

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 039**

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: **14.04.2016** **PCT/FI2016/050246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16166419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016** **E 16721191 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 3283880**

54 Título: **Biomarcadores de pronóstico y de diagnóstico de lesiones cerebrales basados en glicanos**

30 Prioridad:

15.04.2015 FI 20155280

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2020

73 Titular/es:

MEDICORTEX FINLAND OY (100.0%)

Itäinen Pitkätatu 4 B 4

20520 Turku, FI

72 Inventor/es:

HAREL, ADRIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 800 039 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

Biomarcadores de pronóstico y de diagnóstico de lesiones cerebrales basados en glicanos

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a biomarcadores basados en glicanos para el diagnóstico y el pronóstico de lesiones cerebrales, tales como la lesión cerebral traumática ("traumatic brain injury", TBI), la lesión cerebral subclínica ("subclinical brain injury", SCI) y la lesión cerebral adquirida ("acquired brain injury", ABI). El protocolo de biomarcadores basados en glicanos también puede usarse como criterio de valoración en ensayos clínicos. De modo más específico, los biomarcadores de la presente descripción pueden usarse en ensayos de diagnóstico para determinar, calificar y/o evaluar el estado de una lesión cerebral, por ejemplo, para diagnosticar lesiones cerebrales en un individuo, sujeto o paciente. En ejemplos particulares, el estado de una lesión cerebral puede incluir determinar el estado de una lesión cerebral subclínica de un sujeto o estado SCI ("subclinical injury"), para diagnosticar una SCI en un individuo, sujeto o paciente (consciente o no).

Antecedentes de la invención

Las lesiones cerebrales son complejas y pueden tener múltiples resultados clínicos graves. La lesión cerebral traumática (TBI) es la principal causa de alteración del sistema nervioso central en la actualidad. Más de 1,7 millones de individuos sufren TBI al año solo en EE. UU. Según CDC, la mayor incidencia de TBI se produce entre niños de 0-4 años, adolescentes de 15-19 años y adultos mayores de 65 años. A pesar de la amplia gama de población afectada, la TBI permanece desatendida y sigue siendo un trastorno patológico no explorado.

Cada año, 35.000 personas en Finlandia padecen una TBI, de las cuales 1150 mueren y 10.000 se quedan con una alteración permanente. Los costes anuales de la TBI son de dos mil millones de euros. Los cálculos anuales a nivel europeo son de 2,5 millones de nuevos casos, 75.000 muertes y 400.000 alteraciones permanentes. La TBI provoca más muertes en el grupo de edad de < 35 años que todas las enfermedades juntas, pero afecta a todos los grupos de edad. Esto implica que, a nivel mundial, se producen más de 16,5 millones de TBI graves al año.

Tradicionalmente, la TBI se ha diagnosticado de modo agudo y se clasifica mediante exámenes neurológicos, tales como la escala de coma de Glasgow ("Glasgow Coma Scale", GCS). Sin embargo, el uso de la GCS como herramienta de diagnóstico está sujeto a una serie de limitaciones importantes. Investigaciones recientes han proporcionado pruebas de que el uso de fármacos sedantes evita una evaluación precisa con GCS durante las primeras 24 h. Otro problema para el diagnóstico es la naturaleza evolutiva de algunas lesiones cerebrales, que puede conducir a una mayor alteración neurológica. Además, las respuestas neurológicas después de una TBI pueden variar a lo largo del tiempo por razones no relacionadas con la lesión. Otros problemas incluyen la posible pérdida del conocimiento o incapacidad para comunicarse del sujeto lesionado.

Se emplean técnicas de formación de neuroimágenes, tales como rayos X, barrido de CT y MRI, para proporcionar información acerca de la magnitud y la localización de la lesión, y estas no se ven influidas por las desventajas mencionadas anteriormente. Sin embargo, el barrido de CT tiene una baja sensibilidad para lesiones cerebrales difusas, y la disponibilidad y la utilidad de MRI son limitadas. La MRI además es inaplicable si los sujetos son fisiológicamente inestables, y puede conducir a diagnósticos erróneos en lesiones militares en las que es frecuente la presencia de fragmentos metálicos.

Además, la TBI leve y moderada representa más del 90% de las lesiones TBI; esta amplitud de las lesiones representa el mayor problema para realizar un diagnóstico agudo preciso y una predicción del resultado. A diferencia de la TBI grave, no existe una escala de evaluación neurológica universalmente reconocida, tal como la GCS, y muchos casos de TBI leve se clasifican como lesión cerebral subclínica (SCI). El extendido reconocimiento de estrategias inadecuadas para diagnosticar la TBI leve sugiere la necesidad de una mejora significativa en el diagnóstico y la clasificación de la TBI, tal como el uso de biomarcadores para complementar las evaluaciones funcionales y basadas en imágenes. Estos biomarcadores pueden ser una expresión génica alterada, metabolitos de proteínas o lípidos, o una combinación de estos cambios después de una lesión cerebral traumática, que reflejan el ataque inicial (la lesión primaria) y la evolución de una cascada de daños secundarios (la lesión secundaria). En particular, el estado de una lesión cerebral subclínica o SCI podría diagnosticarse con un análisis de biomarcadores.

Al igual que con muchas lesiones, se ha advertido un aumento en los niveles en suero de citoquinas y quimioquinas después de una TBI y, así, se han propuesto como marcadores sustitutos potenciales para el resultado de una TBI. Sin embargo, hasta la fecha no existen biomarcadores aprobados para el diagnóstico o el pronóstico de la TBI. Esto es debido a varios obstáculos al desarrollo de biomarcadores en sangre fiables de la TBI. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica ("blood-brain barrier", BBB) impide la evaluación de cambios bioquímicos en el cerebro mediante el uso de biomarcadores en sangre en la TBI leve, aunque un deterioro de la integridad de la BBB, tal como se observa en la TBI grave, puede aumentar los niveles de proteínas derivadas del cerebro en la sangre. No obstante, debido a su dilución en un volumen de plasma mucho mayor, los biomarcadores que son altamente expresados dentro del sistema nervioso central aparecen a concentraciones muy bajas en la sangre. Además, algunos biomarcadores potenciales sufren una degradación proteolítica en la sangre, y sus niveles pueden verse

afectados por su eliminación de la sangre a través del hígado o del riñón. Como consecuencia, ha resultado extremadamente difícil identificar biomarcadores en sangre fiables. El documento WO2015/009907 describe un ensayo de biomarcadores de múltiples proteínas para diagnosticar lesiones cerebrales.

- 5 Por tanto, existe una necesidad identificada para contar con un ensayo fiable, sencillo y fácil de usar para las lesiones cerebrales, en especial para su uso en situaciones de respuesta de emergencia, tales como accidentes de automóvil y en el campo de batalla.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para diagnosticar una lesión cerebral traumática (TBI) en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 proporcionar una muestra de un fluido corporal obtenido a partir de dicho sujeto;
- determinar el nivel de la menos un biomarcador de glicano que se une a lectina en dicha muestra usando una matriz de lectina que comprende al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en GNA, PSA, DSA, PHA-L, SNA-I, HHA, NPA y ASA; y
- 15 proporcionar un diagnóstico basado en dicho nivel determinado de dicho al menos un biomarcador de glicano que se une a lectina, en el que un nivel mayor de unión a dicha al menos una lectina en la matriz de lectina, comparado con el de un control normal, es indicativo de TBI en el sujeto.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso *in vitro* de al menos un biomarcador de glicano que se une a lectina para diagnosticar una lesión cerebral traumática, en el que el biomarcador de glicano que se une a lectina se detecta y/o se cuantifica con el uso de al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en GNA, PSA, DSA, PHA-L, SNA-I, HHA, NPA y ASA.
- 20

En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de un kit o un dispositivo en el método de la invención, comprendiendo dicho kit o dispositivo al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en GNA, PSA, DSA, PHA-L, SNA-I, HHA, NPA y ASA, y un control para compararlo con un valor de unión medido.

