomarkers, UP e Italy. La mayoría de pacientes con TCE presentaban niveles detectables de autoanticuerpos en su suero (figura 25).

**Ejemplo 10:**

[0151] Se lleva a cabo un estudio adicional de sujetos humanos diagnosticados con TCE para analizar la correlación entre la presencia de autoanticuerpos y la supervivencia. Las muestras de suero se obtienen a partir de veinte sujetos humanos con TCE grave (calificación ICG de 3-5) o leve (calificación ICG de 6-15). La Tabla 11 representa las características de sujetos del estudio.

**Tabla 11:**

<b>TCE (HU-SZ)</b>	
n	20
Edad, media de años (DT)	52±21
Rango	24-86
F/M, n (%)	3/17 (15/85)

<b>Etnia</b>	
No hispano ni latino	20
<b>Raza</b>	
Caucásica	20
<b>Mejor GCS</b>	
3-5	10
6-15	9
<b>Mecanismo de lesión:</b>	
Vehículo de motor	7
Motocicleta	1
Caída	11
Otro	1

[0152] En general, 6 (el 30 por ciento) de los sujetos dieron resultado negativo para autoanticuerpos en su suero. El setenta por ciento muestra desarrollo positivo de autoanticuerpos, con un 10 % mostrando niveles de autoanticuerpos muy positivos, según se representa en la Tabla 12.

**Tabla 12:**

Intensidad	Frecuencia	Porcentaje
<b>Negativa</b>	6	30
<b>Positiva (1-4)</b>	12	60
<b>Muy positiva (5)</b>	2	10

5

**Tabla 13:**

Supervivencia de 6 meses	Frecuencia	Porcentaje
<b>Resultado favorable</b>	5	27,78
<b>Resultado desfavorable</b>	13	72,22

[0153] En general, hay más sujetos masculinos y femeninos que presentan autoanticuerpos que los que no los presentan (figura 26A). Entre los sujetos con menos de 56 años de edad, hay más que presentan autoanticuerpos que los que no los presentan. Para los sujetos de 57 a 71 años de edad y de 72 a 84 años de edad, dos sujetos presentan autoanticuerpos y dos sujetos no los presentan (figura 26B).

10

[0154] La presencia de autoanticuerpos es relativamente superior en sujetos con una escala GCS de 6-15, aunque más sujetos con una escala GCS de 3-5 son también positivos a autoanticuerpos (figura 27). Resulta interesante que los sujetos con resultado desfavorable (muerte <6 meses) muestran una mayor tendencia al desarrollo de autoanticuerpos en suero que los sujetos con un resultado favorable (figura 28). Esto indica que la presencia de autoanticuerpos se vincula a la supervivencia.

15

[0155] El nivel de autoanticuerpos en la escala de intensidad de 5 puntos guarda relación con los niveles de GFAP y UCHL1 en suero recogido en un plazo de 24 horas desde el TCE. Las muestras de suero de sujetos humanos recogidas en un plazo de 24 horas tras el TCE también se analizan para determinar la presencia y el nivel de UCHL1, GFAP, y SBDP145 mediante ELISA básica según se describe en el Ejemplo 2. A continuación, se realiza un gráfico de estos niveles frente a la intensidad de autoanticuerpos. Como se representa en la figura 29, el incremento de los niveles de GFAP y UCHL1 guarda relación con el aumento de la intensidad de

20

autoanticuerpos. La GFAP se vincula a un coeficiente de correlación de Pearson de 0,72 y un P-valor de 0,0009. La UCHL1 se vincula a una correlación de Pearson de 0,56 y un P-valor de 0,02.

5 **[0156]** Se observan correlaciones similares en LCR tomado de sujetos humanos en un plazo de 24 horas tras el TCE. El nivel de GFAP se relaciona con un desarrollo posterior de autoanticuerpos con una correlación de Pearson de 0,47 y un P-valor de 0,07. Los niveles de UCHL1 e intensidad de autoanticuerpo se asocian a una correlación de Pearson de 0,56 y a un P-valor de 0,02. El nivel de SBDP145 también se relaciona con intensidad de autoanticuerpo que muestra una correlación de Pearson estadísticamente significativa de 0,62 y un P-valor de 0,01. (Figura 30) Así, el nivel de autoanticuerpos guarda relación con el nivel de proteínas de biomarcador solubles tanto en suero como en LCR en sujetos humanos.

10 **[0157]** La abundancia relativa de autoanticuerpos en el suero de sujetos se mide mediante transferencia Western a través de técnicas similares a las descritas en el Ejemplo 9 con un nivel de intensidad máximo de 5. En general, los sujetos femeninos muestran una intensidad de autoanticuerpos superior a la de los varones (figura 31A). Entre aquellos que presentan un resultado favorable (supervivencia >6 meses), los sujetos masculinos presentan una mayor intensidad de autoanticuerpo que las mujeres (figura 31B). En general, aunque los sujetos femeninos muestran una mortalidad reducida, también muestran una mayor intensidad de autoanticuerpo, y aunque los varones muestran una mortalidad superior, la intensidad de autoanticuerpos es inferior (figura 31C). Estos datos sugieren que existe una correlación de género inversa entre intensidad de autoanticuerpo y resultado.

20 **[0158]** Cuando la intensidad media se relaciona con la supervivencia independientemente del género, no se puede observar una correlación entre intensidad de autoanticuerpo y supervivencia superior a 6 meses (figura 32A). Así, la intensidad funciona como un predictor de resultado únicamente a nivel de dependencia del género. La presencia de autoanticuerpos independientes de su intensidad también funciona para predecir resultado a nivel de dependencia del género. Entre sujetos femeninos, la presencia de autoanticuerpos guardaba relación con una mayor supervivencia a pesar de que la intensidad es, de promedio, inferior (figura 32B). Es menos probable que las mujeres no supervivientes muestren la presencia de autoanticuerpos, aunque la intensidad es más elevada (figura 32B). Así, entre los sujetos de estudio femeninos, la presencia de niveles bajos de autoanticuerpos sugiere un mejor resultado con respecto a la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos. Entre los sujetos de estudio masculinos, aunque existen menos sujetos de estudio con un resultado favorable que muestren la presencia de autoanticuerpos, es más posible que aquellos que presenten una intensidad más elevada sobrevivan (figura 32C). Es más probable que los hombres no supervivientes presenten autoanticuerpos, pero su intensidad es inferior (figura 32C). En general, la frecuencia e intensidad de autoanticuerpos guarda relación con el resultado de forma que depende del género.

30 **[0159]** La intensidad de autoanticuerpos tiende a ser más elevada con la gravedad de TCE medida mediante la escala GCS (figura 33). Los sujetos con un valor de GCS de 3 muestran una intensidad de autoanticuerpos mucho más elevada que la que muestran sujetos con una mayor escala GCS de 7. Una tendencia descendente con un incremento de la escala GCS sugiere que es más probable que los sujetos con una mayor intensidad de autoanticuerpos presenten una escala GCS reducida y una mayor gravedad de TCE.

#### **Ejemplo 11:**

40 **[0160]** Niveles séricos o de LCR de biomarcadores de ácido nucleico como medida de lesión neuronal. De la misma forma que las proteínas se introducen en el LCR y en los compartimentos plasmáticos tras la lesión cerebral o de órgano, también lo hacen el ARN y el ADN. Las células que experimentan apoptosis o necrosis liberan biomarcadores de ácido nucleico a la sangre o al LCR (figura 34). La gravedad y el sitio de la lesión se pueden identificar mediante ensayos apropiados de PCR en tiempo real para cuantificar la cantidad de ARN específicos del tipo de célula. Entre los ejemplos de ARN específicos de neuronas se incluyen beta III tubulina, UCHL1, GFAP y sinaptofisina.

45 **[0161]** Las muestras de sangre entera obtenidas a partir de sujetos humanos del estudio del Ejemplo 7 se utilizan para determinar el nivel de ácidos nucleicos que codifican GFAP o UCHL1 en estas. La figura 35 muestra la presencia de mayores niveles de proteínas GFAP y UCHL1 en suero en sujetos con TCE grave. Para determinar si el ARN que codifica GFAP o UCHL1 está presente en el suero, se utilizan análisis séricos mediante técnicas similares a las descritas en Rainer, TH, *et al.*, Clin Chem, 2003; 49:562-560. En pocas palabras, se extraen 10 ml de sangre del sujeto de la vena antecubital de cada sujeto tras el ingreso, se recogen en tubos que contienen EDTA, y se centrifugan dos veces a 3000xg durante 15 min. Además, o de forma alternativa, se filtra el plasma para eliminar material celular mediante centrifugación a través de un filtro de 0,2 micrómetros. El plasma sobrenadante libre de células se transfiere a tubos comunes de polipropileno que contienen reactivo de ARN estabilización de ARN/ADN para sangre/médula ósea (Roche Diagnostics) y se almacena a -80 °C a la espera de su posterior procesamiento.

50 **[0162]** El ARNm de Poli(A)<sup>+</sup> se extrae utilizando el kit de aislamiento de ARNm para sangre y médula ósea (Roche Diagnostics) conforme al protocolo del fabricante. El ADNc se sintetiza y se amplifica en una reacción de PCR de 50 µl utilizando el juego de reactivos de RT-PCR Qiagen One Step (Qiagen). En resumen, el ARNm en 60 µl de plasma se transcribe de forma inversa con cebadores específicos para GFAP o UCHL1, utilizando la

mezcla de enzimas para RT-PCR One Step (Qiagen). El ADNc resultante se mide por medio del ensayo de Taqman utilizando cebadores y sondas para GFAP: cebador directo - ACATCGAGATCGCCACCTACA (SEQ ID N.º 45); cebador inverso - GTCTGCACGGGAATGGTGAT (SEQ ID N.º 46); y sonda marcada - AGCTGCTAGAGGGCGAGGAGAACCG (SEQ ID N.º 47) utilizando una temperatura de hibridación de 60 °C conforme al protocolo de Pattyn, F, *et al.*, Nucleic Acids Research, 2003; 31(1):122-123. Para la detección de UCHL1, los cebadores y sondas son: cebador directo - ACTGGGATTTGAGGATGGATCAG (SEQ ID N.º 48); cebador inverso - GCCTTCCTGTGCCACGG (SEQ ID N.º 49); sonda marcada - AATGAGGCCATACAGGCAGCCCATG (SEQ ID N.º 50) utilizando una temperatura de hibridación de 60 °C. En general, existe presencia de ARNm tanto para GFAP como para UCHL1 en plasma libre de células de sujetos tras el TCE.

**Ejemplo 12:**

**[0163]** La presencia de miARN asociados a TCE en humanos se detecta en suero humano un día después del TCE. El suero se recogió, se liberó de células mediante centrifugación a 3000xg durante 15 min y haciéndolo pasar a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se utilizó para preparar ARN total. El ARN total (5 µg) se fracciona por tamaño (nucleótidos b300) utilizando un filtro centrifugo YM-100 Microcon (Millipore). Se amplía el 3' de los ARN pequeños recogidos (b300 nucleótidos) con una cola de poli(A) utilizando polimerasa poli(A). Una etiqueta de oligonucleótido se liga a la cola de poli(A) para su posterior tinción con tinte fluorescente. Los ARN pequeños se hibridan durante toda la noche en un chip microfluídico µParaflo utilizando una bomba de microcirculación (Atactic Technologies). Cada sonda de detección en el chip consta de un segmento que codifica nucleótido modificado químicamente y complementario a secuencias objetivo de miARN de humano.

**[0164]** En las Tablas 14 y 15 se presentan las secuencias de miARN que muestran al menos un incremento o descenso del doble en el suero de sujetos con TCE en comparación con el suero de sujetos control humanos.

**Tabla 14:** miARN regulado por aumento detectado en suero humano tras TCE.

Nombre de S14_hsa_miRNA	Secuencia de S14_hsa_miRNA	SEQ ID N.º	S14_hsa_miRNA_MIMAT	Suero de TCE con aumento de pliegue > 2 / Suero control (Log2)
hsa-miR-744	UGCGGGGCUAGGGCUAACAGCA	51	MIMAT0004945	2,22
hsa-miR-762	GGGGCUGGGGCCGGGGCCGAGC	52	MIMAT0010313	2,27
hsa-miR-711	GGGACCCAGGGAGAGACGUAAG	53	MIMAT0012734	2,41
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU	54	MIMAT0002174	2,46
hsa-miR-765	UGGAGGAGAAGGAAGGUGAUG	55	MIMAT0003945	2,58
hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	56	MIMAT0000063	2,61
hsa-miR-663	AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC	57	MIMAT0003326	2,90
hsa-miR-30c-1*	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC	58	MIMAT0004674	2,94
hsa-let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU	59	MIMAT0000415	2,95
hsa-miR-1246	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG	60	MIMAT0005898	3,02
hsa-miR-1275	GUGGGGGAGAGGCUGUC	61	MIMAT0005929	3,88
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	62	MIMAT0005880	4,43
hsa-miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	63	MIMAT0000093	4,68
hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	64	MIMAT0004748	4,75
hsa-miR-1202	GUGCCAGCUGCAGUGGGGGAG	65	MIMAT0005865	5,90
hsa-miR-198	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	66	MIMAT0000228	8,51



ES 2 687 469 T3

hsa-miR-320c	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	67	MIMAT0005793	11,13
hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	68	MIMAT0000510	11,86
hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	69	MIMAT0005792	12,83
hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	70	MIMAT0000064	14,07
hsa-miR-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	71	MIMAT0000080	14,81
hsa-miR-320d	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	72	MIMAT0006764	14,91
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	73	MIMAT0002177	16,85
hsa-miR-425	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	74	MIMAT0003393	18,11
hsa-miR-92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	75	MIMAT0000092	25,52
hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	76	MIMAT0000062	26,23
hsa-miR-25	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	77	MIMAT0000081	29,86
hsa-miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAAGAAGGGAG	78	MIMAT0004761	30,87
hsa-miR-30d	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	79	MIMAT0000245	33,21
hsa-miR-185	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	80	MIMAT0000455	92,20
hsa-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	81	MIMAT0000280	102,06
hsa-miR-451	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	82	MIMAT0001631	137,35
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	83	MIMAT0000069	172,25

**Tabla 15:** miARN con regulación negativa detectado en suero humano tras TCE.

Nombre de S14_hsa_miRNA	Secuencia de S14_hsa_miRNA	SEQ ID N.º	S14_hsa_miRNA_MIMAT	Suero de TCE con reducción de pliegue > 2 / Suero control (Log2)
hsa-miR-675*	CUGUAUGCCCUCACCGCUCA	84	MIMAT0006790	0,27
hsa-miR-1910	CCAGUCCUGUGCCUGCCGCCU	85	MIMAT0007884	0,28
hsa-miR-1181	CCGUCGCCGCCACCCGAGCCG	86	MIMAT0005826	0,29
hsa-miR-1972	UCAGGCCAGGCACAGUGGCUCA	87	MIMAT0009447	0,30
hsa-miR-1229	CUCUCACCACUGCCCUCACAG	88	MIMAT0005584	0,30
hsa-miR-634	AACCAGCACCCCAACUUUGGAC	89	MIMAT0003304	0,31
hsa-miR-449b*	CAGCCACAACUACCCUGCCACU	90	MIMAT0009203	0,31
hsa-miR-885-5p	UCCAUAACACUACCCUGCCUCU	91	MIMAT0004947	0,35
hsa-miR-1825	UCCAGUGCCCUCUCUCC	92	MIMAT0006765	0,35

