



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019028254-8 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 8 2 5 4 A 2 *

(22) Data do Depósito: 07/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA AJUDAR NO DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE UM PACIENTE QUE SOFREU UMA LESÃO ORTOPÉDICA E QUE SOFREU OU PODE TER SOFRIDO UMA LESÃO NA CABEÇA, TAL COMO UMA LESÃO CEREBRAL TRAUMÁTICA (LCT) LEVE, USANDO A PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP) E/OU A HIDROLASE CARBÓXI-TERMINAL DA UBIQUITINA L1 (UCH-L1)

(51) Int. Cl.: G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 04/04/2018 US 62/652,734; 09/12/2017 US 62/596,805; 29/12/2017 US 62/611,707.

(71) Depositante(es): ABBOTT LABORATORIES.

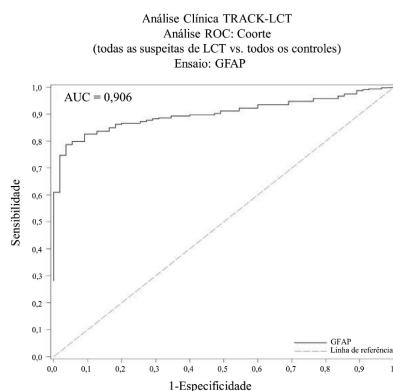
(72) Inventor(es): BETH MCQUISTON; SAUL DATWYLER; RAJ CHANDRAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018064587 de 07/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/113525 de 13/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 30/12/2019

(57) Resumo: São revelados neste documento métodos, e kits para uso nos referidos métodos, que ajudam no diagnóstico e na avaliação de um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, tal como uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, usando a hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1), a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ou uma combinação dessas. Também são revelados neste documento métodos, e kits para uso nos referidos métodos, que ajudam a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça se beneficiaria de um procedimento de imagiologia, tal como IRM ou varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça, e, portanto, deve recebê-lo com base nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1. Esses métodos envolvem detectar níveis e mudanças nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras biológicas coletadas de um paciente em pontos no tempo dentro de 48 horas após o paciente sofrer ou poder ter sofrido uma lesão na cabeça.



"MÉTODOS PARA AJUDAR NO DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE UM PACIENTE QUE SOFREU UMA LESÃO ORTOPÉDICA E QUE SOFREU OU PODE TER SOFRIDO UMA LESÃO NA CABEÇA, TAL COMO UMA LESÃO CEREBRAL TRAUMÁTICA (LCT) LEVE, USANDO A PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP) E/OU A HIDROLASE CARBÓXI-TERMINAL DA UBIQUITINA L1 (UCH-L1)"

INFORMAÇÕES SOBRE PEDIDOS RELACIONADOS

[001]O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente dos EUA nº 62/596.805, depositado no dia 9 de dezembro de 2017, ao Pedido de Patente dos EUA nº 62/611.707, depositado no dia 29 de dezembro de 2017 e ao Pedido de Patente dos EUA nº 62/652.734, depositado no dia 4 de abril de 2018, cujos conteúdos de cada um incorporam-se ao presente documento por referência.

CAMPO TÉCNICO

[002]A presente revelação refere-se a métodos para ajudar no diagnóstico e na avaliação de um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, tal como uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, ao detectar mudanças nos níveis de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ou uma combinação desses, em amostras coletadas do paciente em pontos no tempo dentro de 48 horas após o paciente sofrer uma lesão ortopédica. A presente revelação também se refere a um método para ajudar no diagnóstico e na avaliação de um paciente que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, tal como uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, ao detectar mudanças nos níveis de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ou uma combinação desses, em amostras coletadas de um paciente em pontos no tempo dentro de 48 horas após o paciente sofrer ou poder ter sofrido uma lesão ortopédica.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003]Mais de 5 milhões de lesões cerebrais traumáticas (LCTs) leves ocorrem todos os anos só nos Estados Unidos. Atualmente, não existe uma medida simples, objetiva e precisa disponível para ajudar na avaliação dos pacientes. Na verdade, grande parte da avaliação e diagnóstico das LCTs baseia-se em dados subjetivos. Infelizmente, medidas objetivas, tais como TC e Escore de Coma de Glasgow (GCS), não são muito abrangentes ou sensíveis para avaliar uma LCT leve. Ademais, a TC de cabeça não é reveladora na vasta maioria das vezes em caso de uma LCT leve, é cara e expõe o paciente a radiação desnecessária. Em aditamento, uma TC de cabeça negativa não significa que descartou-se uma concussão no paciente; na verdade ela só significa que certas intervenções, tais como cirurgia, são injustificadas. Pacientes que sofreram uma lesão traumática, tal como uma lesão ortopédica, também podem ter sofrido uma LCT. Os médicos e pacientes precisam de informações objetivas e confiáveis para avaliar com precisão essa condição a fim de promover a triagem e recuperação apropriadas. Até hoje, dados limitados são disponibilizados para o uso de biomarcadores precoces no ambiente de atendimento agudo para ajudar na avaliação e administração do paciente.