- 25 En las reivindicaciones dependientes, la descripción detallada y los ejemplos se indican realizaciones específicas, detalles y ventajas de diferentes aspectos de la invención.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá con más detalle por medio de ciertas realizaciones preferidas que remiten a los dibujos adjuntos, en los que:

- 30 La figura 1 muestra cambios en las intensidades de fluorescencia de manchas entre ratas con TBI y ratas control en muestras de plasma, orina, fluido cerebroespinal ("cerebrospinal fluid", CSF) y saliva.
- La figura 2 muestra las intensidades de fluorescencia normalizadas de manchas de lectinas seleccionadas que se han puesto en contacto con muestras de orina recogidas en diversos momentos después de la operación de TBI. Los perfiles de tiempo específicos de lectina indican la aparición de diversos glicanos en los fluidos corporales en diferentes momentos después de la TBI.
- 35 La figura 3 muestra las intensidades de fluorescencia normalizadas de manchas de lectinas seleccionadas que se han puesto en contacto con muestras de saliva recogidas en diversos momentos después de la operación de TBI. Los perfiles de tiempo específicos de lectina indican la aparición de diversos glicanos en los fluidos corporales en diferentes momentos después de la TBI.

Descripción detallada de la invención

- 40 La presente descripción se refiere a biomarcadores de pronóstico y de diagnóstico de lesiones cerebrales basados en glicanos que pueden usarse, por ejemplo, para identificar sujetos con TBI/ABI grave, que están en riesgo de lesiones cerebrales secundarias y, por tanto, que requieren una mayor supervisión, o sujetos con TBI/ABI suave o lesión cerebral subclínica (SCI) que, de otro modo, permanecerían sin diagnosticar y sin tratar. Los presentes biomarcadores también pueden aplicarse en casos en los que no aparecen signos externos de lesión o cuando la
- 45 persona lesionada, tal como un bebé o un paciente en coma, no puede describir la lesión. Por ejemplo, el estado de lesión cerebral incluye, sin limitación, la presencia o la ausencia de lesión cerebral en un sujeto, el riesgo de desarrollar una lesión cerebral, el estadio o la gravedad de una lesión cerebral, el avance de una lesión cerebral (por ejemplo, el avance de una lesión cerebral a lo largo del tiempo), y la eficacia o la respuesta al tratamiento de una lesión cerebral (por ejemplo, seguimiento clínico y supervisión de una lesión cerebral después de un tratamiento).
- 50 Basándose en este estado, pueden indicarse posteriores procedimientos, que incluyen más ensayos de diagnóstico o procedimientos o regímenes terapéuticos.

Tal como se emplea en la presente, el término "biomarcador" se refiere a una molécula que puede detectarse en una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto y que es indicativa de una lesión cerebral en el sujeto. Los marcadores de particular interés en la descripción incluyen biomarcadores basados en glicanos que muestran diferencias en la glicosilación entre una muestra procedente de un individuo con una lesión cerebral y un control sano.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "biomarcador basado en glicanos" se refiere a un polisacárido, es decir, un polímero que comprende dos o más restos monosacáridos, así como a una porción de carbohidrato de un glicoconjugado, tal como una glicoproteína, un glicolípido, un peptidoglicano o un proteoglicano, o uno de sus fragmentos. Los biomarcadores basados en glicanos pueden comprender restos monosacáridos homopoliméricos o heteropoliméricos, y pueden ser lineales o ramificados. Tal como se emplean en la presente, los términos "glicano", "polisacárido" y "carbohidrato" son intercambiables, a menos que se indique lo contrario.

El glicocáliz es un revestimiento polimérico extracelular que rodea a muchas células procariotas y eucariotas que consiste en glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Los constituyentes del glicocáliz desempeñan un papel importante, por ejemplo, en el proceso de la señalización celular, la transfección de virus y la inmunidad.

Según la presente descripción, los biomarcadores basados en glicanos incluyen, pero no se limitan a carbohidratos, azúcares, glicanos, monosacáridos y/o polisacáridos, glicoproteínas y glicopolímeros. Estos biomarcadores pueden estar presentes en sangre, plasma o suero después de una lesión cerebral, en fluido cerebroespinal (CSF) después de una lesión cerebral, en fluido linfático después de una lesión cerebral, en la orina después de una lesión cerebral, en la saliva después de una lesión cerebral, en las lágrimas después de una lesión cerebral o en un exudado después de una lesión cerebral.

Los biomarcadores están diferencialmente presentes en sujetos no afectados (control normales o sin lesión cerebral) y en sujetos con lesión cerebral y, por tanto, son útiles para ayudar a la determinación del estado de la lesión cerebral. En ciertas realizaciones, los biomarcadores se miden en una muestra tomada de un sujeto usando los métodos descritos en la presente y se comparan, por ejemplo, con unos niveles predefinidos de biomarcadores y se correlacionan con el estado de la lesión cerebral. En realizaciones concretas, la medición o mediciones después pueden compararse con una cantidad o cantidades de diagnóstico pertinentes, con un valor o valores de corte, o con puntuaciones de modelos de múltiples variables que distinguen un estado positivo a lesión cerebral de un estado negativo a lesión cerebral. La cantidad o cantidades de diagnóstico representan una cantidad medida de uno o más de los anteriores biomarcadores en la cual o por debajo de la cual un sujeto se clasifica como que presenta un estado de lesión cerebral concreto. Por ejemplo, si el biomarcador o los biomarcadores están sobrerregulados, comparado con el estado normal, durante una lesión cerebral, entonces una cantidad o cantidades medidas por encima del valor o valores de corte de diagnóstico proporciona un diagnóstico de una lesión cerebral. Como alternativa, si el biomarcador o los biomarcadores están infrarregulados durante una lesión cerebral, entonces una cantidad o cantidades medidas por debajo o en el valor o valores de corte de diagnóstico proporciona un diagnóstico de que no existe lesión cerebral. Tal como se entiende en la técnica, mediante el ajuste del valor o valores de corte de diagnóstico concretos usados en un ensayo, se puede aumentar la sensibilidad o la especificidad del ensayo de diagnóstico dependiendo de las preferencias del patólogo. En realizaciones concretas, el valor de corte de diagnóstico concreto puede determinarse, por ejemplo, midiendo la cantidad de biomarcadores en un número estadísticamente significativo de muestras procedentes de sujetos con diferentes estados de lesión cerebral, y extrayendo el valor de corte para que se adapte a los niveles deseados de especificidad y sensibilidad.

Una ventaja de los biomarcadores del fluido cerebroespinal es que el CSF está en contacto directo con la matriz extracelular en el cerebro y, por tanto, refleja los cambios bioquímicos en el cerebro. Por estas razones, el CSF puede considerarse una fuente óptima de biomarcadores de una lesión cerebral. Sin embargo, debido a que el CSF debe obtenerse mediante una punción lumbar invasiva, sería beneficiosa la disponibilidad de biomarcadores de una lesión cerebral que puedan ensayarse en muestras de sangre. Los biomarcadores de suero o plasma son de especial importancia, en especial en TBI inducidas por una explosión, debido a que están asociadas generalmente con operaciones militares con un acceso limitado a las herramientas de formación de imágenes y otras herramientas de diagnóstico de los hospitales. La combinación de daños físicos y efectos psicológicos hace que la TBI inducida por una explosión sea especialmente difícil de diagnosticar. Por tanto, unos biomarcadores de plasma y suero que puedan distinguir entre los componentes físicos y psicológicos de la lesión tendrían un valor especial.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "lesión cerebral" se refiere a la destrucción o la degeneración de células cerebrales debido a uno o más factores internos o externos. Los ejemplos no limitantes de lesión cerebral incluyen lesión cerebral traumática (TBI), lesión cerebral adquirida (ABI), lesión cerebral subclínica (SCI) y trastornos neurodegenerativos. Los ejemplos no limitantes de trastornos neurodegenerativos típicos incluyen la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la encefalopatía traumática crónica. Tal como se emplean en la presente, las expresiones "daño cerebral" y "lesión cerebral" son intercambiables, a menos que se indique lo contrario.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "lesión cerebral traumática" (TBI) se refiere a una lesión cerebral provocada por un traumatismo físico externo. Los ejemplos no limitantes de incidencias que provocan una TBI

incluyen caídas, choques de vehículos, choques en la práctica deportiva y combates. La expresión incluye la TBI leve y grave, incluyendo las lesiones cerradas en la cabeza, conmociones o contusiones, y las lesiones penetrantes en la cabeza.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión "lesión cerebral adquirida" (ABI) se refiere a una lesión cerebral no provocada por una lesión cerebral externa o un trastorno hereditario. La ABI puede aparecer después del parto como resultado de complicaciones, un trastorno o enfermedad congénita, o puede aparecer como resultado, por ejemplo, de ictus, cirugía, retirada de un tumor cerebral, infección, intoxicación por productos químicos y/o tóxicos, hipoxia, isquemia, abuso de sustancias, o sus combinaciones.