ES 2 687 469 T3

hsa-miR-532-3p	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	93	MIMAT0004780	0,35
hsa-miR-1224-3p	CCCCACCUCCUCUCUCCUCAG	94	MIMAT0005459	0,37
hsa-miR-1260	AUCCCACCUCUGCCACCA	95	MIMAT0005911	0,41
hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	96	MIMAT0000446	0,41
hsa-miR-1233	UGAGCCCUGUCCUCCCGCAG	97	MIMAT0005588	0,42
hsa-miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCGCCCCGCA	98	MIMAT0003306	0,42
hsa-miR-1228	UCACACCUGCCUCGCCCCCC	99	MIMAT0005583	0,43
hsa-miR-197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	100	MIMAT0000227	0,43
hsa-miR-1226	UCACCAGCCCUGUGUCCCUAG	101	MIMAT0005577	0,43
hsa-miR-1296	UUAGGGCCCUGGCUCCAUCUCC	102	MIMAT0005794	0,43
hsa-miR-328	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	103	MIMAT0000752	0,44
hsa-miR-1976	CCUCCUGCCUCCUUGCUGU	104	MIMAT0009451	0,45
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACCCACA	105	MIMAT0003239	0,46
hsa-miR-766	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	106	MIMAT0003888	0,46
hsa-miR-1280	UCCCACCGCUGCCACCC	107	MIMAT0005946	0,46
hsa-miR-1470	GCCCUCCGCCCGUGCACCCCG	108	MIMAT0007348	0,46
hsa-miR-125b-1*	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	109	MIMAT0004592	0,46
hsa-miR-1227	CGUGCCACCCUUUCCCCAG	110	MIMAT0005580	0,47
hsa-miR-615-3p	UCCGAGCCUGGGUCUCCUCUU	111	MIMAT0003283	0,48
hsa-miR-1225-3p	UGAGCCCCUGUGCCGCCCCAG	112	MIMAT0005573	0,48
hsa-miR-1285	UCUGGGCAACAAAGUGAGACCU	113	MIMAT0005876	0,49

**[0165]** Las secuencias identificadas se someten a un análisis de conglomerados, según se muestra en la figura 36.

**[0166]** En las Tablas 16 y 17 se listan miARN adicionales con ubicaciones asociadas.

**Tabla 16:** Ejemplos de miARN específicos de cerebro o enriquecidos de cerebro.

Nombre del microARN	Ubicación en la región cerebral	Otras características
miR-92b	Subpallio ventral y dorsal, palio, tálamo (dorsal (DT) y ventral (VT)), hipotálamo, <i>retectum</i> , tegmento y rombencéfalo, así como en la zona proliferativa tectal, labio rómbico y zona marginal ciliar de retina	Precusores neuronales y células madre
miR-124	Cerebro y retina larvarios	Proliferación a diferenciación
miR-124	Neurona madura	
miR-222	Telencéfalo	
miR-135	Cerebro larvario	
miR-9	Zonas proliferativas periventriculares telencefálica, diencefálica y tectal, así como la neurona madura	
miR-183	Fotorreceptores de la retina, neuromastos sensoriales periféricos, neuronas sensoriales olfativas y células pilosas del oído.	
miR-34,	Células de la habérnula del cerebro adulto	
miR-218a	Neuronas motoras	

**Siete miARN específicos de cerebro humano: miR-9, -124a, -124b, -135, -153, -183, -219**

**Siete miARN enriquecidos de cerebro humano: miR-9\*, -125a, -125b, -128, -132, -137, -139**

**Tabla 17:** miARN con dianas putativas y funciones.

miARN	Dianas putativas de ARNm	Función/enfermedad
rno-miR-130a	sinaptotagmina VI, CRMP-2	Enfermedad poliQ
rno-miR-140*	<b>CRMP-2</b> , CAPN1	TCE, OACM
rno-miR-145	CRMP-2, sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1)	OACM, cáncer de colon
rno-miR-135a	<b>Sinaptotagmina-1</b> , Smad5	Cerebro enriquecido, cáncer colorrectal
miR-124	CAPN1, 2, 6	Específico del cerebro, neurogénesis
rno-miR-34b	<b>PBM</b> , sinaptotagmina IX, quinasa Rho, p53	Apoptosis/leucemia linfocítica crónica
rno-miR-19b	SYTL1, calpastatina, sinapsina I, CRMP-1, sintafilina, ATXN1	OACM, TCE, enfermedad poliQ

**[0167]** La presencia de miARN asociado a la regulación de GFAP se mide también en muestras de plasma libre de células según se ha descrito anteriormente. El miARN-125b aumenta en sujetos con enfermedades neurodegenerativas. Pogue, AI, *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 2010; 476:18-22. Al utilizar los mismos cebadores y sondas para detectar miARN-125b, se detectan mayores niveles de este miARN en plasma libre de células de sujetos tras el TCE. En pocas palabras, el ARN total del plasma libre de células se extrae con el Mini kit miRNeasy (Qiagen, Valencia, California) conforme a las instrucciones del fabricante La pureza de ARN se determina mediante determinación espectrofotométrica a 260/280 nm y 260/230 nm. Una relación de absorbanza de 260/280 nm mayor de 1,8 se considera normalmente un indicador aceptable de pureza de ARN. A continuación, se transcriben de forma inversa 10 ng de ARN total de cada muestra a ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de microARN de TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, California) y cebadores específicos de miARN (Applied Biosystems). La presencia de los miARN identificados en Dharap, A, y Vemuganti, R, J. *Neurochem.*, 2010; 113:1685-1691 se detecta en plasma libre de células de sujetos con TCE, así como en un conjunto independiente de sujetos tras un accidente cerebrovascular isquémico. Además, los niveles de los miARN identificados por Lei, P, *et al.*, *Brain Research*, 2009; 1284:191-201 se examinan para determinar su presencia en plasma libre de células.

### **Ejemplo 13:**

**[0168]** Secuencia de GFAP humana (SEQ ID N.º 114)

```

1 MERRRITSAA RRSYVSSGEM MVGGLAPGRR LGPGTRLSLA RMPPPLPTRV DFLAGALNA
61 GFKETRASER AEMMELNDRF ASYIEKVRFL EQQNKALAAE LNQLRAKEPT KLADVYQAEI
121 RELRLRLDQL TANSARLEVE RDNLAQDLAT VRQKLQDET N LRLEAENNLA AYRQEADEAT
181 LARLDLERKI ESLEEEIRFL RKIHEEEVRE LQEQLARQQV HVELDVAKPD LTAALKEIRT
241 QYEAMASSNM HEAEWYRSK FADLTDAAR NAELLRQAKH EANDYRRQLQ SLTCDLES LR
301 GTNESLERQM REQEERHVRE AASYQEALAR LEEEGQSLK D EMARHLQEYQ DLLNVKLALD
361 IEIATYRKLL EGEENRITIP VQTFSNLQIR ETSLDTKSVS EGH LKRNIVV KTVEMRDGEV
421 IKESKQEHKD VM

```

Los documentos y las publicaciones de patentes mencionadas en la memoria descriptiva resultan indicativos de los niveles de aquellos expertos en la materia a los que pertenezca la invención.

### LISTA DE REFERENCIAS

#### **[0169]**

- Leon, SA *et al.* (1977) *Patients Cancer Research* 37, 646
- Muller, H.M. *et al.* (2003) *Expert Rev Mol. Diagn.* 3, 443
- Silva, JM *et al.* (1999) *Cancer Research*, 59, 3251
- Lo, YM *et al.* (1997) *Lancet*
- Menke, TM y Warnecke, JM. (2004) *Ann NY Acad. Sci* 1022, 185-189.
- Hasselmann, D.O. *et al.* (2001) *Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. Clin. Chem.* 47: 1488-1489.
- Circulating Nucleic acids in plasma and Serum (CNAPS) III and serum proteomics. *Ann NY Acad Sci* 1022 (Eds. D.S.B. Hoon, B. Taback).
- Tan E.M. *et al.* 1966 *Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest.* 45:1732-1740.
- Rainer, TH *et al.* (2003) *Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. Clin Chem.* 49:562-560.
- Hmaouim K., Butt, A., Powrie, J., y Swaminathan, R. (2004) *Real-time Quantitative PCR Measurement of Circulatory Rhodopsin mRNA in Healthy Subjects and Patients with Diabetic Retinopathy. En: Circulating Nucleic acids in plasma and Serum (CNAPS) III and serum proteomics. Ann NY Acad Sci* 1022 (Eds. D.S.B. Hoon, B. Taback), pp 152-156.
- Rainer, TH *et al.* (2004) *Effects of filtration on glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase mRNA in the plasma of trauma patients and healthy individuals. Clin. Chem.* 50:206-208.
- Terryberry JW, Thor G, Peter JB. (1998) *Autoantibodies in neurodegenerative diseases: antigen-specific frequencies and intrathecal analysis. Neurobiol Aging* 19:205-216.
- Terryberry JW, Shoenfeld Y, Peter JB. (1998) *Clinical utility of autoantibodies in Guillain-Barre syndrome and its variants. Clin Rev Allergy Immunol* 16:265-273.

- Dambinova SA, Khounteev GA, Izykenova GA, Zavolokov IG, Ilyukhina AY, Skoromets AA. (2003) Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem* 49:1752-1762.
- 5 Dambinova SA, Izykenova GA, Burov SV, Grigorenko EV, Gromov SA. (1997) The presence of autoantibodies to N-terminus domain of GluR1 subunit of AMPA receptor in the blood serum of patients with epilepsy. *J Neurol Sci* 152:93-97.
- Goryunova AV, Bazarnaya NA, Sorokina EG, *et al.* (2007) Glutamate receptor autoantibody concentrations in children with chronic post-traumatic headache. *Neurosci Behav Physiol* 37:761-764.
- 10 ADAMS, J.H., GRAHAM, D.I., y JENNETT, B. (2000). The neuropathology of the vegetative state after an acute brain insult. *Brain*. 123, 1327-1338.
- ARNAUD LT, MYEKU N, FIGUEIREDO-PEREIRA ME. (2009) Proteasome-caspase-cathepsin sequence leading to tau pathology induced by prostaglandin J2 in neuronal cells. *J Neurochem*. 2009 110(1):328-42.
- 15 AVILA, J., PEREZ, M., LUCAS, J.J., GOMEZ-RAMOS, A., MARIA, I.S., MORENO, F., SMITH, M., PERRY, G., y HERNANDEZ, F. (2004). Assembly in vitro of tau protein and its implications in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 1, 97-101.
- BARTUS, R.T. (1997). The calpain hypothesis of neurodegeneration: evidence for a common cytotoxic pathway. *The Neuroscientist*. 3, 314-327.
- 20 BEER, R., FRANZ, G., SRINIVASAN, A., HAYES, R.L., PIKE, B.R., NEWCOMB, J.K., ZHAO, X., SCHMUTZHARD, E., POEWE, W., y KAMPFL, A. (2000). Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *Neurochem*. 75, 1264-1273.
- BINDER, L.I., FRANKFURTER, A., y REBHUN, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol*. 101, 1371-1378.
- 25 BITSCH, A., HORN, C., KEMMLING, Y., SEIPELT, M., HELLENBRND, U., STIEFEL, M., CIESIELCZYK, B., CEPEK, L., BAHN, E., RATZKA, P., PRANGE, H., y OTTO, M. (2002). Serum tau protein level as a marker of axonal damage in acute ischemic stroke. *Eur. Neurol*. 47, 45-51.
- BRAMLETT, H.M., y DIETRICH, W.D. (2002). Quantitative structural changes in white and gray matter 1 year following traumatic brain injury in rats. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 103, 607-614.
- BUKI, A., OKONKWO, D.O., WANG K.K.W., y POVLISSOCK, J.T. (2000) Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J. Neurosci*. 20, 2825-2834.
- 30 BUKI, A., SIMAN, R., TROJANOWSKI, J.Q., y POVLISSOCK, J.T. (1999). The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 58, 365-375.
- BARTUS, R.T. (1997). The calpain hypothesis of neurodegeneration: evidence for a common cytotoxic pathway. *The Neuroscientist*. 3, 314-327.
- 35 CANU, N., DUS, L., BARBATO, C., CIOTTI, M.T., BRANCOLINI, C., RINALDI A.M., NOVAK, M., CATTANEO, A., BRADBURY A., y CALISSANO, P. (1998). Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurosci*. 8, 7061-7074.
- CHRISTMAN, C.W., GRADY, M.S., WALKER, S.A., HOLLOWAY, K.L., y POVLISSOCK, J.T. (1994). Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. *J. Neurotrauma*. 11, 173-186.
- 40 CHUNG, C.W., SONG, Y.H., KIM, I.K., YOON, W.J., RYE, B.R., JO, D.G., WOO, H.N., KWON, Y.K., KIM, H.H., GWAG, B.J., MOOK-JUNG, I.H., y JUNG, Y.K. (2001). Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol. Dis*. 8, 162-172.
- CLARK, R.S., KOCHANNEK, P.M., WATKINS, S.C., CHEN, M., DIXON, C.E., SEIDBERG, N.A., MELICK, J., LOEFFERT, J.E., NATHANIEL, P.D., JIN, K.L., y GRAHAM, S.H. (2000). Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J. Neurochem*. 74, 740-753.
- 45 DELOBEL P, LEROY O, HAMDANE M, SAMBO AV, DELACOURTE A, BUÉE L. (2005) Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation. *FEBS Lett*. 579, 1-5.
- DIXON, C.E., CLIFTON, G.L., LIGHTHALL J.W., YAGHMAI, A.A., y HAYES, R.L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci*. 39, 253-262.
- DRUBIN, D.G., y KIRSCHNER, M.W. (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol*. 103, 2739-2746.
- 50 FRANZ, G., BEER, R., KAMPFL, A., ENGELHARDT, K., SCHMUTZHARD, E., ULMER, H., y DEISENHAMMER, F. (1995). Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *Neurology*. 60, 1457-1461.

- GABBITA SP, SCHEFF SW, MENARD RM, ROBERTS K, FUGACCIA I, ZEMLAN FP. (2005) Cleaved-tau: a biomarker of neuronal damage after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 22, 83-94.
- 5 GAMBLIN TC, CHEN F, ZAMBRANO A, ABRAHA A, LAGALWAR S, GUILLOZET AL, LU M, FU Y, GARCIA-SIERRA F, LAPOINTE N, MILLER R, BERRY RW, BINDER LI, CRYNS VL. Caspase cleavage of tau, linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 10032-10037.
- GARCÍA-SIERRA F, MONDRAGÓN-RODRÍGUEZ S, BASURTO-ISLAS G. (2008). Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 14, 401-9.
- GALE, S.D., JOHNSON, S.C., BIGLER, E.D., y BLATTER, D.D. (1995). Nonspecific white matter degeneration following traumatic brain injury. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 1, 17-28.
- 10 GARCIA, M.L., y CLEVELAND, D.W. (2001). Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 41-48.
- GUILLOZET-BONGAARTS AL, GARCIA-SIERRA F, REYNOLDS MR, HOROWITZ PM, FU Y, WANG T, CAHILL ME, BIGIO EH, BERRY RW, BINDER LI. (2005) Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 26, 1015-1022.
- 15 HIGUCHI, M., LEE, V.M., y TROJANOWSKI, J.Q. (2002). Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* 2, 131-150.
- JOHNSON, G.V., JOPE, R.S., y BINDER, L.I. (1989). Proteolysis of tau by calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1505-1511.
- KAMPFL, A., POSMANTUR, R.M., ZHAO, X., SCHMUTZHARD, E., CLIFTON, G.L., y HAYES R.L. (1997). Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: a review and update. *J. Neurotrauma* 14, 121-134.
- 20 KIRALY M, KIRALY SJ. (2007) Traumatic brain injury and delayed sequelae: a review--traumatic brain injury and mild traumatic brain injury (concussion) are precursors to later-onset brain disorders, including early-onset dementia. *ScientificWorldJournal*. 2007 Nov 12;7:1768-76.
- 25 KNOBLACH, S.M., NIKOLAEVA, M., HUANG, X., FAN, L., KRAJEWSKI, S., REED, J.C., y FADEN, A.I. (2002). Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome. *J. Neurotrauma* 19, 1155-1170.
- Kosik, K.S., y Finch, E.A. (1987). MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J. Neurosci.* 7, 3142-3153.
- 30 KÖVESDI E, LÜCKL J, BUKOVICS P, FARKAS O, PÁL J, CZEITER E, SZELLÁR D, DÓCZI T, KOMOLY S, BÜKI A. (2010). Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *Acta Neurochir (Wien)*. 152(1):1-17.
- KRISHNAMURTHY, S., y SNEIGE, N. (2002). Molecular and biologic markers of premalignant lesions of human breast. *Adv. Anat. Pathol.* 9, 185-197.
- 35 LITERSKY, J.M., SCOTT, C.W., y JOHNSON, G.V. (1993). Phosphorylation, calpain proteolysis and tubulin binding of recombinant human tau isoforms. *Brain Res.* 604, 32-40.
- MCCRACKEN, E., HUNTER, A.J., PATEL, S., GRAHAM, D.I., y DEWAR, D. (1999). Calpain activation and cytoskeletal protein breakdown in the corpus callosum of head-injured patients. *J Neurotrauma* 16, 749-761.
- 40 MCINTOSH, T.K., SMITH, D.H., MEANEY, D.F., KOTAPKA, M.J., GENNARELLI, T.A., y GRAHAM, D.I. (1996). Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Lab. Invest.* 74, 315-341.
- MCKEE AC, CANTU RC, NOWINSKI CJ, HEDLEY-WHYTE ET, GAVETT BE, BUDSON AE, SANTINI VE, LEE HS, KUBILUS CA, STERN RA. (2009). Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68(7):709-35.
- 45 MEDANA, I.M., y ESIRI, M.M. (2003). Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain.* 126, 515-530.
- NATH, R., MCGINNIS, K.J., NADIMPALLI, R., STAFFORD, D., y WANG, K.K.W. (1996). Effects of ICE-like proteases and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *NeuroReport.* 8, 249-255.
- 50 NATH, R., PROBERT, A., JR., MCGINNIS, K.M., WANG, K.K.W. (1998) Evidence for Activation of Caspase-3-like Protease in Excitotoxins- and Hypoxia/hypoglycemia-Injured Neurons. *J. Neurochem.* 71, 186-195.