[004]A LCT leve ou concussão é difícil de detectar de maneira objetiva e representa um desafio diário nas unidades de tratamento de emergência em todo o mundo. Frequentemente, a concussão não causa patologia flagrante, tal como hemorragia, nem nenhuma anomalia em varreduras por tomografia computadorizada convencionais do cérebro, mas, em vez disso, uma disfunção neuronal de princípio rápido que desaparece de maneira espontânea de alguns dias a algumas semanas. Cerca de 15% dos pacientes com LCT leve sofrem de disfunção cognitiva persistente. Existe uma necessidade ainda não satisfeita para que pacientes ortopédicos e vítimas de LCT leve sejam avaliados quanto à sua condição de LCT no local, em salas e clínicas de emergência, no hospital, na quadra esportiva e em atividades militares (por exemplo, combate).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005]Em um aspecto, a presente revelação refere-se a métodos para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente (tal como um ser humano) que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT). O método compreende as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

(a) determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL; ou

(b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, e quando o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e uma LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT. Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente pode ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base em um escore na Escala de Coma de Glasgow que foi obtido previamente. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente, um escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser calculado pouco após o paciente

chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se o paciente tem uma LCT. Esse escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser obtido antes de realizar o ensaio para confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, um ou mais escores na Escala de Coma de Glasgow subsequentes podem ser obtidos com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes da realização do ensaio.

[006]Na verdade, em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em outras modalidades, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[007]Em algumas modalidades, o método descrito acima envolve diagnosticar um paciente com uma lesão ortopédica como tendo ou sofrendo de uma LCT. Em outras modalidades, o método descrito acima envolve diagnosticar um paciente com uma lesão ortopédica como não tendo ou sofrendo de uma LCT.

[008]Em algumas modalidades do método descrito acima, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 é:

(a) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

(b) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 97% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%;

(c) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% a cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 35% a cerca de 100%;

(d) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% a cerca de 90% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%;

(e) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;

(f) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 90%;

(g) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 100%;

(h) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%;

(i) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; ou

(j) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[009]Em algumas modalidades do método descrito acima, a amostra é (a) coletada entre cerca de 0 a 4 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (b) coletada entre cerca de 4 a 8 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (c) coletada entre cerca de 8 horas a 12 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (d)

coletada entre cerca de 12 horas a 16 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (e) coletada entre cerca de 16 horas a 20 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; ou (f) coletada entre cerca de 20 horas a 24 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%.

[010]Em algumas modalidades do método descrito acima, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 40 pg/mL, ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL. Em ainda outras modalidades, o nível de referência de GFAP é de cerca de 5 pg/mL, cerca de 10 pg/mL, ou cerca de 11 pg/mL.

[011]Em algumas modalidades do método descrito acima, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL, entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 280 pg/mL, entre cerca de 105 pg/mL e cerca de 116 pg/mL, entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 520 pg/mL, ou entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 365 pg/mL. Em ainda outras modalidades, o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 105 pg/mL, cerca de 106 pg/mL, ou cerca de 225 pg/mL.

[012]Em outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL.