10 La expresión "lesión cerebral" también se refiere a una lesión cerebral subclínica y a una lesión cerebral anóxica-isquémica. La expresión "lesión cerebral subclínica" (SCI) se refiere a una lesión cerebral sin pruebas clínicas explícitas de lesión cerebral. La falta de pruebas clínicas de lesión cerebral cuando sí que existe una lesión cerebral puede surgir del grado de la lesión, el tipo de lesión, el nivel de consciencia y/o medicaciones, en particular sedación y anestesia.

15 Tal como se emplea en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo animales y sujetos humanos. Los animales incluyen, pero no se limitan a mascotas, animales de granja, animales de trabajo, animales deportivos, animales de espectáculos y animales de zoo. Los ejemplos no limitantes de sujetos humanos típicos que padecen o que están predispuestos a una lesión cerebral, en particular TBI, incluyen bebés, niños y adultos jóvenes, en particular hombres; ancianos; atletas, en particular boxeadores, jugadores de hockey sobre hielo, jugadores de fútbol y practicantes de monopatín; y soldados. La expresión "sujeto humano" y el término
20 "individuo" son intercambiables. Generalmente, se sabe o se sospecha que el sujeto tiene una lesión cerebral, tal como TBI o ABI.

Tal como se emplea en la presente, el término "diagnóstico" se refiere a determinar si un sujeto tiene o no tiene una lesión cerebral, tal como TBI o ABI. El término también incluye los casos en que la presencia de una lesión cerebral no se determina en último término, sino que deben realizarse posteriores ensayos de diagnóstico. En estas
25 realizaciones, el método no es, en sí mismo, determinante de la presencia o la ausencia de una lesión cerebral en el sujeto, sino que puede indicar la necesidad de realizar un posterior ensayo de diagnóstico o que este sería beneficioso. Por tanto, los métodos pueden combinarse con uno o más métodos de diagnóstico distintos para la determinación final de la presencia o la ausencia de una lesión cerebral en el sujeto. Los ejemplos de dichos otros métodos de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a CT y MRI, y son muy conocidos por los expertos en la técnica.
30 Tal como se emplea en la presente, una "determinación final" o "diagnóstico final" se refiere a determinar la presencia o la ausencia de una lesión cerebral en un sujeto. La determinación final o el diagnóstico final pueden ser el resultado de cualquiera de los métodos de la invención que, en algunas realizaciones, pueden incluir más de un ensayo de diagnóstico.

Tal como se emplea en la presente, el término "comparar" se refiere a realizar una evaluación de cómo la
35 proporción, el nivel o la localización celular de uno o más biomarcadores en una muestra procedente de un sujeto se relaciona con la proporción, el nivel o la localización del correspondiente o correspondientes biomarcadores en un patrón o muestra control. Por ejemplo, "comparar" puede referirse a evaluar si la proporción, el nivel o la localización celular de uno o más biomarcadores en una muestra procedente de un sujeto es igual, mayor o menor, o diferente de la proporción, el nivel o la localización del correspondiente o correspondientes biomarcadores en un patrón o
40 muestra control. De modo más específico, el término puede referirse a evaluar si la proporción, el nivel o la localización celular de uno o más biomarcadores en una muestra procedente de un sujeto es igual, mayor o menor, o diferente o se corresponde (o no) con la proporción, el nivel o la localización celular de unos niveles de biomarcadores predefinidos que se corresponden, por ejemplo, con un sujeto que presenta una lesión cerebral subclínica (SCI), un sujeto que no tiene SCI, un sujeto que está respondiendo a un tratamiento para una SCI, un
45 sujeto que está no respondiendo a un tratamiento para una SCI, un sujeto que es probable/no es probable que responda a un tratamiento concreto para SCI, o un sujeto que padece/no padece otra enfermedad o trastorno. En una realización específica, el término "comparar" se refiere a evaluar si el nivel de uno o más biomarcadores en una muestra procedente de un sujeto es igual, mayor o menor, o diferente o se corresponde (o no) con los niveles de los mismos biomarcadores en una muestra control (por ejemplo, unos niveles predefinidos que se correlacionan con
50 individuos no infectados, niveles convencionales de SCI, etc.).

Los presentes biomarcadores y métodos pueden usarse no solo para objetivos de diagnóstico, sino también para la prognosis o la predicción del resultado de una lesión cerebral, o para controlar la supervivencia del sujeto a la lesión cerebral o la respuesta a un tratamiento.

55 Los presentes biomarcadores y métodos pueden usarse como criterio de valoración clínico en ensayos clínicos para tratar TBI o ABI, que proporcionan el resultado de la lesión cerebral, o que controlan la supervivencia del sujeto a la lesión cerebral o la respuesta a un tratamiento.

En algunos aspectos de la presente descripción, el diagnóstico o el pronóstico de una lesión cerebral puede comprender la determinación de la presencia o la ausencia de uno o más de los presentes biomarcadores basados en glicanos en una muestra biológica obtenida de un sujeto cuya posible lesión cerebral se va a determinar. Los

ensayos multiplexados pueden proporcionar una precisión de diagnóstico sustancialmente mejorada. En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para determinar el riesgo de desarrollar una lesión cerebral en un sujeto. Los porcentajes, cantidades o patrones de biomarcadores son características de diversos estados de riesgo, por ejemplo, alto, intermedio o bajo. El riesgo de desarrollar una lesión cerebral se determina midiendo los biomarcadores pertinentes y después sometiéndolos a un algoritmo de clasificación o comparándolos con una cantidad de referencia, es decir, un nivel o patrón predefinido de biomarcadores que están asociados con el nivel de riesgo concreto.

En otra realización, la presente invención proporciona métodos para determinar la gravedad de la lesión cerebral en un sujeto. Cada grado o estadio de lesión cerebral posiblemente tiene un nivel característico de un biomarcador o niveles relativos de un conjunto de biomarcadores (un patrón). La gravedad de la lesión cerebral se determina midiendo los biomarcadores pertinentes y después sometiéndolos a un algoritmo de clasificación o comparándolos con una cantidad de referencia, es decir, un nivel o patrón predefinido de biomarcadores que están asociados con el estadio concreto.

En otras realizaciones del presente método, el diagnóstico de una lesión cerebral puede comprender la determinación de la cantidad de uno o más biomarcadores basados en glicanos, o sus cantidades relativas comparadas, por ejemplo, con la cantidad de cada uno, de uno o más glicanos distintos y/o un patrón conocido. En algunas realizaciones, el diagnóstico de una lesión cerebral puede basarse en las proporciones relativas de biomarcadores basados en glicanos en diferentes fluidos corporales, tales como la proporción en sangre/CSF.

En otras realizaciones, las cantidades o las proporciones relativas de uno o más biomarcadores basados en glicanos pueden compararse con un valor umbral predeterminado que es indicativo de la presencia o la ausencia de una lesión cerebral o que es útil para evaluar el avance o la regresión de la lesión cerebral. Esta comparación con un valor umbral puede dar como resultado un diagnóstico final o no final o una determinación con respecto al avance o la regresión de la lesión cerebral. Los métodos estadísticos para determinar los valores umbral apropiados serán evidentes con facilidad para los expertos en la técnica. Los valores umbral pueden haber sido determinados, si es necesario, a partir de muestras de sujetos de la misma edad, raza, género y/o estado de enfermedad, etc. El valor umbral puede originarse de un único individuo no afectado por una lesión cerebral o puede ser un valor reunido a partir de más de un individuo de estas características.