- Newcomb JK, Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, Pike BR, Liu SJ, Clifton GL, y Hayes RL. (1997) Immunohistochemical study of calpain-mediated breakdown products to alpha-spectrin following controlled cortical impact injury in the rat. *J. Neurotrauma*. 14, 369-383.
- 5 NG, H.K., MAHALIYANA, R.D., y POON, W.S. (1994). The pathological spectrum of diffuse axonal injury in blunt head trauma: assessment with axon and myelin strains. *Clin. Neurol. Neurosurg*. 96, 24-31.
- PARK SY, FERREIRA A. (2005) The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci*. 25, 5365-5375.
- 10 PETTUS, E.H., CHRISTMAN, C.W., GIEBEL, M.L., y POVLSHOCK, J.T. (1994). Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. *J. Neurotrauma*. 11, 507-522.
- PIKE, B.R., ZHAO, X., NEWCOMB, J.K., WANG, K.K.W., POSMANTUR, R.M., y HAYES, R.L. (1998b). Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res*. 52, 505-520.
- 15 PIKE, B.R., ZHAO, X., NEWCOMB, J.K., POSMANTUR, R.M., WANG, K.K.W., y HAYES, R.L. (1998). Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *NeuroReport*. 9, 2437-2442.
- PIKE, B.R., FLINT, J., DAVE, J.R., LU, X.C., WANG, K.K., TORTELLA, F.C., y HAYES, R.L. (2004). Accumulation of calpain and caspase-3 proteolytic fragments of brain-derived alpha-spectrin in cerebral spinal fluid after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24, 98-106.
- 20 POSMANTUR, R., KAMPFL, A., SIMAN, R., LIU, J., ZHAO, X., CLIFTON, G.L., y HAYES R.L. (1997). A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*. 77, 875-88.
- RAO MV, MOHAN PS, PETERHOFF CM, YANG DS, SCHMIDT SD, STAVRIDES PH, CAMPBELL J, CHEN Y, JIANG Y, PASKEVICH PA, CATALDO AM, HAROUTUNIAN V, NIXON RA. (2008). Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST overexpression. *J Neurosci*. 28(47):12241-54.
- 25 RISSMAN RA, POON WW, BLURTON-JONES M, ODDO S, TORP R, VITEK MP, LAFERLA FM, ROHN TT, COTMAN CW. (2004) Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest*. 114(1), 121-30.
- 30 ROHN, T.T., RISSMAN, R.A., HEAD, E., y COTMAN, C.W. (2002). Caspase Activation in the Alzheimer's Disease Brain: Tortuous and Torturous. *Drug News Perspect*. 15, 549-557.
- SAATMAN, K.E., BOZYCZKO-COYNE, D., MARCY, V., SIMAN, R., y MCINTOSH, T.K. (1996). Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 55, 850-860.
- 35 SAATMAN, K.E., MURAI, H., BARTUS, R.T., SMITH, D.H., HAYWARD, N.J., PERRI, B.R., y MCINTOSH T.K. (1996). Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 3428-3433.
- SAATMAN, K.E, ZHANG, C., BARTUS, R.T., y MCINTOSH, T.K. (2000). Behavioral efficacy of posttraumatic calpain inhibition is not accompanied by reduced spectrin proteolysis, cortical lesion, or apoptosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 20, 66-73.
- 40 SHIMOHAMA S, TANINO H, FUJIMOTO S. (1999) Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging. *Biochem Biophys Res Commun*. 256,381-384.
- SIMAN R, MCINTOSH TK, SOLTESZ KM, CHEN Z, NEUMAR RW, ROBERTS VL. (2004) Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage. *Neurobiol Dis*. 16(2), 311-20.
- 45 SINJOANU RC, KLEINSCHMIDT S, BITNER RS, BRIONI JD, MOELLER A, FERREIRA A. (2008). The novel calpain inhibitor A-705253 potently inhibits oligomeric beta-amyloid-induced dynamin 1 and tau cleavage in hippocampal neurons. *Neurochem Int*. 53(3-4):79-88.
- URYU K, CHEN XH, MARTINEZ D, BROWNE KD, JOHNSON VE, GRAHAM DI, LEE VM, TROJANOWSKI JQ, SMITH DH. (2007) Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Exp Neurol*. 208, 185-92.
- 50 VAN DEN HEUVEL C, THORNTON E, VINK R. (2007) Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Prog Brain Res*. 161:303-16.
- WANG, K.K.W. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci*. 23, 20-26.

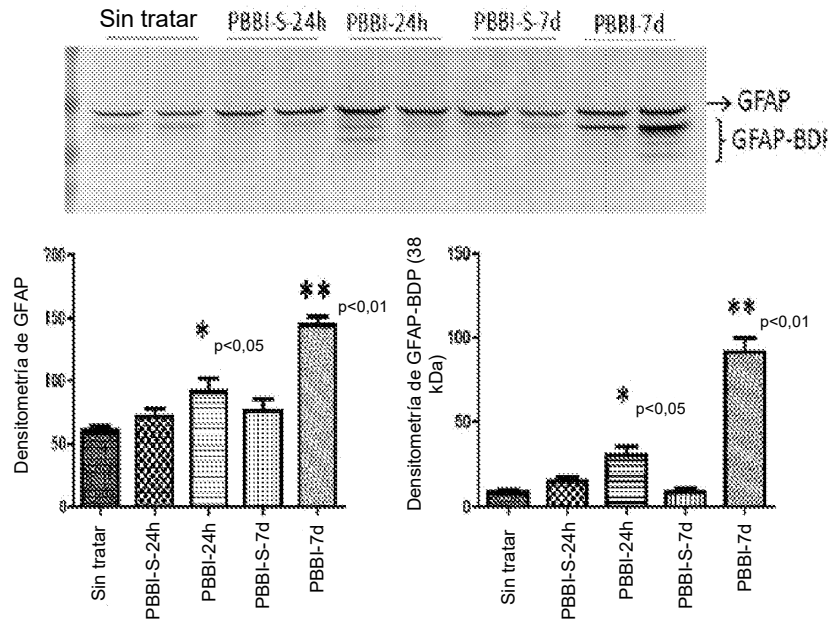
- WARREN, M.W., KOBEISSY, F.H., HAYES, R.L., GOLD, M.S., WANG, K.K.W. (2005) Concurrent calpain and caspase-3 mediated proteolysis of all-spectrin and tau in rat brain after methamphetamine exposure: A similar profile to traumatic brain injury. *Life Sciences* 78: 301-309.
- 5 WARREN, MW. ZHENG, W.R., KOBEISSY, F., LIU, M.C., HAYES, R.L., GOLD, MARK, M.C. LIU, y WANG, K.K.W. (2006) Calpain and caspase mediated proteolysis of all-spectrin and tau in rat cerebrocortical neuron cultures after ecstasy (MDMA) or methamphetamine exposure *Int. J. Neuropsychopharm.* 9, 1-11.
- YANG L.S., y KSIEZAK-REDING, H. (1995). Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *J. Biochem.* 233, 9-17.
- 10 YEN, S., EASSON, C., NACHARAJU, P., HUTTON, M., y YEN, S.H. (1999). FTDP-17 tau mutations decrease the susceptibility of tau to calpain I digestion. *FEBS Lett.* 461, 91-95.
- YOSHIYAMA Y, URYU K, HIGUCHI M, LONGHI L, HOOVER R, FUJIMOTO S, MCINTOSH T, LEE VM, TROJANOWSKI JQ. (2005) Enhanced neurofibrillary tangle formation, cerebral atrophy, and cognitive deficits induced by repetitive mild brain injury in a transgenic tauopathy mouse model. *J Neurotrauma.* 22, 134-1141.
- 15 ZEMLAN, F.P., JAUCH, E.C., MULCHAHEY, J.J., GABBITA, S.P., y ROSENBERG, W.S. Speciale SG, and Zuccarello M. (2002). C-tau biomarker of neuronal damage in severe brain injured patients: association with elevated intracranial pressure and clinical outcome. *Brain Res.* 23,131-139.
- ZEMLAN, F.P., MULCHAHEY, J.J., y GUDELSKY, G.A. (2003). Quantification and localization of kainic acid-induced neurotoxicity employing a new biomarker of cell death: cleaved microtubule-associated protein-tau (C-tau). *Neuroscience* 121, 399-409.
- 20 ZHANG JY, PENG C, SHI H, WANG S, WANG Q, WANG JZ. (2009) Inhibition of autophagy causes tau proteolysis by activating calpain in rat brain. *J Alzheimers Dis.* 16, 39-47.
- ZHANG Z, LARNER S, LIU MC, ZHENG W, HAYES RL, WANG KKW. (2009) Multiple all-spectrin Breakdown Products Distinguish Calpain and Caspase Dominated Necrotic and Apoptotic Cell Death Pathways. *Apoptosis*, 14, 1289-1298.
- 25



**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para detectar un daño celular neuronal de un sujeto comprendiendo:  
medir una cantidad de al menos un biomarcador específico de neurona en una muestra biológica recogida del sujeto, donde la síntesis de dicho biomarcador se altera tras el daño celular neuronal en el sujeto; y  
5 detectar un daño celular neuronal en función de la cantidad de dicho al menos un biomarcador en tal muestra biológica,  
donde dicho biomarcador es un autoanticuerpo dirigido a GFAP o productos de degradación de esta;  
donde dicho daño celular neuronal es provocado por traumatismo craneoencefálico (TCE).
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1 donde tal proceso comprende además detección de un biomarcador adicional, donde tal biomarcador adicional es un autoanticuerpo dirigido a Tau; S100β; βIII-tubulina; polipéptido ligero, medio o pesado de neurofilamento (NF-L, -M y -H); protón ATPasa de tipo V; Gamma-enolasa (NSE); vimentina; endofilina-AI; proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2); alfa-internexina; neuroserpina; neuromodulina; sinaptotagmina-1; canal de potasio regulado por voltaje; proteínas mediadoras de respuesta a la colapsina (CRMP-1 a 5); αII-espectrina; neurofascina; PBM; esterasa ubiquitina carboxi-terminal; Poli (ADP-  
15 ribosa) polimerasa (PARP); productos de degradación de estos; derivados de los mismos; o combinaciones de estos.
3. Proceso según la reivindicación 1, donde dicho biomarcador es un autoanticuerpo dirigido a productos de degradación de GFAP (GBDP), donde tal GBDP se forma mediante escisión en Asn59, Thr383, o ambas, en la SEQ ID N.º 114.
- 20 4. Proceso según la reivindicación 1, donde dicha cantidad es la proporción de la concentración de tal biomarcador tras dicha lesión con respecto a la concentración de tal biomarcador en un sujeto control.
5. Proceso según la reivindicación 1, donde dicha muestra biológica es sangre, suero, plasma, LCR, orina, saliva o tejido.