En algunos ejemplos preferidos de la descripción, los biomarcadores basados en glicanos también pueden detectarse y/o cuantificarse con el uso de lectinas. Las lectinas son una familia muy conocida de proteínas de unión a carbohidratos, concretamente, macromoléculas que son muy específicas para unos glicanos concretos basándose en sus secuencias y estructuras del resto azúcar. Las lectinas pueden clasificarse en grupos diferenciados según su especificidad de carbohidrato e incluyen, pero no se limitan a lectinas específicas de fucosa, específicas de manosa, específicas de N-acetilglucosamina, y específicas de galactosa/N-acetilglucosamina. Por ejemplo, las figuras 1 a 3 muestran las lectinas que son particularmente adecuadas para distinguir sujetos con TBI de sujetos sin TBI. Tal como se indica, diferentes tipos de muestras pueden mostrar diferentes perfiles de biomarcadores de glicanos que se unen a lectina. Por consiguiente, pueden usarse lectinas capaces de identificar sujetos con lesión cerebral de modo individual o en cualquiera de sus combinaciones.

En otros ejemplos, los biomarcadores basados en glicanos también pueden detectarse y/o cuantificarse con el uso de galectinas, la clase de lectina más ampliamente expresada en todos los organismos. La galectinas son una familia de proteínas definidas por su especificidad de unión por azúcares de β -galactósido, tales como N-acetil-lactosamina (Gal β 1-3GlcNAc o Gal β 1-4GlcNAc), que pueden unirse a proteínas mediante glicosilación N-enlazada u O-enlazada. También se denominan lectinas de tipo S debido a su dependencia de los enlaces disulfuro para su estabilidad y unión a carbohidratos. Entre las 15 galectinas descubiertas en mamíferos, solo las galectinas- 1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12 y -13 han sido identificadas en seres humanos, hasta la fecha. Tal como se emplean en la presente, las "galectinas" están incluidas en el término "lectinas", a menos que se indique lo contrario.

Pueden aplicarse técnicas convencionales de la tecnología de micromatrices de proteínas para analizar los biomarcadores basados en glicanos. En estas micromatrices, las lectinas se inmovilizan sobre un soporte sólido, tal como un portaobjetos, a una elevada densidad espacial. Cada lectina puede disponerse en la matriz a varias concentraciones y repetirse en cada portaobjeto. Los intervalos de concentración pueden adaptarse para cada una de la lectinas y calibrarse para proporcionar una respuesta lineal dentro del mismo intervalo, independientemente de la afinidad de la lectina. Una muestra de biomarcadores basados en glicanos intactos se aplica a la matriz y se detecta su patrón de unión mediante un marcador, tal como un marcador fluorescente, un marcador radiactivo o un marcador quimioluminiscente, que se coloca sobre el propio biomarcador o sobre la lectina que se dirige a los restos carbohidrato del biomarcador. Puede usarse estreptavidina para detectar muestras biotiniladas. Además pueden emplearse métodos basados en "sandwich" que utilizan la detección de anticuerpos, tal como será evidente para los expertos en la técnica.

Los sustratos de micromatrices adecuados incluyen, pero no se limitan a vidrio, sílice, aluminosilicatos, borosilicatos, óxidos de metales, tales como óxido de aluminio y óxido de níquel, oro, diversas arcillas, nitrocelulosa o nailon. En algunas realizaciones, se prefiere un sustrato de vidrio. En otras realizaciones, el sustrato puede revestirse con un compuesto para potenciar la unión de la lectina al sustrato. En otras realizaciones, las lectinas se han dispuesto en

matriz sobre un portaobjetos de vidrio revestido con una membrana de nitrocelulosa. En otras realizaciones, también se unen al sustrato una o más lectinas control.

En algunas realizaciones, puede emplearse una matriz de lectina disponible en el mercado, que incluye un portaobjetos de vidrio convencional, que está salpicado con 8 pocillos de matrices de lectina idénticas. Cada lectina, junto con los controles positivos, se dispone en matriz por duplicado. El portaobjetos se suministra con una junta móvil de 8 pocillos que permite procesar 8 muestras usando un solo portaobjetos. Pueden colocarse portaobjetos de cuatro portaobjetos en una bandeja, que se corresponde con una microplaca convencional y esto permite realizar un proceso de alta capacidad de procesamiento robótico automático de 64 matrices simultáneamente.

A diferencia de otros métodos convencionales, por ejemplo, la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, las micromatrices de lectina permiten realizar un perfil rápido y muy sensible de complejas características de glicanos sin que sea necesario liberar los glicanos. Las muestras diana incluyen una gama amplia de glicoconjugados implicados en células, tejidos, fluidos corporales, así como glicanos sintéticos y sus imitaciones. Se han desarrollado diversos procedimientos para la formación rápida de perfiles de glicanos diferencial para biomarcadores relacionados con glicanos, y estos están disponibles en el mercado.

En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para determinar el desarrollo de una lesión cerebral en un sujeto. El desarrollo de una lesión cerebral se refiere a cambios en el estado de la lesión cerebral a lo largo del tiempo, que incluyen el avance de la lesión cerebral (empeoramiento) y la regresión de la lesión cerebral (mejoría). A lo largo del tiempo, la cantidad o la cantidad relativa (por ejemplo, el patrón) de los biomarcadores cambia. Por ejemplo, el biomarcador "X" puede aumentar con una lesión cerebral, mientras que el biomarcador "Y" puede disminuir con una lesión cerebral. Por tanto, la tendencia de estos biomarcadores, que aumentan o disminuyen a lo largo del tiempo hacia una lesión cerebral o hacia no lesión cerebral, indica el desarrollo del trastorno. Por consiguiente, este método implica medir el nivel de uno o más biomarcadores en un sujeto al menos en dos momentos diferentes, por ejemplo, un primer momento y un segundo momento, y comparar los cambios, si se producen. Se determina el desarrollo de una lesión cerebral basándose en estas comparaciones.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para determinar la eficacia terapéutica de un fármaco farmacéutico. Estos métodos son útiles para realizar ensayos clínicos del fármaco, así como para controlar el avance de un sujeto que está tomando el fármaco. La terapia o los ensayos clínicos implican la administración del fármaco en un régimen concreto. El régimen puede implicar una dosis única del fármaco o múltiples dosis del fármaco a lo largo del tiempo. El médico o el investigador clínico controla el efecto del fármaco sobre el paciente o sujeto a lo largo de la administración. Si el fármaco tiene un impacto farmacológico sobre el trastorno, las cantidades o las cantidades relativas (por ejemplo, el patrón o el perfil) de uno o más de los biomarcadores de la presente invención pueden cambiar hacia un perfil de no lesión cerebral. Por tanto, se puede seguir el desarrollo de uno o más biomarcadores en el sujeto durante el desarrollo del tratamiento. Por consiguiente, este método implica medir uno o más biomarcadores en un sujeto que está recibiendo una terapia de fármacos, y correlacionar los niveles de biomarcadores con el estado de la lesión cerebral del sujeto (por ejemplo, mediante comparación con unos niveles predefinidos de los biomarcadores que se corresponden con diferentes estados de lesión cerebral). Un aspecto de este método implica determinar los niveles de uno o más biomarcadores como mínimo en dos momentos diferentes durante el transcurso de una terapia de fármacos, por ejemplo, un primer momento y un segundo momento, y comparar el cambio en los niveles de los marcadores, si se produce. Por ejemplo, los niveles de uno o más biomarcadores pueden medirse antes y después de la administración del fármaco o a dos momentos diferentes durante la administración del fármaco. El efecto de la terapia se determina basándose en estas comparaciones. Si un tratamiento es eficaz, entonces dichos uno o más biomarcadores tenderán hacia la normalidad, mientras que si el tratamiento no es eficaz, dichos uno o más biomarcadores tenderán hacia indicaciones de lesión cerebral.

Los métodos adecuados para su uso en la detección o el análisis de biomarcadores basados en glicanos incluyen, pero no se limitan a estudios Biocore, espectrometría de masas, electroforesis, resonancia magnética nuclear (RMN), métodos cromatográficos o sus combinaciones. De modo específico, el método espectrométrico de masa puede ser, por ejemplo, LCMS, LC-MS/MS, MALDI-MS, MALDI-TOF, TANDEMMS, FTMS, control de múltiples reacciones ("multiple reaction monitoring", MRM), MRM cuantitativo, o análisis de la unión sin marcadores. Los ejemplos de espectrómetros de masas son espectrómetros de tiempo de vuelo, de sector magnético, de filtro de cuadrupolos, de trampa de iones, de resonancia de ciclotrón de iones, un analizador de sector electrostático, híbridos y combinaciones de los anteriores, y similares. En otro aspecto, la espectrometría de masas puede combinarse con otro método o métodos apropiados, tal como pueden contemplar los expertos en la técnica. En otro aspecto, la técnica espectrométrica de masas es un control de múltiples reacciones (MRM) o MRM cuantitativo. El método electroforético puede ser, por ejemplo, electroforesis capilar ("capillary electrophoresis", CE) o enfoque isoeléctrico ("isoelectric focusing", IEF), y los métodos cromatográficos pueden ser, por ejemplo, HPLC, cromatoenfoco, o cromatografía de intercambio iónico.

En algunos aspectos, la medición y/o el análisis de biomarcadores basados en glicanos en una muestra puede realizarse mediante cualquier ensayo de enzimas apropiado en la técnica. Estos ensayos incluyen, pero no se limitan a ensayos de galactosa oxidasa.

- En otros aspectos, pueden usarse uno o más tipos diferentes de ensayos de unión para detectar, medir y/o analizar los presentes biomarcadores basados en glicanos. Por ejemplo, puede emplearse un modo de lectina/galectina competitivo, en el que un glicano premarcador compite con un glicano procedente de una muestra que se va a analizar por un número limitado de sitios de unión ofrecidos por la lectina/galectina. Como alternativa, o además, dicho ensayo de unión puede realizarse en un modo de "sandwich", en el que se emplea una lectina/galectina para unirse a un lado de un glicano contenido o derivado de una muestra que se va a analizar, y otra lectina/galectina, conjugada con un marcador detectable, se une al otro lado del glicano o del complejo de glicano-lectina/galectina formado.
- En otros aspectos, los biomarcadores pueden detectarse y/o medirse mediante inmunoensayos, en un modo competitivo o de "sandwich". Los expertos en la técnica saben cómo realizar estos inmunoensayos. Además, en el mercado están disponibles anticuerpos adecuados para este objetivo. Pueden producirse otros anticuerpos adecuados mediante métodos muy conocidos en la técnica.
- En otros aspectos, puede emplearse una combinación de un ensayo de lectina/galectina y un inmunoensayo para detectar, medir y/o analizar los biomarcadores presentes en una muestra tomada de un sujeto. Para este objetivo, son necesarios un reactivo de captura y un reactivo de detección. Dicho reactivo de captura puede ser una lectina o una galectina, mientras que dicho reactivo de detección puede ser un anticuerpo marcado de modo detectable, o viceversa.
- La presente descripción también contempla los inmunoensayos tradicionales que incluyen, por ejemplo, inmunoensayos de "sandwich", tales como ELISA o inmunoensayos basados en la fluorescencia, así como otros inmunoensayos de enzimas. En un inmunoensayo basado en SELDI, un reactivo de captura bioespecífico para el biomarcador se une a la superficie de una sonda de MS, tal como una matriz de chip de lectina preactivada. Después el biomarcador se captura específicamente sobre el biochip a través de este reactivo, y el biomarcador capturado se detecta mediante espectrometría de masas.
- Tal como entienden los expertos en la técnica, puede usarse más de un tipo de lectinas/galectinas y/o más de un tipo de anticuerpo en los ensayos de unión indicados anteriormente. En otras palabras, pueden usarse varias lectinas/galectinas y anticuerpos diferentes en una reacción para potenciar la especificidad o la afinidad de unión. Además pueden realizarse múltiples reacciones diferentes de modo simultáneo o secuencial para detectar diferentes biomarcadores basados en glicanos en una muestra que se va a analizar.
- También se contempla que los glicanos o los complejos de glicanos contenidos en una muestra que se va a analizar puedan inmovilizarse directamente sobre una superficie, tal como un pocillo de una microplaca, una superficie de vidrio (por ejemplo, un portaobjetos), una superficie metálica (por ejemplo, una hoja de plata u oro) mediante cargas opuestas, mediante un pegamento, o mediante unión de afinidad, y después pueden detectarse, por ejemplo, mediante un anticuerpo o una lectina marcada de modo detectable.
- Según lo anterior, las moléculas adecuadas para su uso en la detección de biomarcadores basados en glicanos en una muestra que se va a analizar incluyen, pero no se limitan a lectinas, galectinas, anticuerpos y moléculas pequeñas competitivas. Dichas moléculas de detección pueden visualizarse, o hacer que sean mensurables de otro modo, empleando, por ejemplo, tintes, marcadores, o reactivos de color conjugados. Los marcadores de enzimas adecuados para este objetivo incluyen los que, tras la adición de un sustrato, catalizan una reacción que conduce a un cambio mensurable en el color, en la luminiscencia, o en la producción de un precipitado. Los ejemplos no limitantes de dichos marcadores de enzimas incluyen la peroxidasa de rábano ("horseradish peroxidase", HRP) y la fosfatasa alcalina ("alkaline phosphatase", AP). Pueden usarse marcadores fotoluminiscentes, que incluyen tintes fluorescentes (rápidos), quelados de lantánidos (para la fluorescencia de resolución en el tiempo) y marcadores de conversión ascendente de fotones para detectar dichas moléculas de detección. Además, la detección puede basarse en la bioluminiscencia y la quimioluminiscencia (como, por ejemplo, en la detección basada en luciferina), o en la electroquimioluminiscencia (por ejemplo, con complejos de rutenio). Además puede usarse biotina y sus derivados, que permiten la unión y la detección mediante avidina marcada o estreptavidina marcada, así como diversos isótopos radiactivos, para la detección. La detección también puede realizarse usando esferas y partículas que incluyen, por ejemplo, partículas de látex coloreadas, partículas de polímeros sintéticos coloreadas, metales coloidales, tales como partículas de oro y plata, esferas (para)magnéticas, y partículas teñidas con fluoróforos.
- En varios aspectos, los biomarcadores pueden detectarse mediante un ensayo electroquímico-luminiscente desarrollado por Meso Scale Discovery (Gaithersburg, Md.). La detección de electroquimioluminiscencia emplea marcadores que emiten luz cuando se estimulan electroquímicamente. Las señales de fondo son mínimas, porque el mecanismo de estimulación (electricidad) está desacoplado de la señal (luz). Los marcadores son estables, no radiactivos y ofrecen una gama de químicas de acoplamiento convenientes.
- Además, una muestra también puede analizarse por medio de un biochip pasivo o activo. Los biochips, en general, comprenden sustratos sólidos y tienen una superficie, en general, plana, a la cual se une un reactivo de captura (también denominado un reactivo de afinidad o adsorbente). Con frecuencia, la superficie de un biochip comprende una pluralidad de localizaciones direccionables, cada una de las cuales tiene un reactivo de captura unido a ella. Los biochips de lectina son biochips adaptado para la captura de glicanos. En la técnica se describen muchos biochips

de lectina.

La presente descripción también proporciona kits que pueden usarse para determinar la presencia o la ausencia o para medir los niveles de uno o más biomarcadores basados en glicanos descritos en la presente. En una realización, el kit comprende un envase que contiene una o más lectinas que se unen selectivamente a uno o más biomarcadores basados en glicanos, y un control para comparar con un valor de unión medido. En algunas realizaciones, el control es un valor umbral para comparar con el valor medido. El kit también puede incluir un marcador detectable.