A



B

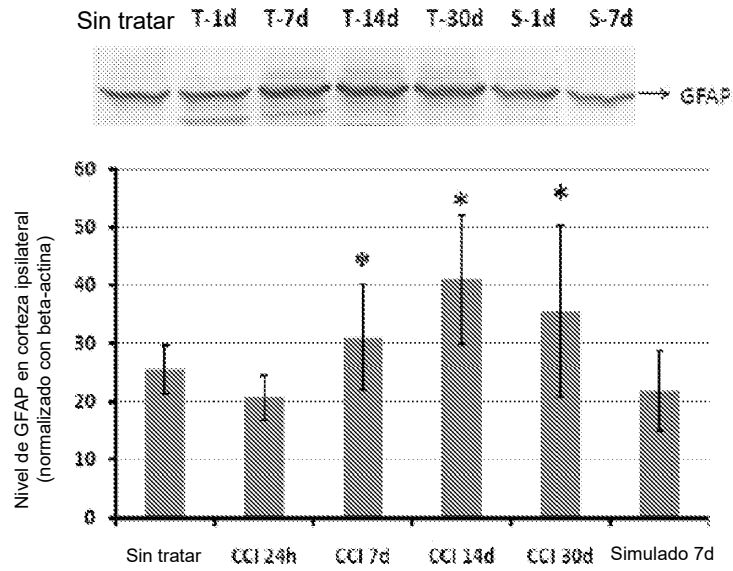


FIG. 1

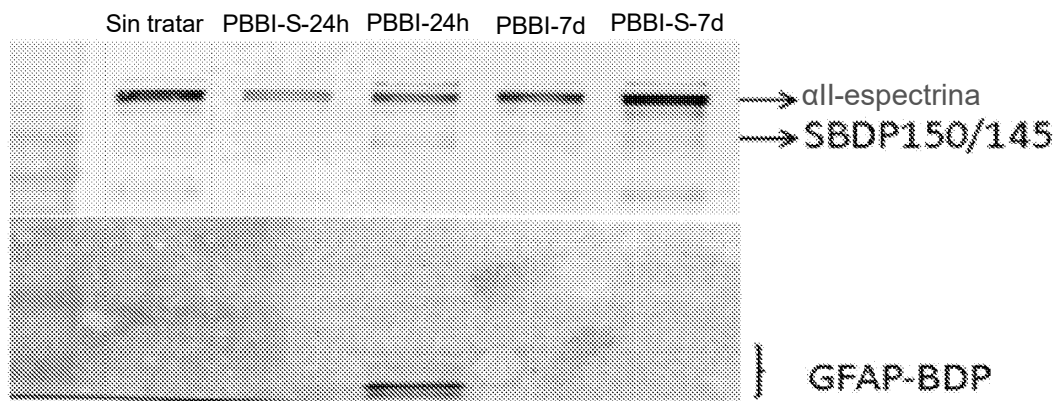


FIG. 2

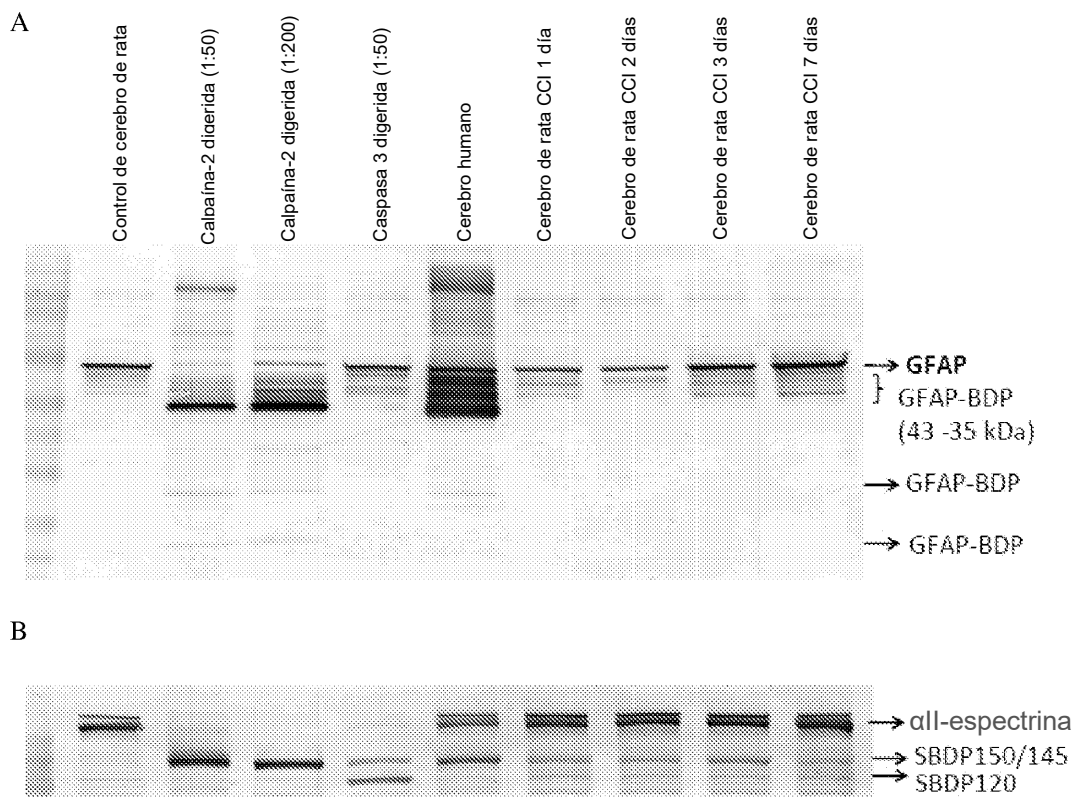


FIG. 3B

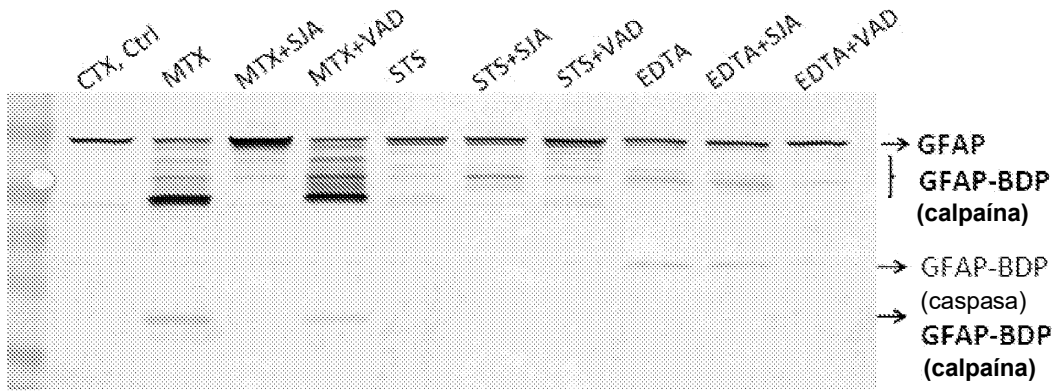


FIG. 4

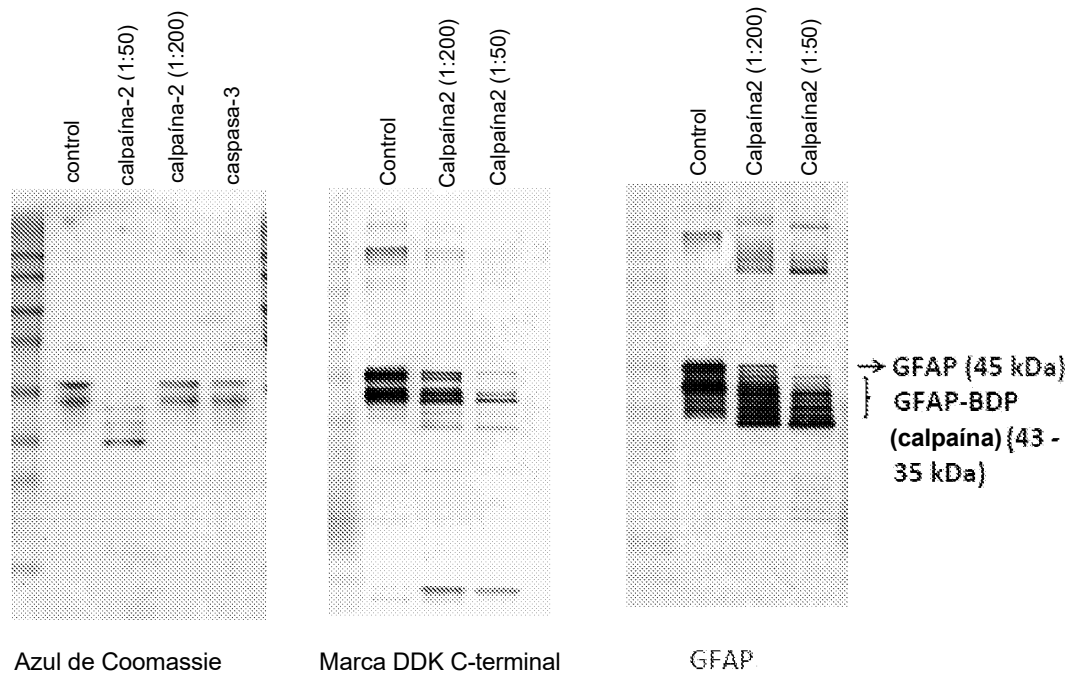


FIG. 5

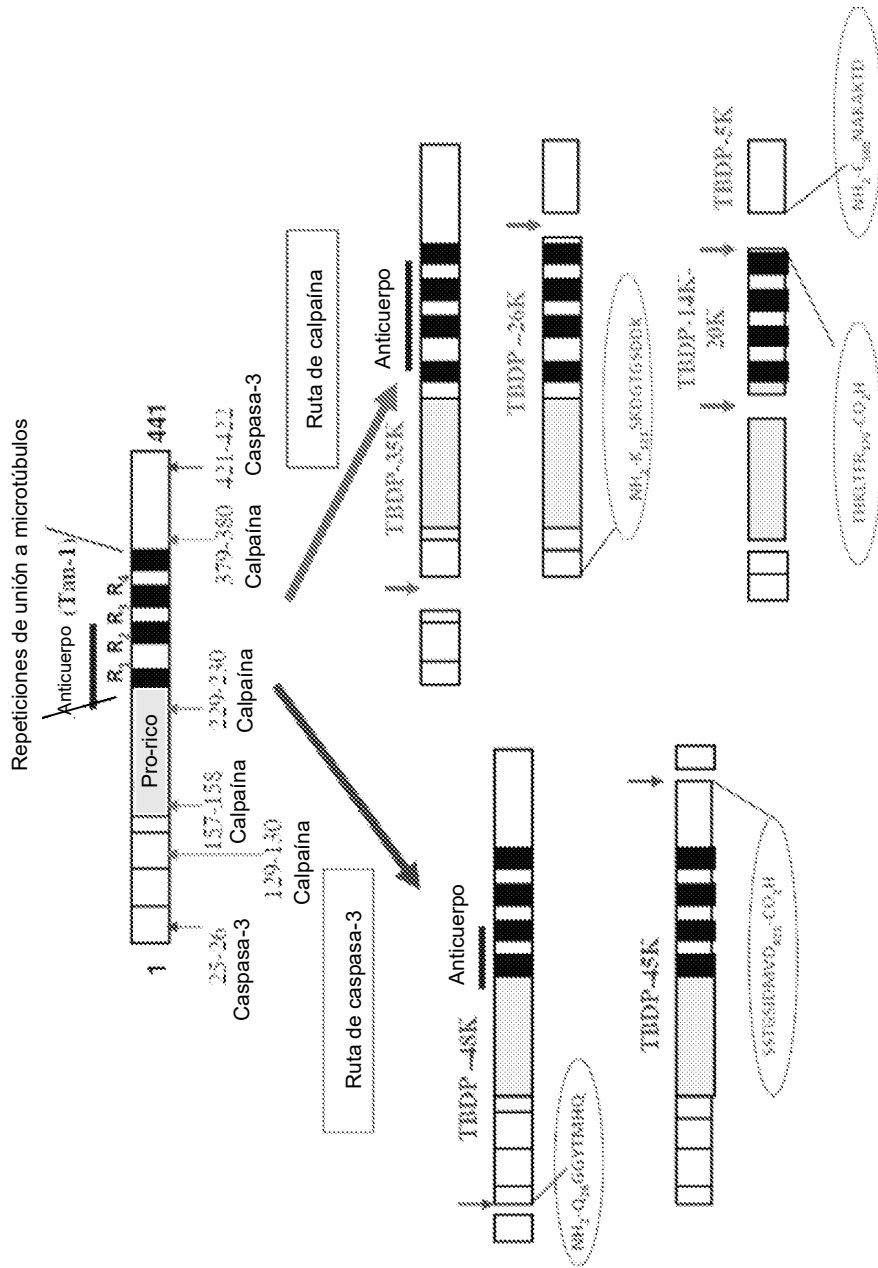


FIG. 6

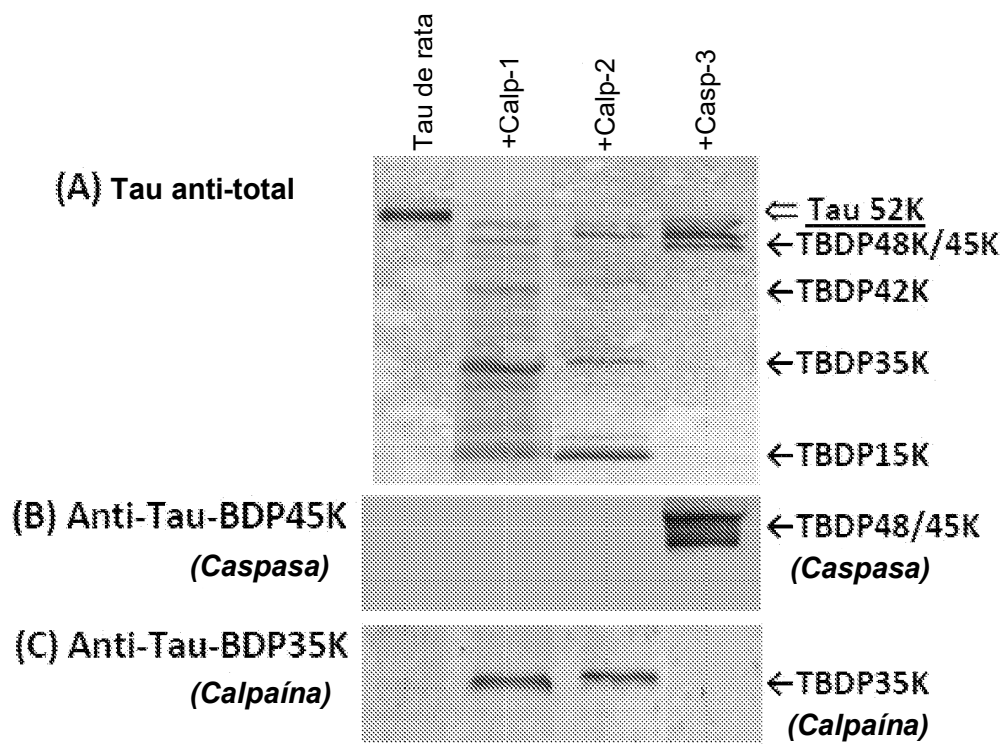
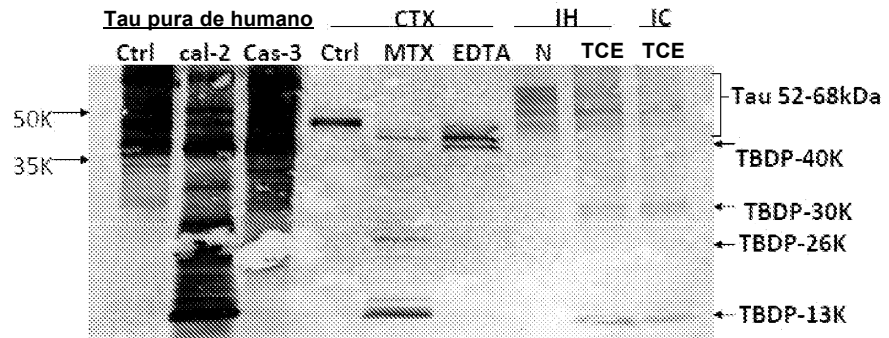
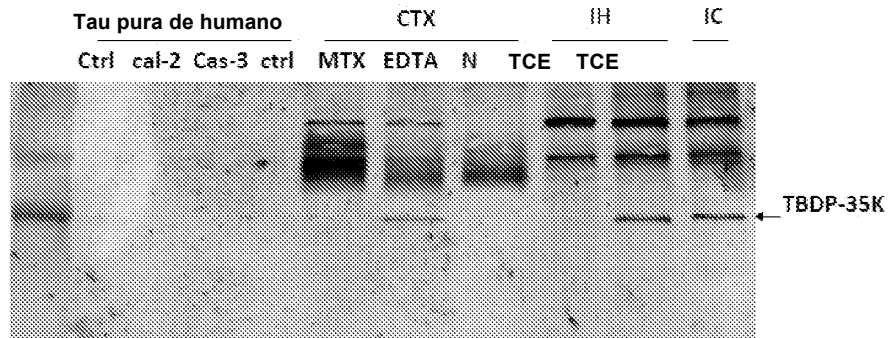