El kit para calificar el estado de una lesión cerebral puede proporcionarse como una tira de inmunocromatografía que comprende una membrana sobre la cual se inmovilizan anticuerpos, y un medio para detectar el biomarcador o los biomarcadores. El kit puede comprender una placa de plástico sobre la cual se inmoviliza una almohadilla de aplicación de la muestra, unas bandas de anticuerpo y una banda de anticuerpo secundario, y una almohadilla absorbente, colocadas en serie para mantener un flujo capilar continuo del suero de la sangre.

En ciertos ejemplos, un sujeto puede diagnosticarse añadiendo sangre, plasma o suero procedente del sujeto al kit y detectando los biomarcadores pertinentes conjugados con los anticuerpos, de modo específico, mediante un método que comprende las etapas de: (i) recoger sangre, plasma o suero del sujeto; (ii) separar el suero de la sangre del sujeto; (iii) añadir el plasma o el suero de la sangre del sujeto a un kit de diagnóstico; y (iv) detectar los biomarcadores conjugados con los anticuerpos. En este método, los anticuerpos se ponen en contacto con la sangre del sujeto. Si los biomarcadores están presentes en la muestra, los anticuerpos se unirán a la muestra o a una de sus porciones. En otros aspectos del kit y del diagnóstico, no es necesario recoger sangre, plasma o suero del sujeto (es decir, ya se ha recogido). Además, en otros aspectos, la muestra puede comprender una muestra de tejido o una muestra clínica (no invasiva), tal como saliva u otros fluidos corporales, como se describe en la presente.

El kit también puede comprender una disolución de lavado o instrucciones para fabricar una disolución de lavado, en el que la combinación de reactivos de captura y la disolución de lavado permite la captura de los biomarcadores sobre el soporte sólido o la columna para la posterior detección, por ejemplo, mediante anticuerpos o espectrometría de masas. En otra realización, un kit puede comprender instrucciones para parámetros operativos adecuados en forma de una etiqueta o un inserto separado. Por ejemplo, las instrucciones pueden informar a un consumidor acerca del modo en que recoger la muestra, cómo lavar la sonda o los biomarcadores concretos que se van a detectar, etc. En otra realización, el kit puede comprender uno o más recipientes con muestras de biomarcadores, para ser usados como patrón para la calibración.

Tal como será evidente para los expertos en la técnica, el presente kit de matriz de lectina puede usarse con un método basado en marcadores o como un método basado en "sandwich". En una realización, el método basado en marcadores se usa para muestras de biotina que contienen proteoglicanos y glicoproteínas para la detección directa sobre la matriz a través de un complejo de biotina-estreptavidina conjugado con un tinte equivalente a Cy3. En otra realización, se usa un método basado en "sandwich" para la detección con anticuerpos de elementos del glicocáliz (glicolípidos, glicoproteínas, etc.) capturados sobre la matriz. El kit o el usuario del kit puede suministrar anticuerpos indicadores marcados específicos para elementos de interés del glicocáliz. En un manual del usuario puede incluirse un ejemplo de protocolo para este procedimiento con un "cóctel de anticuerpos" general. En algunas realizaciones no limitantes, el usuario final puede necesitar determinar las condiciones y las concentraciones de anticuerpos específicas.

En una realización del kit de detección de biomarcadores, puede emplearse la proteína HRP y la luz fluorescente para detectar el biomarcador en un fluido corporal y para indicar la cantidad del biomarcador en porcentaje. Esto puede incorporarse en una aplicación móvil que indique la gravedad de la lesión cerebral en una escala que comprende, pero no se limita a ninguna, leve, moderada y grave. En otra realización, se recibe una respuesta análoga de sí/no. Estos ejemplos no excluyen otras realizaciones posibles.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona el uso de al menos un anticuerpo en un kit o en un dispositivo para detectar una lesión cerebral, en el que el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal de cualquier especie, o uno de sus fragmentos, roto por enzimas o producido de modo recombinante, o un anticuerpo humanizado, y en el que el anticuerpo reconoce y se une a un glicano, glicoproteína, peptidoglicano, proteoglicano, glicolípidos, proteína, molécula pequeña, lectina, o anticuerpo de otra especie (en general, "antígenos"). Dicho anticuerpo puede usarse, por ejemplo, como:

i) un reactivo de captura, en el que el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido para unirse a su antígeno procedente de un medio de muestra;

ii) un anticuerpo que se inmoviliza sobre un sustrato sólido para unirse a un reactivo de captura específico de analito (por ejemplo, lectina) de modo que el agente unido (lectina) es capaz de capturar el analito (glicano) procedente de una muestra;

iii) un reactivo de detección primario, en el que un anticuerpo conjugado con cualquier marcador (anticuerpo marcado) reconoce y se une directamente a un antígeno;

iv) un reactivo de detección secundario, en el que un anticuerpo marcado reconoce y se une a un reactivo de detección primario que está unido al analito. Por ejemplo, un anticuerpo marcado se une a una lectina que se ha unido a su glicano cognado, o un anticuerpo marcado procedente de una especie (por ejemplo, cabra) que reconoce y se une a un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, ratón) que se ha unido a su antígeno;

5 v) un anticuerpo para reconocer y unirse a una parte de no glicano de una molécula que contiene glicano, por ejemplo, una glicoproteína, en el que la glicoproteína, o uno de sus fragmentos, primero se une, por ejemplo, a una lectina a través de su resto glicano, y después es reconocida y unida por un anticuerpo que es específico para la parte de péptido de la molécula; o

vi) un anticuerpo para su uso en ensayos de inmunotransferencia.

10 El kit también puede comprender una combinación de anticuerpos para diferentes objetivos.

Todas las realizaciones, los detalles, las ventajas y similares del presente kit también se aplican a un dispositivo para su uso en diferentes aspectos y realizaciones de la presente descripción. Además, todas las realizaciones, los detalles, las ventajas y similares de los presentes métodos se aplican al presente kit, y viceversa. En particular, uno o más compuestos, composiciones o reactivos descritos como adecuados para realizar los presentes métodos

15 pueden estar comprendidos en el presente kit. De modo similar, cualquier asunto descrito con referencia al kit se aplica también a los presentes métodos.

Sin más explicaciones, se cree que los expertos en la técnica, usando la anterior descripción, pueden emplear la presente invención en su extensión más completa.

Los ejemplos no limitantes de las ventajas asociadas con los presentes biomarcadores basados en glicanos incluyen

20 que son específicos de tejido cerebral, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica para introducirse en la corriente sanguínea a los pocos minutos de la lesión, y pueden detectarse usando un ensayo de sangre o de otros fluidos corporales en el punto de atención. Además, los biomarcadores pueden aumentar o disminuir tras la lesión, pero, no obstante, están en correlación con la gravedad de la lesión. Preferiblemente, los presentes biomarcadores pueden correlacionarse con la magnitud de la lesión, la capacidad de supervivencia y/o el resultado neurológico, o

25 pueden ser indicativos del grado de pérdida neuronal y de células gliales, y los daños axonales y vasculares. Los presentes biomarcadores pueden añadirse significativamente a la paleta de diagnóstico actual para la lesión cerebral.

Ejemplos

Todos los experimentos con animales se realizaron según las líneas directrices institucionales que se ajustan a las

30 leyes nacionales e internacionales para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y que están aprobadas por el comité ético nacional.

Ejemplo 1

Se emplea un modelo de ratón de una lesión cerrada en la cabeza experimental descrito por Yatsiv *et al.* en FASEB J., 2005, 19:1701-1703, para identificar los cambios, el aumento o la disminución, en el nivel de biomarcadores

35 basados en glicanos después de un traumatismo cefálico provocado por la caída de un peso sobre un cráneo expuesto.

La gravedad de la lesión se evalúa según la puntuación de gravedad neurológica descrita por Beni-Adani *et al.* (J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, 296:57-63) basándose en diez tareas individuales que reflejan la función motora, la agilidad mental y el comportamiento. La evaluación de la gravedad se realiza 1 hora y 7 días después del

40 traumatismo para asignar los ratones a grupos de estudio comparables para descubrir una correlación entre la gravedad de los daños y el nivel del biomarcador detectado.

Después de la eutanasia, se recogen los fluidos corporales (incluyendo orina, plasma o suero sanguíneo, y CSF) de los animales normales y con lesiones cerebrales y se analizan para biomarcadores basados en glicanos usando un ensayo de lectina, y los cerebros se evalúan histológicamente.