FIG. 7

A



B



C

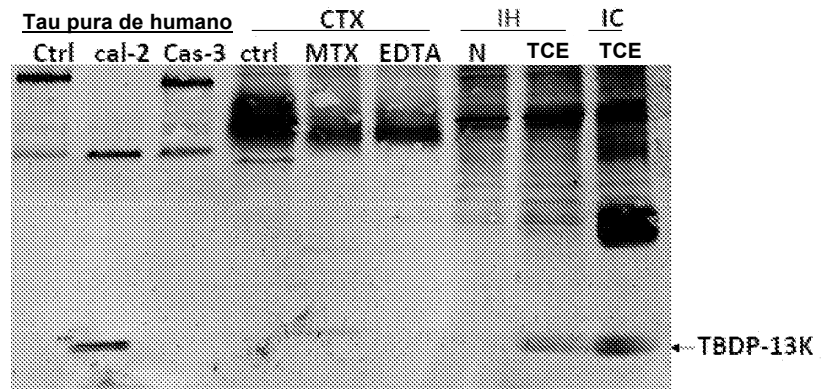


FIG. 8



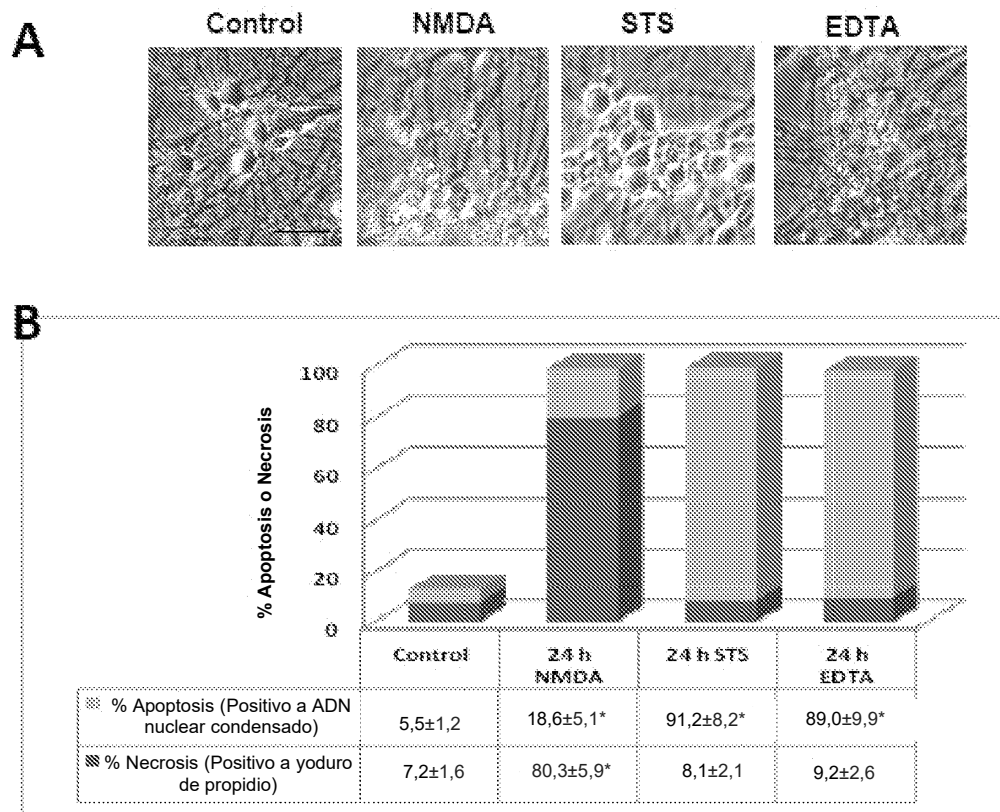


FIG. 9

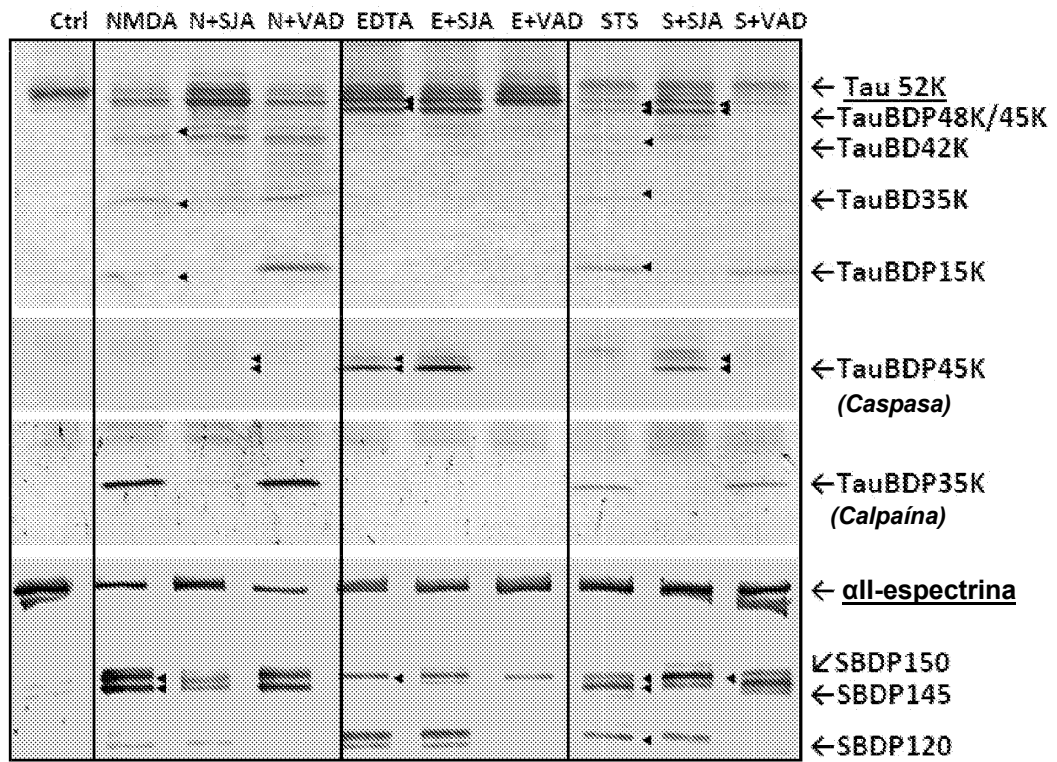


FIG. 10

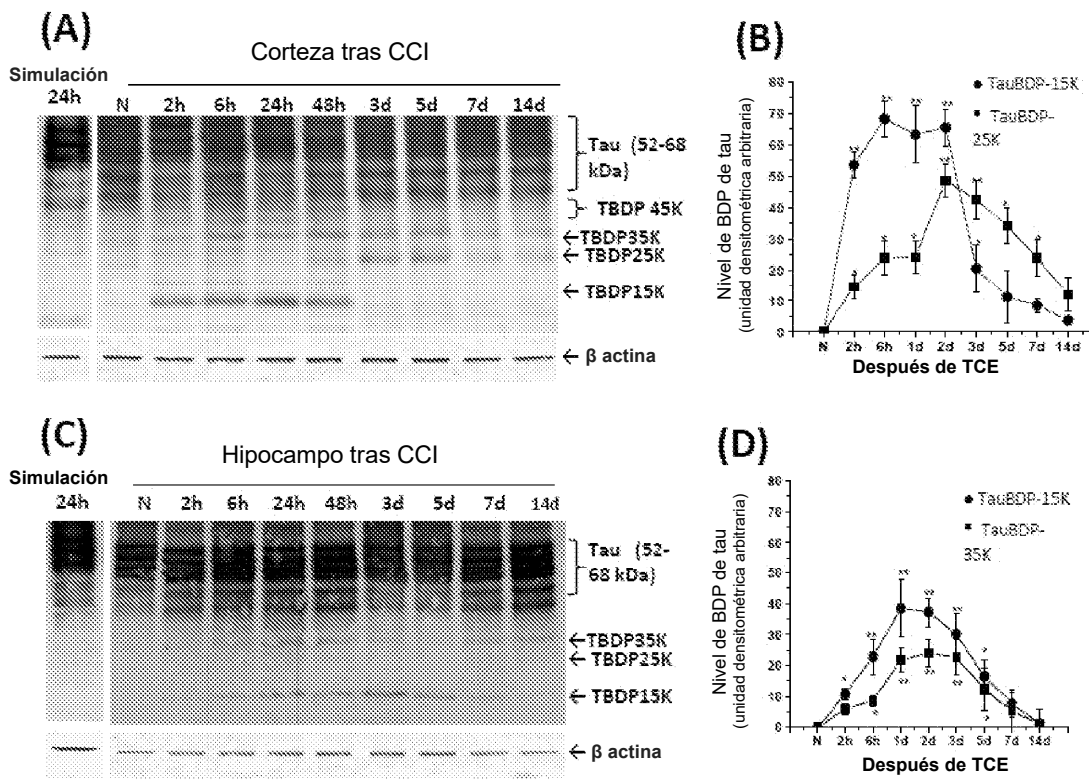


FIG. 11

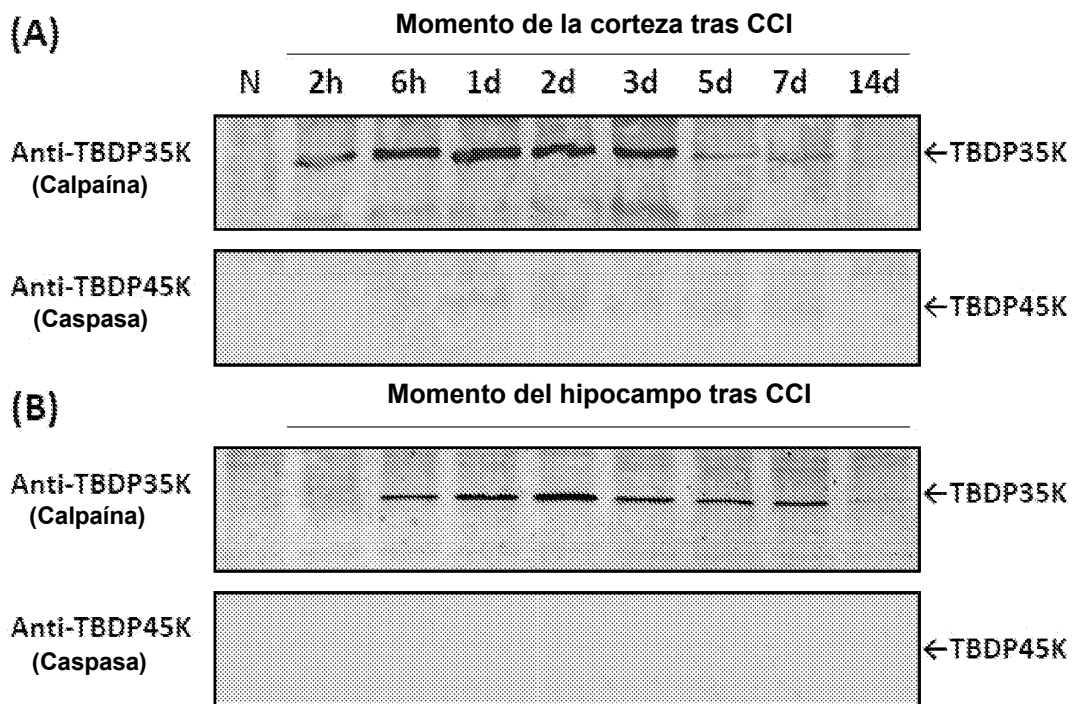


FIG. 12

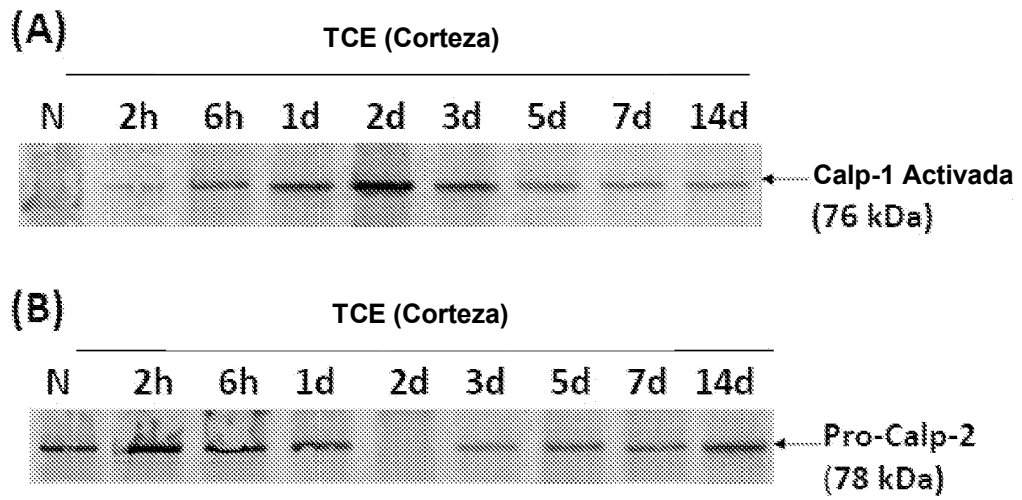


FIG. 13

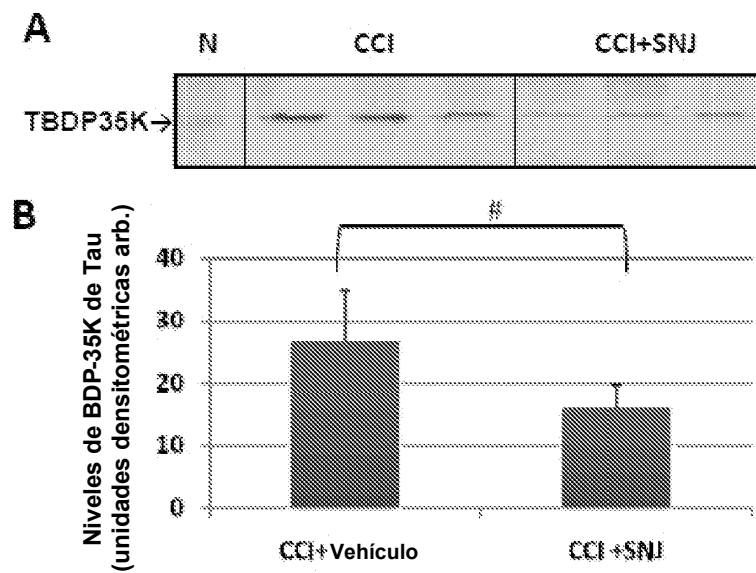


FIG. 14

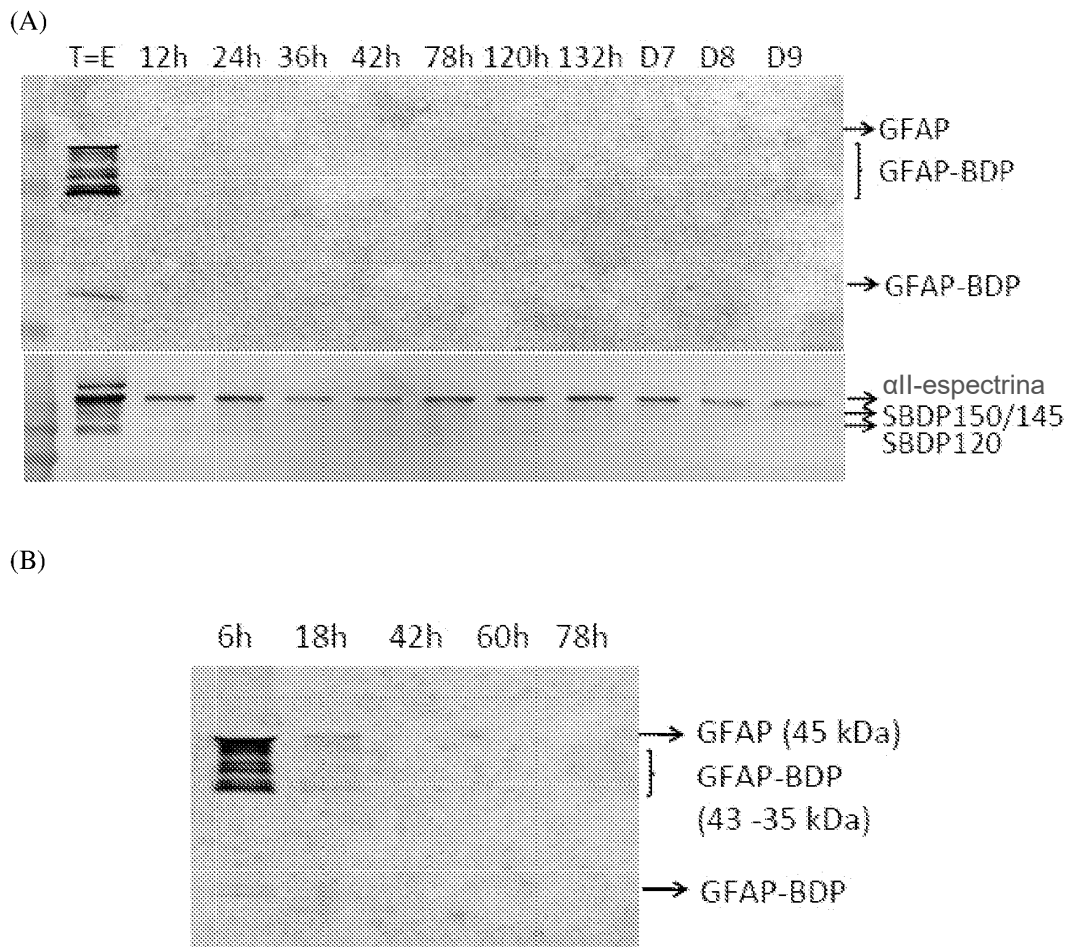


FIG. 15

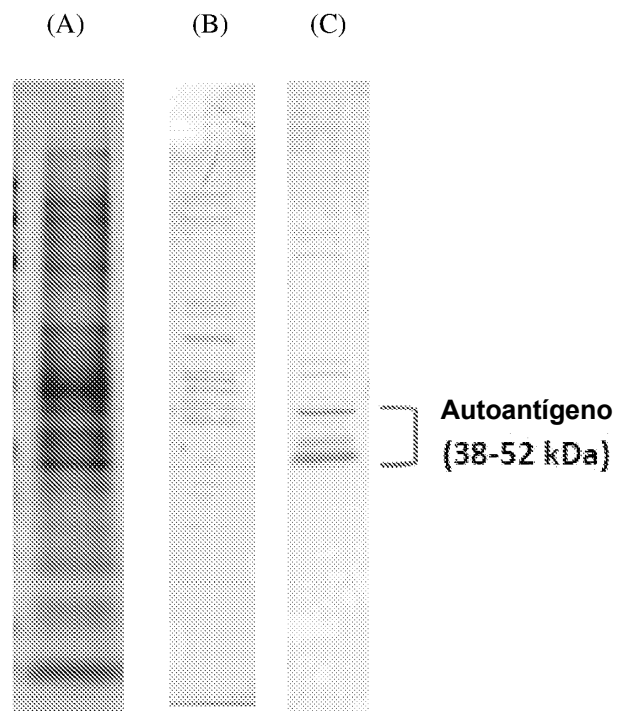


FIG. 16

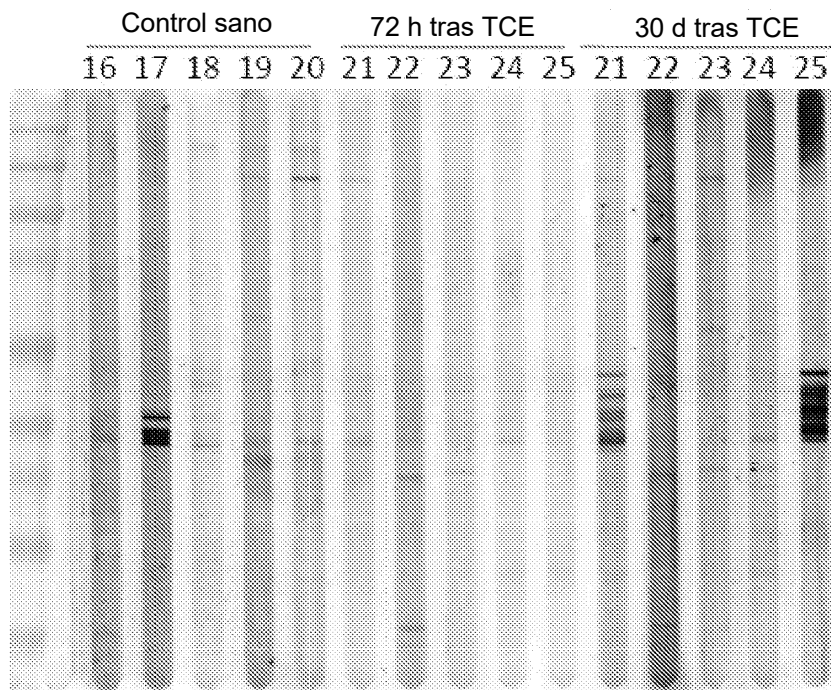
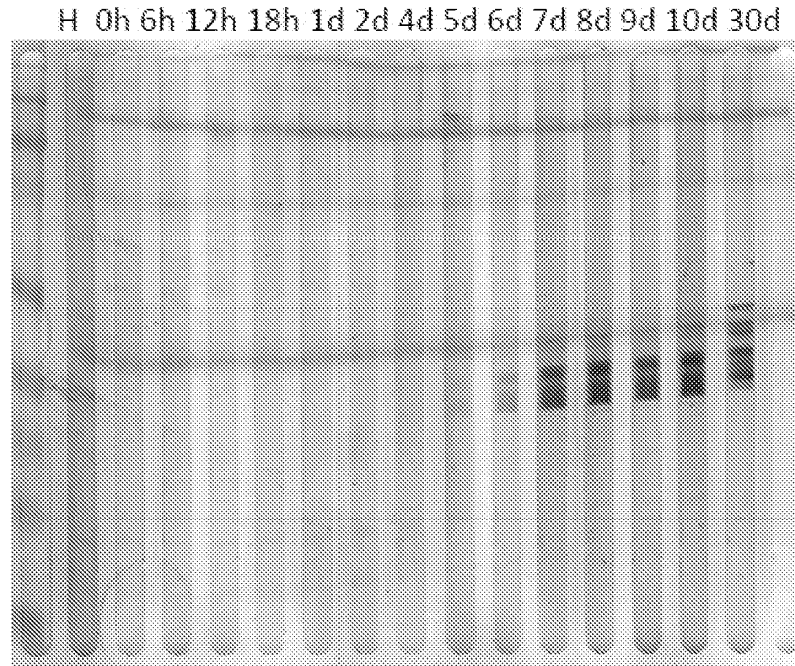


FIG. 17



(A)



(B)

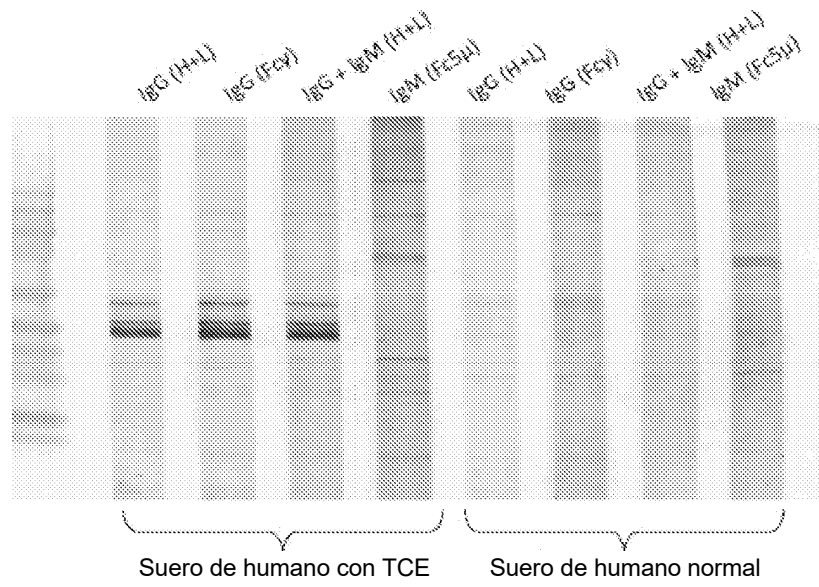


FIG. 18

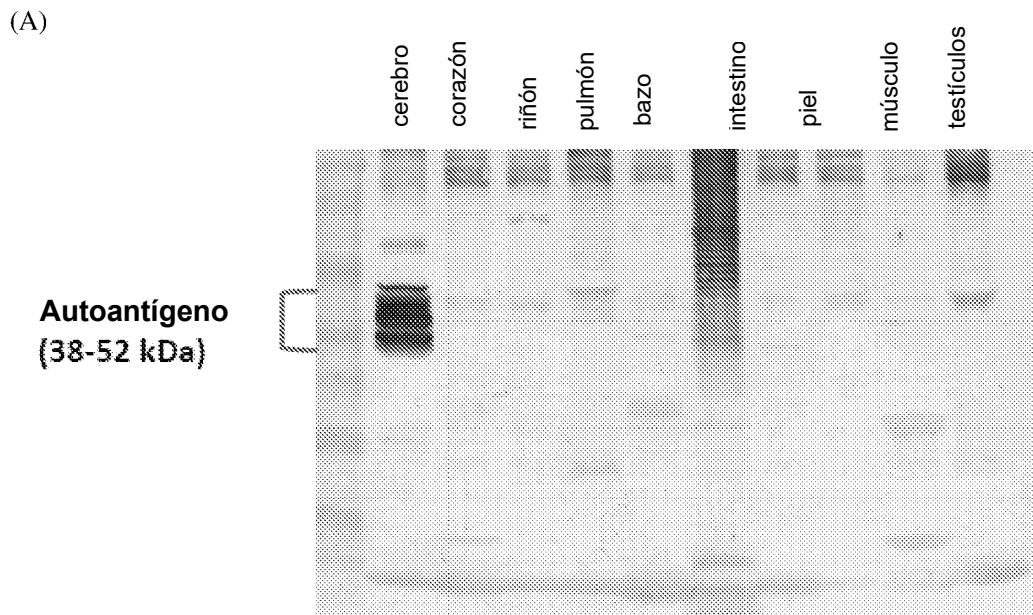


FIG. 19

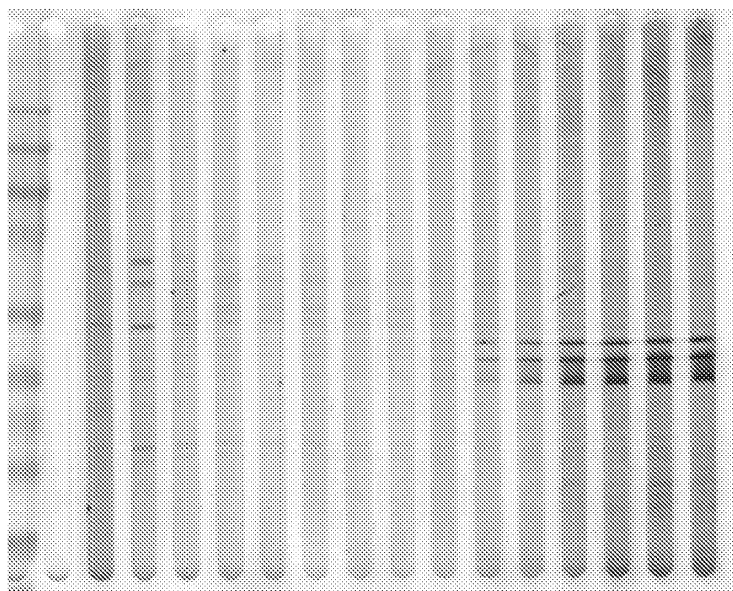


FIG. 20

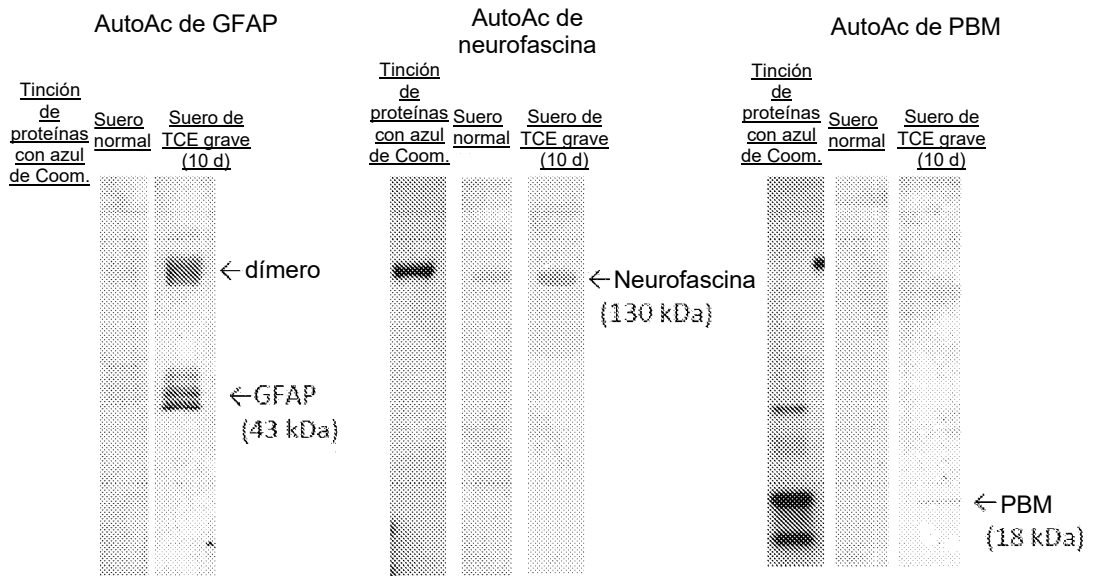
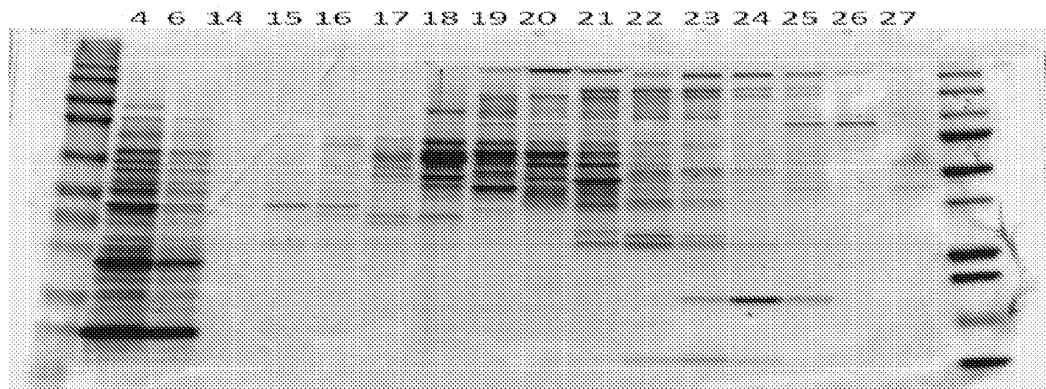


FIG. 21

(A)



(B)

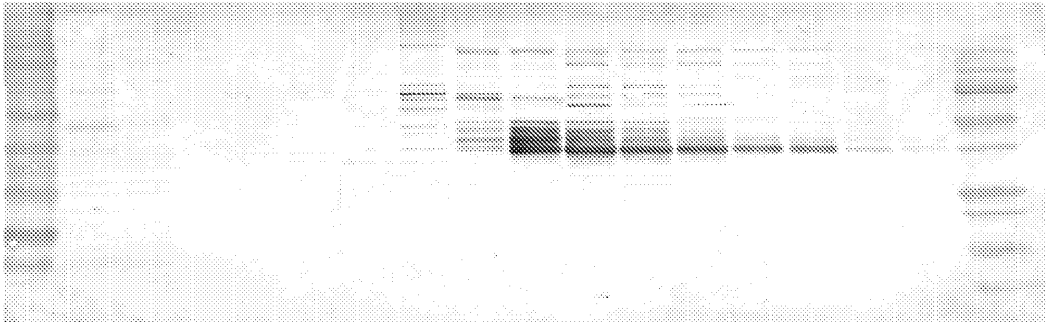
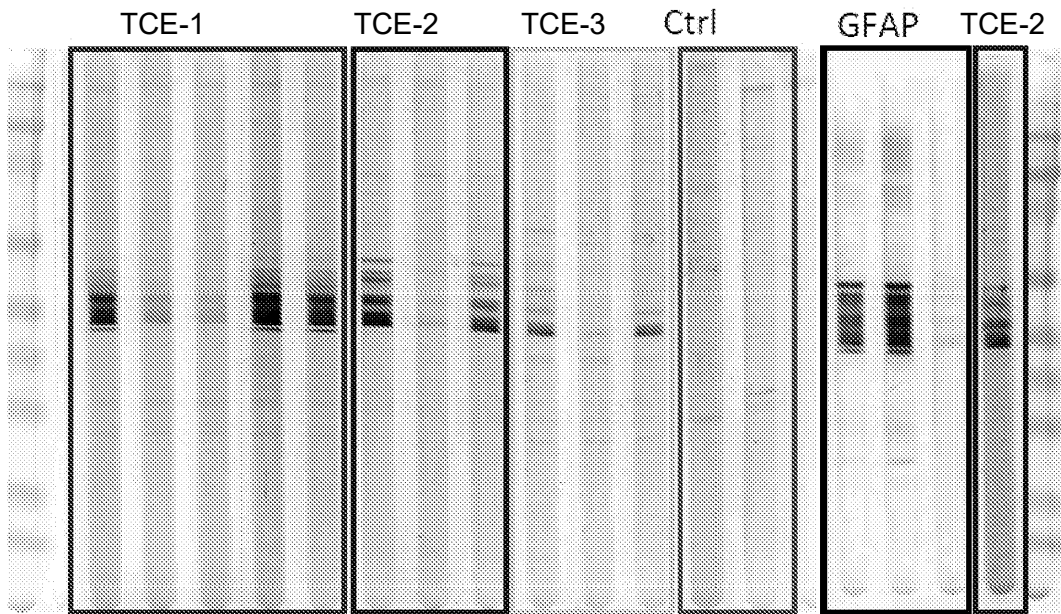


FIG. 22



N.º de carril	Detalles
1	Suero de TCE-1
2	Suero de TCE-1 con 2,6 ug de proteína GFAP humana purificada
3	Suero de TCE-1 con 10 ug de proteína GFAP
4	Suero de TCE-1 con 2,6 ug de Tau*
5	Suero de TCE-1 con 10 ug de Tau
6	Suero de TCE-2
7	Suero de TCE-2 con 10 ug de GFAP
8	Suero de TCE-2 con 10 ug de Tau
9	Suero de TCE-3
10	Suero de TCE-3 con 10 ug de GFAP
11	Suero de TCE-3 con 10 ug de Tau
12	Suero normal
13	Suero normal
14	Anti-GFAP* disolución: 1:10.000
15	Anti-GFAP disolución: 1:5.000
16	Anti-GFAP disolución: 1:5.000 + 10 ug de proteína GFAP*
17	Suero de TCE-2 solo