45 Ejemplo 2

Se emplea un modelo de rata de una lesión cerrada en la cabeza experimental descrito por Bilgen *et al.* (Neurorehabil. Neural Repair, 2005, 19:219-226) con algunas modificaciones, para identificar los cambios, el aumento o la disminución, en el nivel de biomarcadores basados en glicanos después de un traumatismo cefálico.

Se realiza una formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) T2 ponderada *in vivo* en los animales para

50 mostrar las patologías, incluyendo el tamaño de la lesión, la viabilidad del tejido y el edema cerebral, de las lesiones resultantes en los correspondientes tejidos neuronales a las 24 h y en el día 3.

Después de la eutanasia, se realiza una evaluación histológica de la lesión en la corteza y el hipocampo. Además, se recogen los fluidos corporales (incluyendo orina, plasma o suero sanguíneo, y CSF) de los animales normales y

con lesiones cerebrales y se analizan para biomarcadores basados en glicanos usando un ensayo de lectina.

Ejemplo 3

- 5 Se lleva a cabo un impacto cortical controlado para exponer la dura de ratas anestesiadas según Bilgen *et al.* (Neurorehabil. Neural Repair, 2005, 19:219-226) con modificaciones. Los animales se sacrificaron en diversos momentos después de la operación. Se recogieron muestras de orina, plasma sanguíneo, saliva y fluido cerebroespinal (CSF) y se procesaron usando métodos habituales muy conocidos por los expertos en la técnica.

Las muestras se incubaron en una matriz de lectina y, después de lavar, se dejó que un conjugado fluorescente se uniese a los glicanos capturados o a los complejos que contienen glicano. Las manchas se visualizaron y se registraron las intensidades de fluorescencia con un escáner láser.

- 10 Los resultados resumidos en las figuras 1 a 3 demuestran que los fluidos corporales de los animales con TBI contienen glicanos o complejos que contienen glicanos que muestran una unión significativamente elevada a lectinas concretas, comparado con los fluidos de los animales simulados. Mediante la selección de las lectinas apropiadas, el kit de detección de TBI puede ajustarse para dirigirse a diferentes ventanas de tiempo post-TBI.

Ejemplo 4

- 15 Para verificar los descubrimientos de los experimentos en animales, se recogen fluidos corporales humanos, tales como orina, plasma o suero sanguíneo, y CSF, obtenidos de pacientes con TBI y sujetos control sanos, y se analizan para biomarcadores basados en glicanos usando un ensayo de lectina.

- 20 Para los expertos en la técnica será obvio que, a medida que la tecnología avanza, el concepto de la invención puede ejecutarse de diversas formas. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* para diagnosticar una lesión cerebral traumática (TBI) en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 proporcionar una muestra de un fluido corporal obtenido a partir de dicho sujeto;
- determinar el nivel de la menos un biomarcador de glicano que se une a lectina en dicha muestra usando una matriz de lectina que comprende al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en GNA, PSA, DSA, PHA-L, SNA-I, HHA, NPA y ASA; y
- 10 proporcionar un diagnóstico basado en dicho nivel determinado de dicho al menos un biomarcador de glicano que se une a lectina, en el que un nivel mayor de unión a dicha al menos una lectina en la matriz de lectina, comparado con el de un control normal, es indicativo de TBI en el sujeto.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que dicho diagnóstico incluye determinar la gravedad de la lesión cerebral sometiendo dicho nivel determinado de al menos un biomarcador de glicano que se une a lectina a un algoritmo de clasificación, o comparando dicho nivel con una cantidad de referencia.
- 15 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha lesión cerebral traumática se selecciona del grupo que consiste en TBI leve y TBI grave.
- 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en orina, plasma o suero sanguíneo y saliva.
- 20 5.- Un uso *in vitro* de al menos un biomarcador de glicano que se une a lectina para diagnosticar una lesión cerebral traumática, en el que el biomarcador de glicano que se une a lectina se detecta y/o se cuantifica con el uso de al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en GNA, PSA, DSA, PHA-L, SNA-I, HHA, NPA y ASA.
- 6.- El uso de un kit o un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho kit o dispositivo al menos una lectina seleccionada del grupo que consiste en GNA, PSA, DSA, PHA-L, SNA-I, HHA, NPA y ASA, y un control para compararlo con un valor de unión medido.
- 25 7.- El uso según la reivindicación 6, en el que el kit o el dispositivo comprende además un marcador detectable, un marcador visible, un marcador mensurable, o un agente de color, de tinte, luminiscente o fluorescente.