FIG. 23

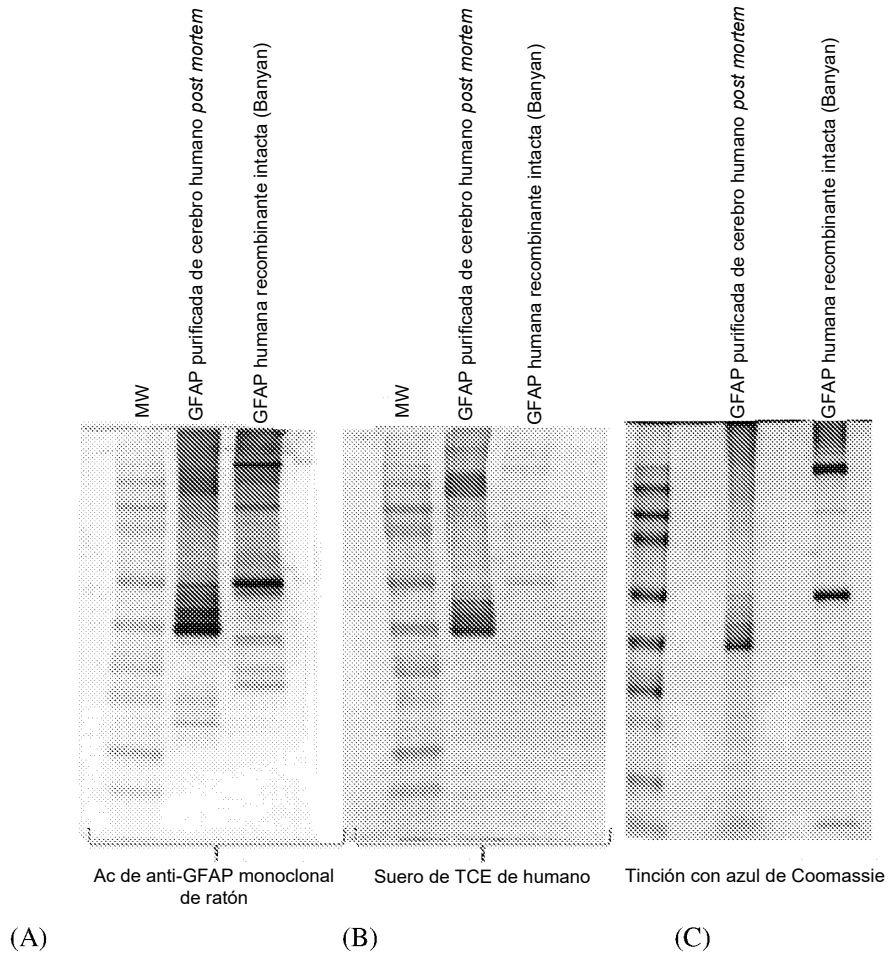


FIG. 24

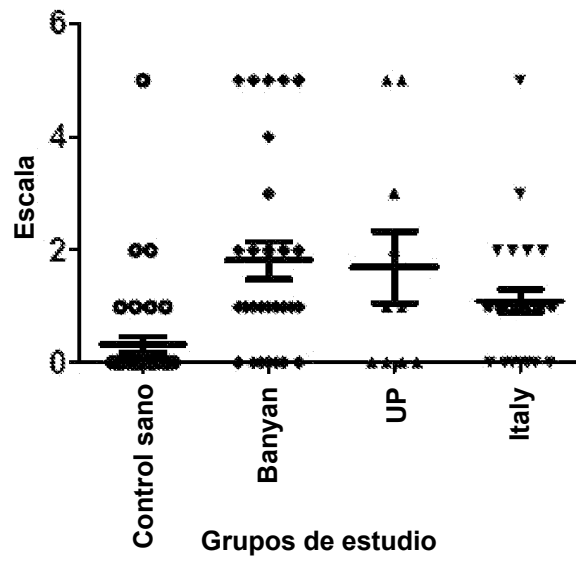
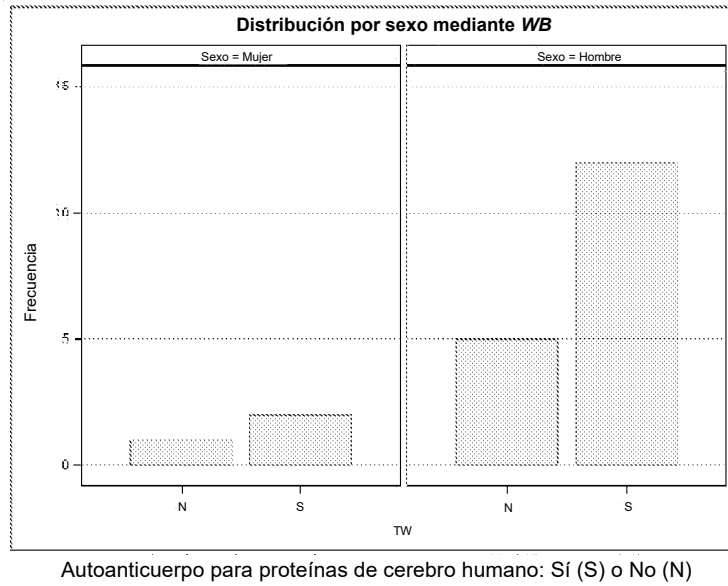


FIG. 25



(A)



(B)

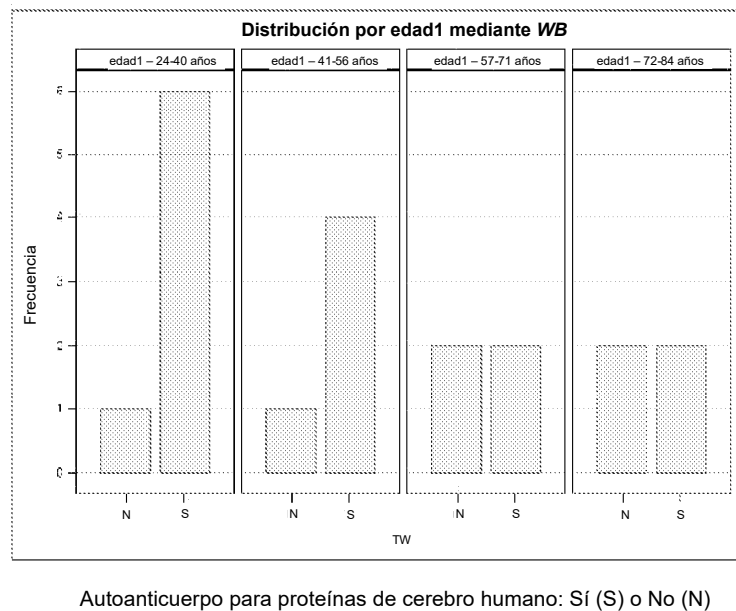
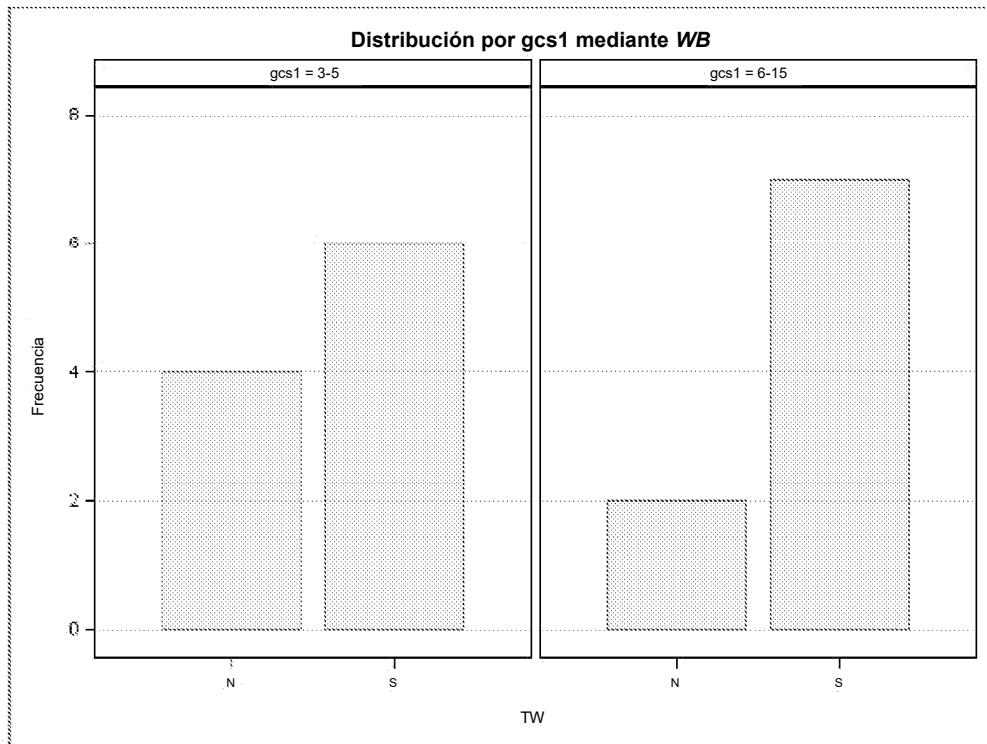
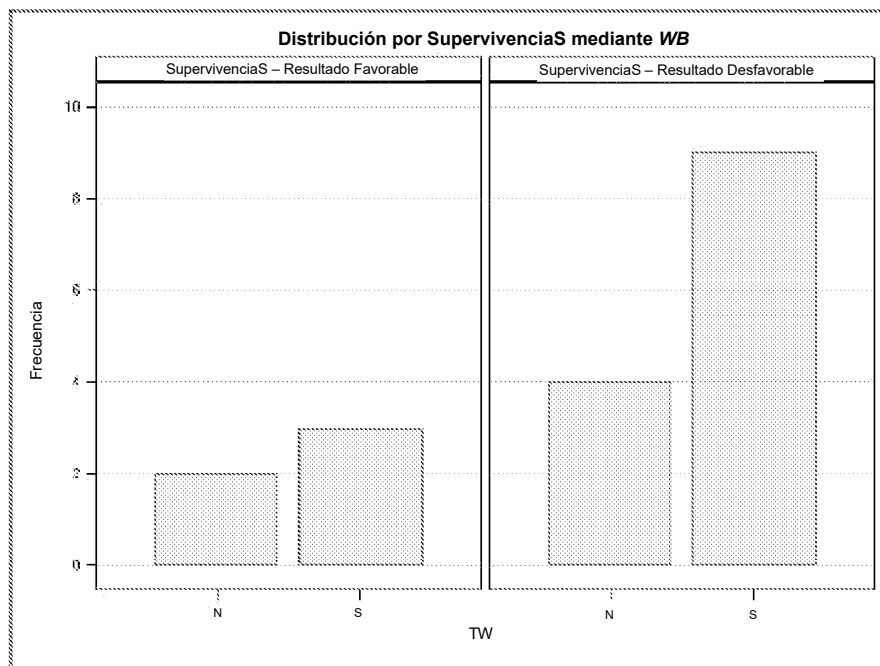


FIG. 26



Autoanticuerpo para proteínas de cerebro humano: Sí (S) o No (N)

FIG. 27



Autoanticuerpo para proteínas de cerebro humano: Sí (S) o No (N)

FIG. 28

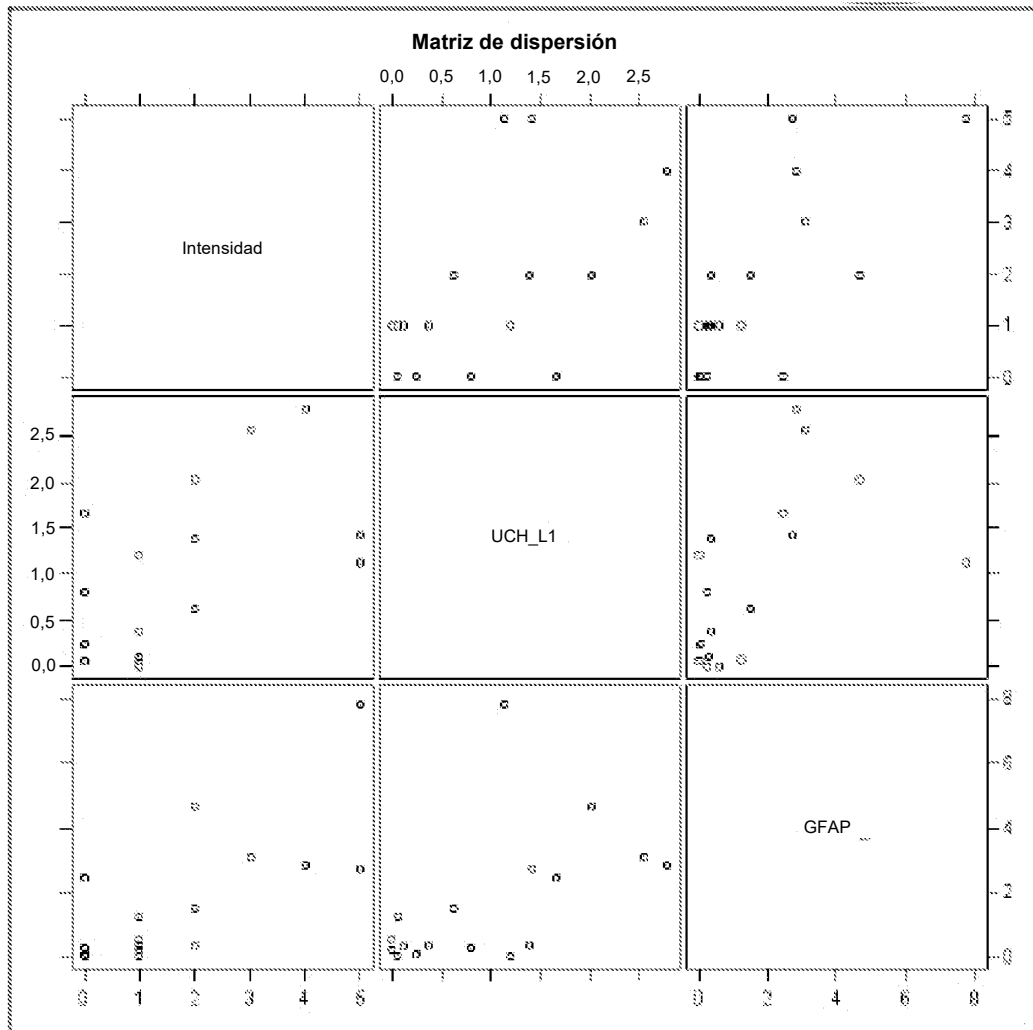


FIG. 29A

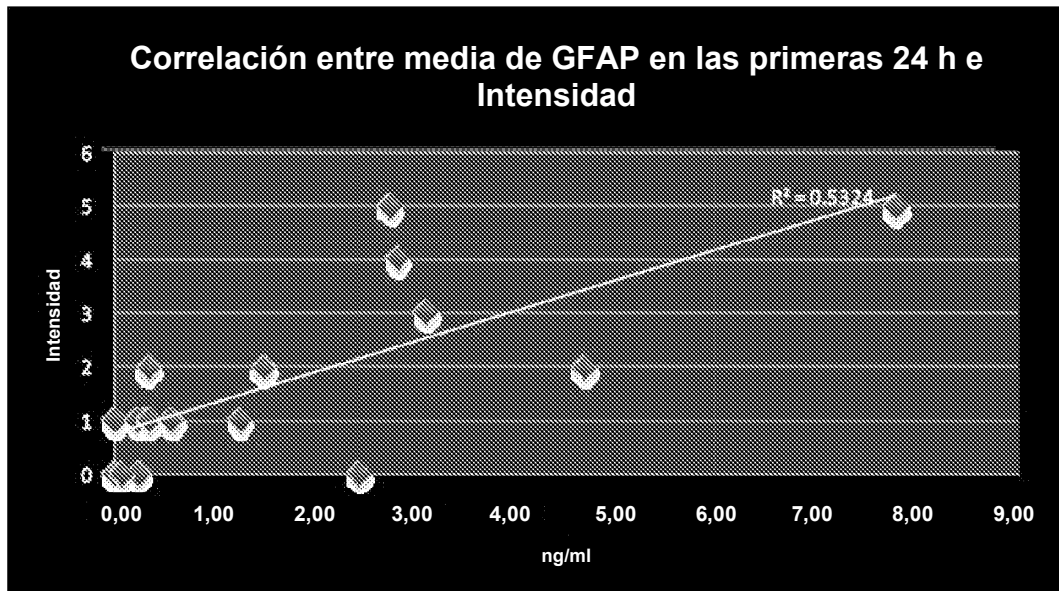


FIG. 29B

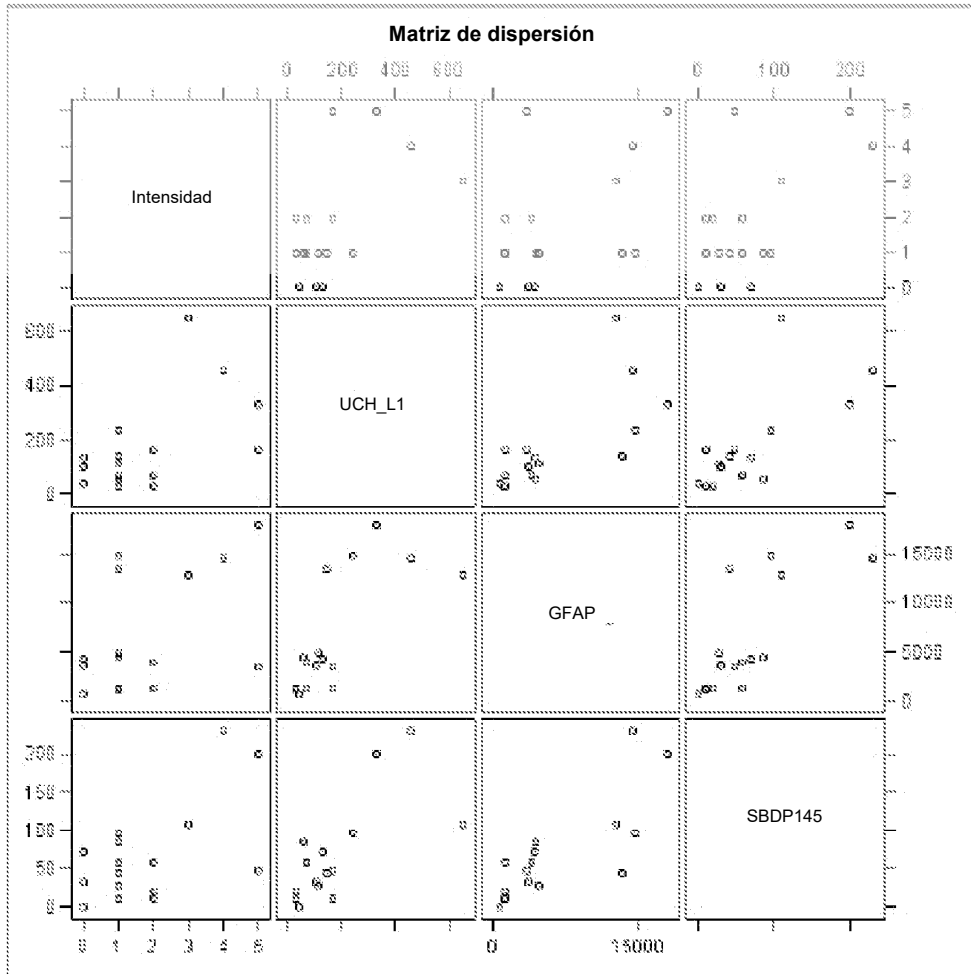
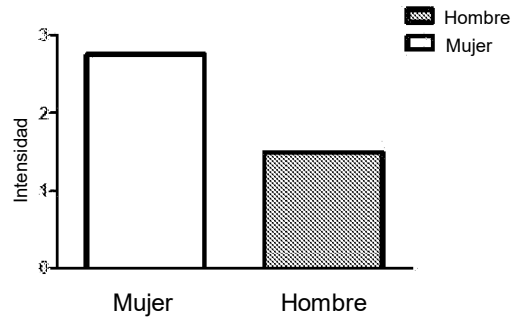
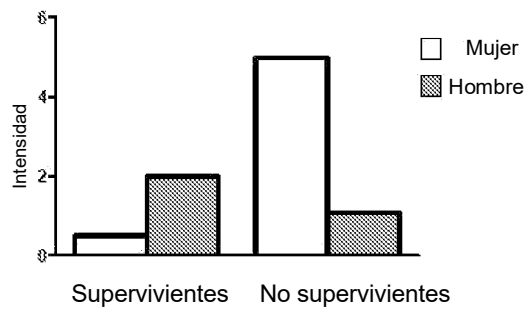


FIG. 30

(A)



(B)



(C)

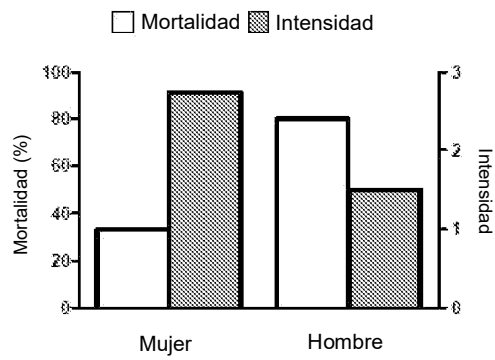
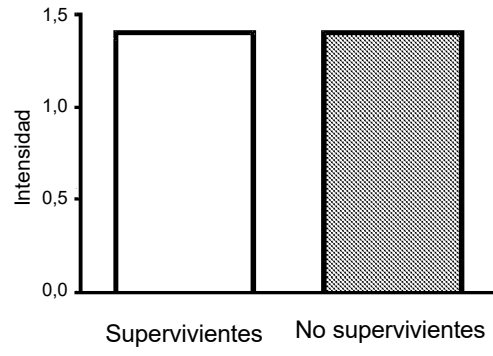
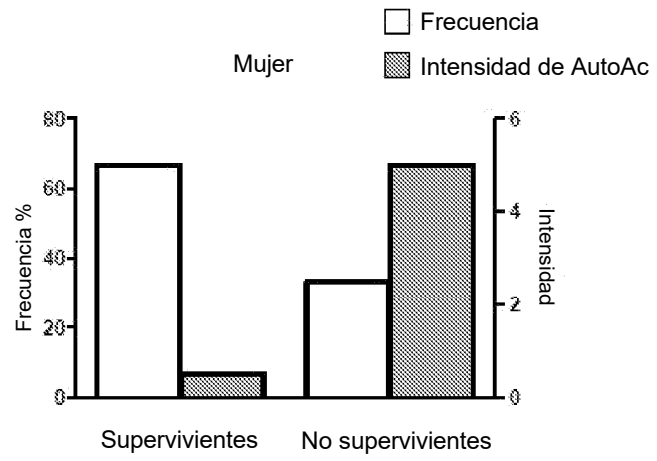


FIG. 31

(A)



(B)



(C)

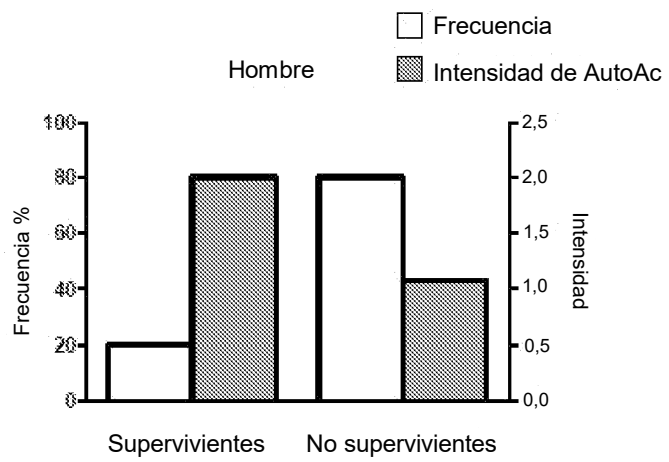


FIG. 32



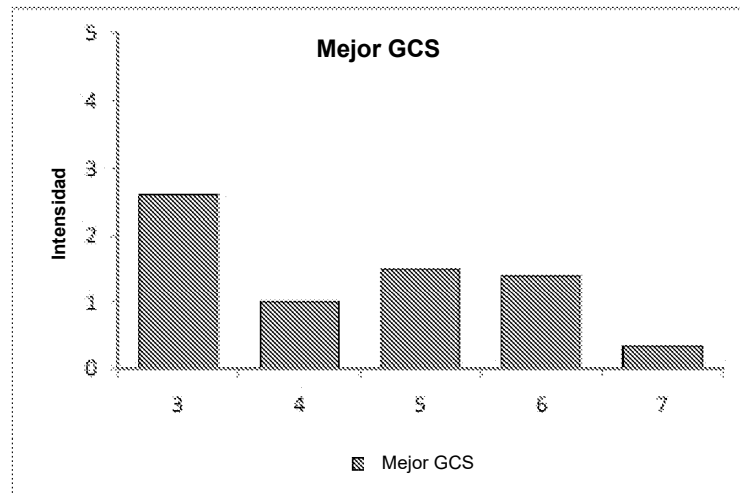


FIG. 33

ADN y ARN neuronal circulante como biomarcadores de lesiones cerebrales traumáticas e isquémicas

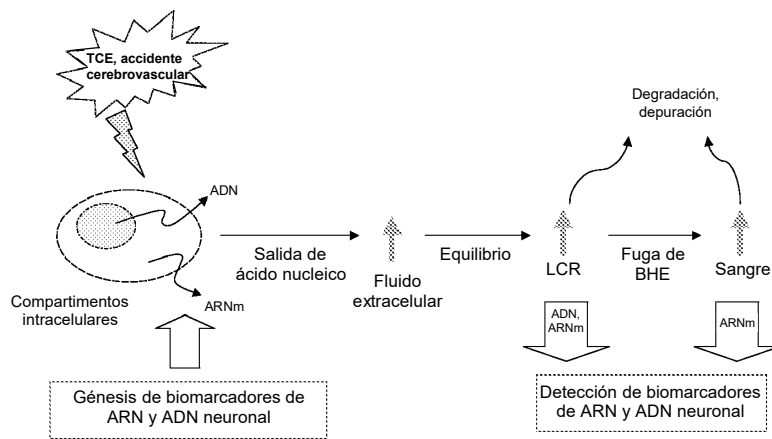


FIG. 34

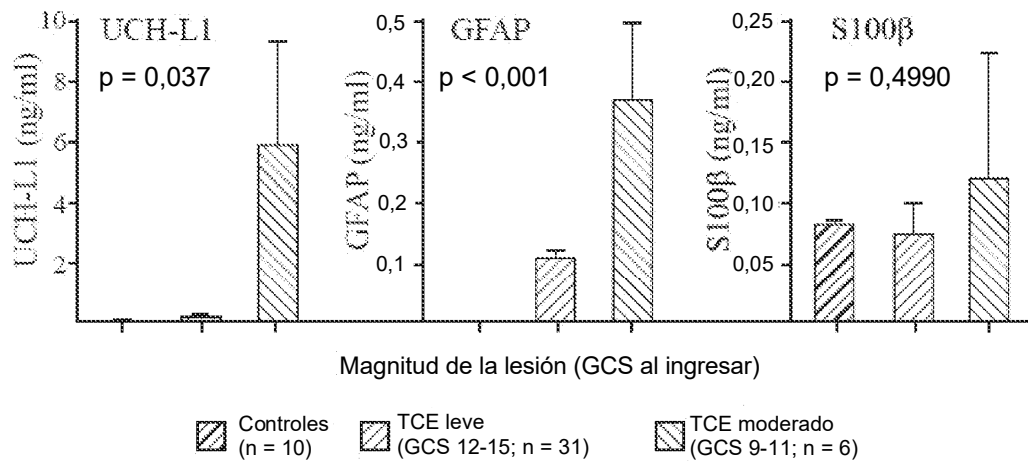


FIG. 35

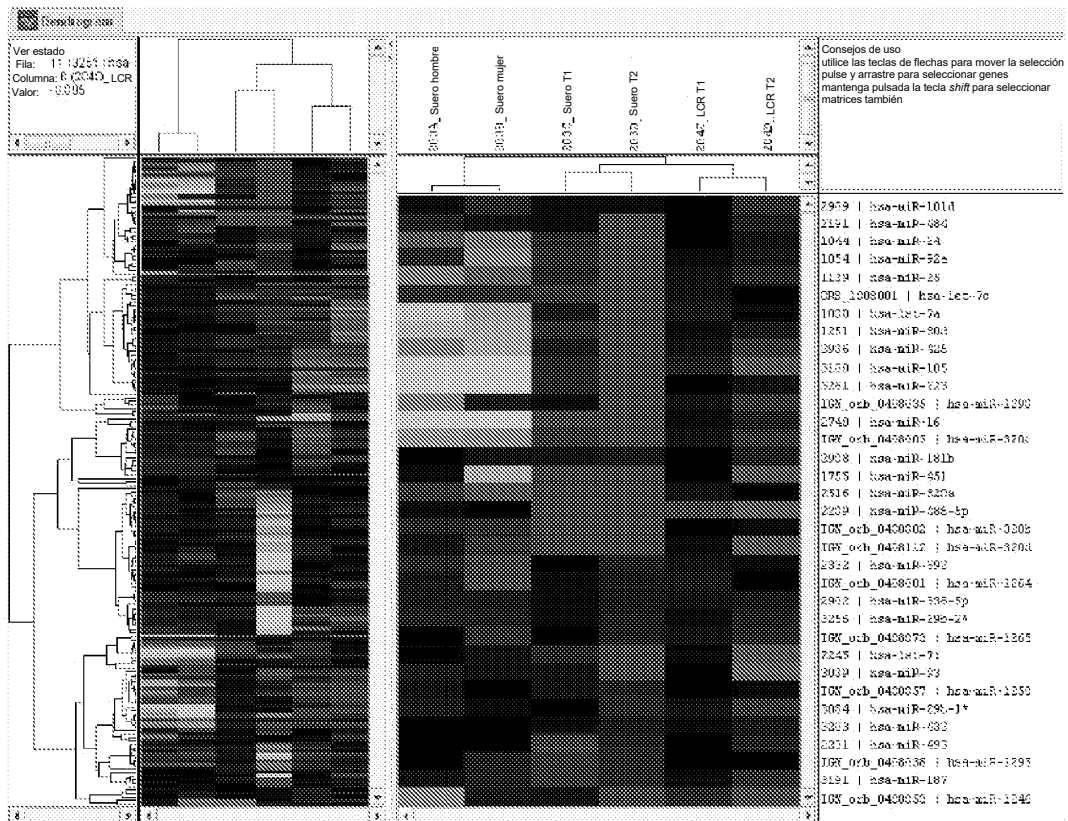


FIG. 36

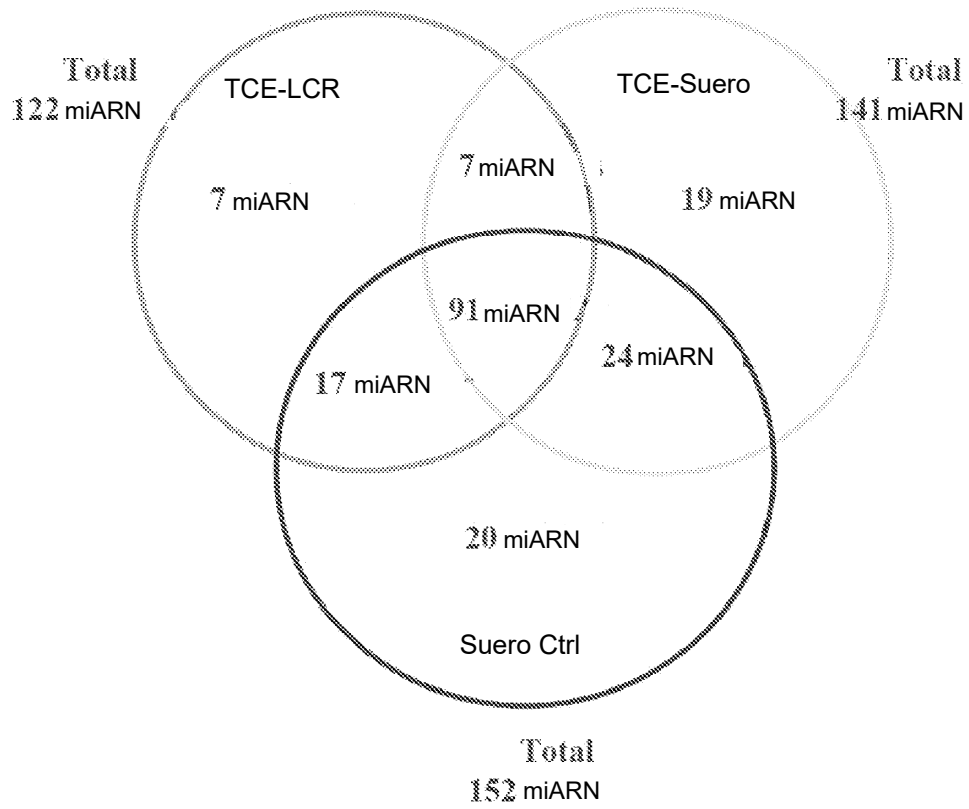


FIG. 37