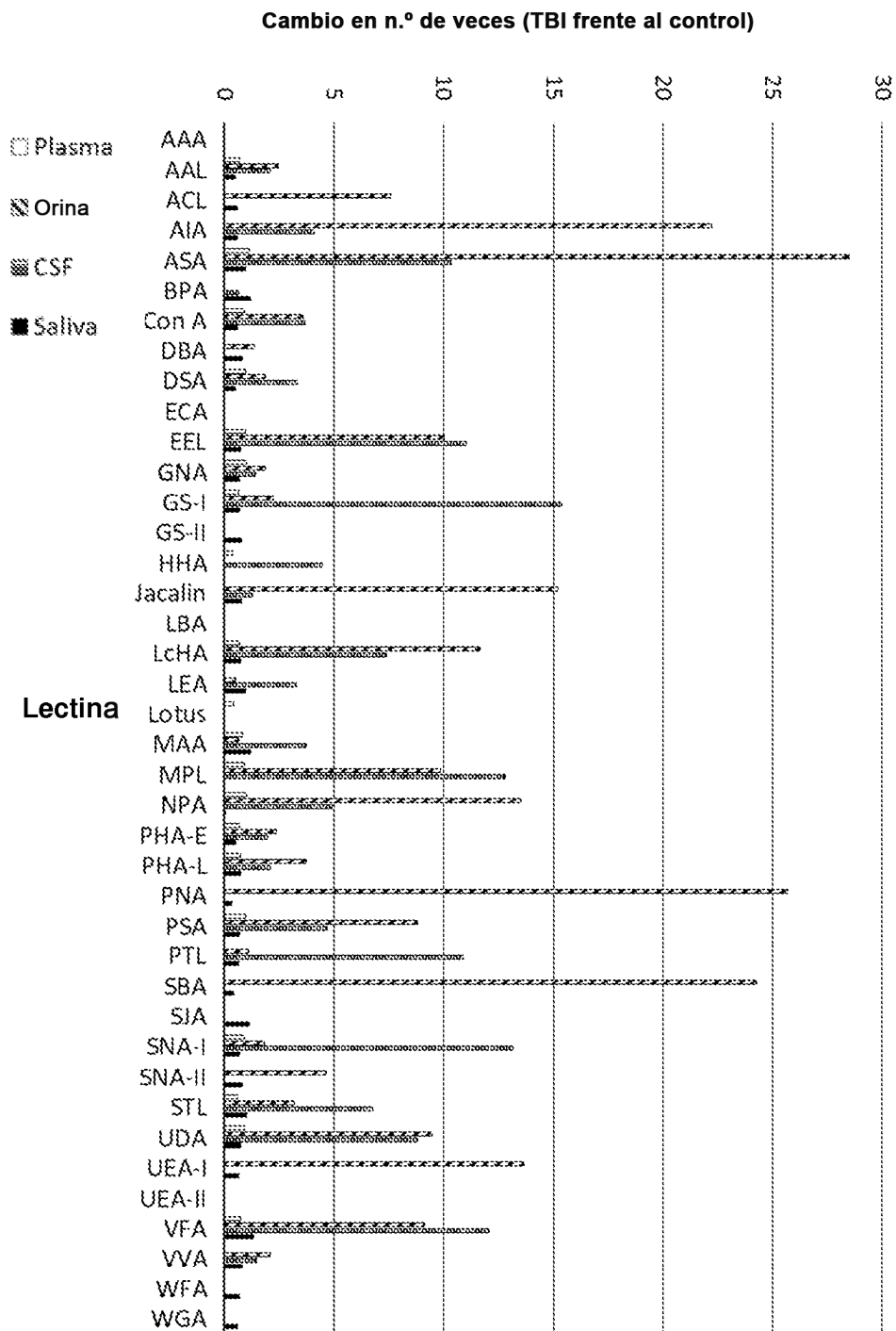


Figura 1

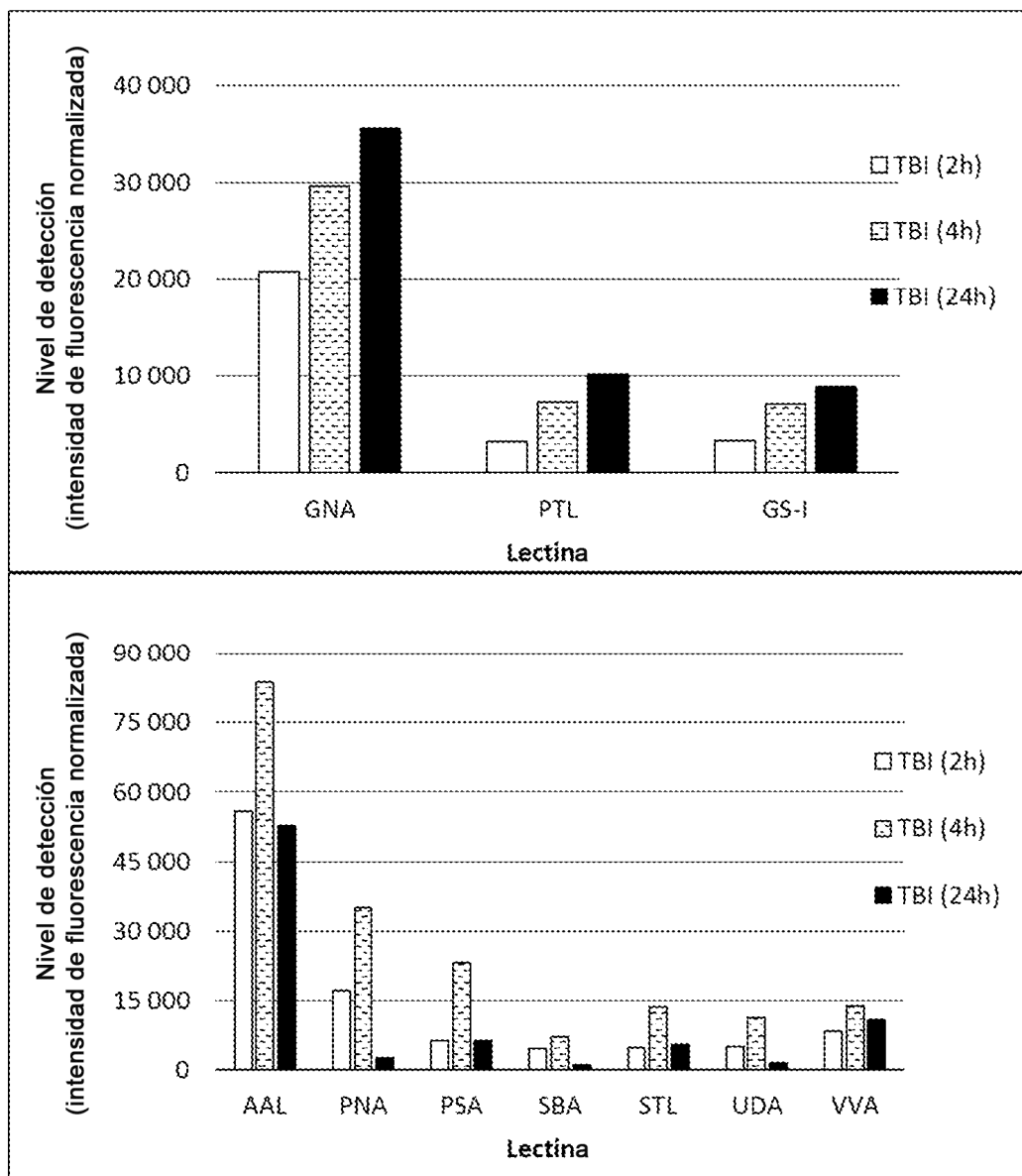


Figura 2

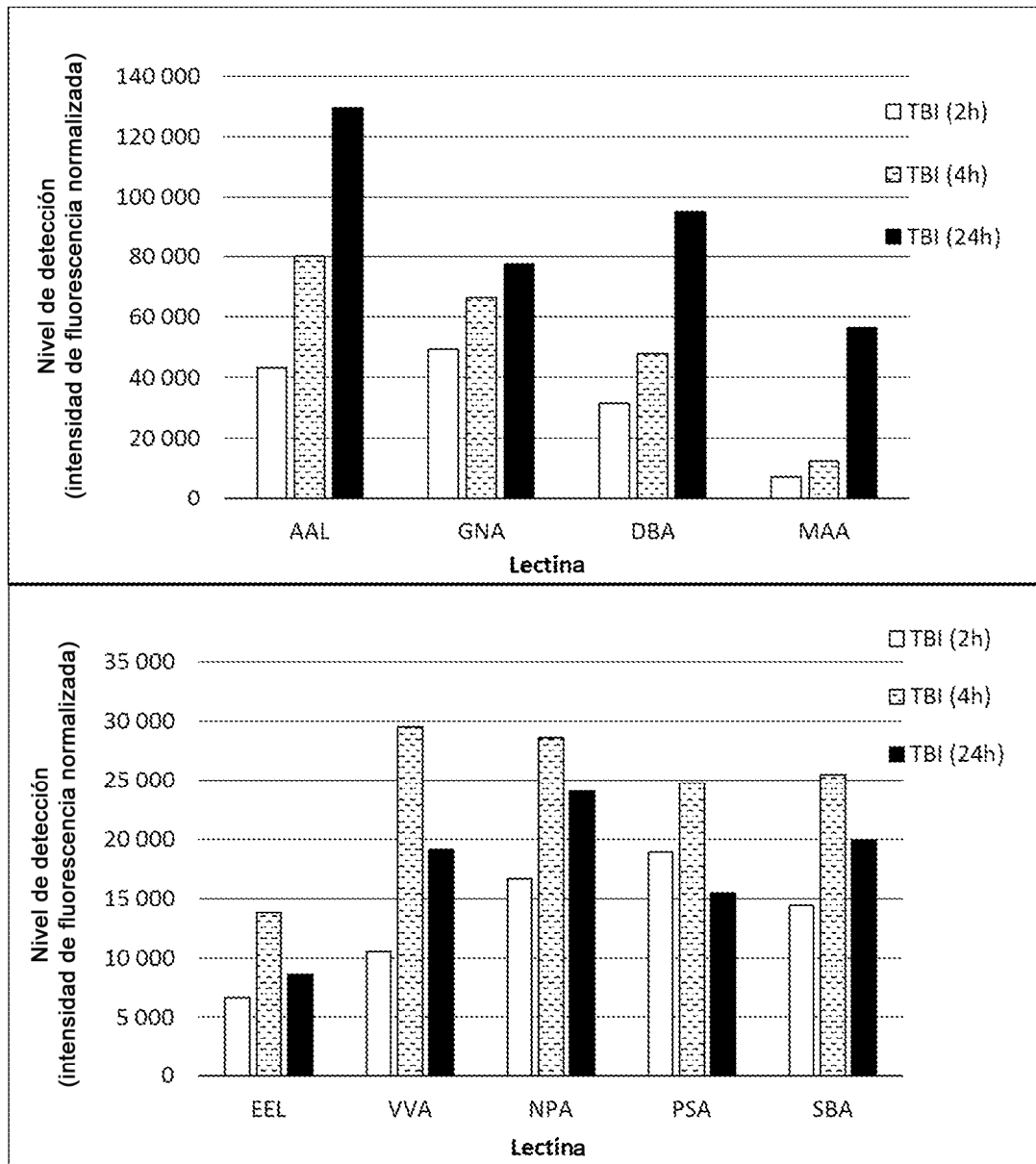


Figura 3