[013]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 é:

- (a) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;
- (b) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;
- (c) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 97% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%;
- (d) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;
- (e) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 35%;
- (f) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 30% e uma especificidade de ao menos cerca de 92%;
- (g) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;
- (h) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 90%;
- (i) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 100%;
- (j) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 81% e uma especificidade de ao menos cerca de 94%;
- (k) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 82%; ou

(I) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[014]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL. Em ainda por cima outras modalidades, o nível de referência de GFAP é de cerca de 10 pg/mL, cerca de 45 pg/mL, ou cerca de 72 pg/mL.

[015]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 290 pg/mL, entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 270 pg/mL, ou entre cerca de 270 pg/mL e cerca de 290 pg/mL. Em ainda por cima outras modalidades, o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 247 pg/mL, cerca de 269 pg/mL, ou cerca de 289 pg/mL.

[016]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, medir o nível de GFAP na amostra compreende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

[017]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, medir o nível de UCH-L1 na amostra compreende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

[018]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o método compreende ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[019]Em ainda outra modalidade, o método descrito acima compreende ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática (tal como, por exemplo, cirurgia e/ou

administração de um ou mais fármacos). Como opção, o paciente pode ser monitorado após receber o tratamento.

[020]Em ainda outra modalidade, o método descrito acima comprehende ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT (nesses casos, o paciente pode não estar recebendo nenhum tratamento). Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que comprehende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[021]Em outro aspecto, a presente revelação refere-se a um método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente (tal como um ser humano) que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT). O método comprehende realizar as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

(a) determinar que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL; ou

(b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 entre 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e uma LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT.

[022]Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente pode ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base em um escore na Escala de Coma de Glasgow que foi obtido previamente. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente, um escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser calculado pouco após o paciente chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se o paciente tem uma LCT. Esse escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser obtido antes de realizar o ensaio para confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, um ou mais escores na Escala de Coma de Glasgow subsequentes podem ser obtidos com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes da realização do ensaio.

[023]Em algumas modalidades, suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em outras modalidades, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[024]Em algumas modalidades, o método descrito acima envolve diagnosticar um paciente com uma lesão ortopédica como tendo ou sofrendo de uma LCT. Em outras modalidades, o método descrito acima envolve diagnosticar um paciente com uma lesão ortopédica como não tendo ou sofrendo de uma LCT.

[025]Em algumas modalidades, o método descrito acima determina que o paciente necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou determina que o paciente não necessita de avaliação médica adicional quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. Em ainda outra modalidade, a avaliação médica adicional envolve varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça e avaliação da Escala de Coma de Glasgow. Em ainda outras modalidades, suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base na varredura por TC ou na avaliação da Escala de Coma de Glasgow.

[026]Em outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 são:

- (a) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;
- (b) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e ao menos cerca de 95% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e ao menos cerca de 98%;
- (c) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;
- (d) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 90% e uma especificidade de ao menos cerca de 50%; ou
- (e) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 98%.

[027]Em algumas modalidades, no método descrito acima,

(a) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(b) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 20 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 230 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(c) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 195 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(d) coleta-se a amostra dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 275 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(e) coleta-se a amostra dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 165 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(f) coleta-se a amostra dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(g) coleta-se a amostra dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL

e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(h) coleta-se a amostra dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 1.230 pg/mL; ou

(i) coleta-se a amostra dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 315 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[028]Em ainda outra modalidade do método descrito acima,

(a) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL;

(b) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL;

(c) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL;

(d) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL; ou

(e) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL.

[029]Em outra modalidade do método descrito acima, medir o nível de GFAP na amostra compreende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

[030]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, medir o nível de UCH-L1 na amostra compreende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de

captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

[031]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o método compreende ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[032]Em outra modalidade, o método descrito acima envolve ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática e, como opção, monitorar o paciente após o tratamento (tal como, por exemplo, cirurgia e/ou administração de um ou mais fármacos). Em ainda outra modalidade, o método descrito acima compreende ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT (tal como no caso em que o paciente não recebe nenhum tipo de tratamento). Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que compreende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[033]Em outro aspecto, a presente revelação refere-se a um método para ajudar na determinação ou a determinar se deve-se realizar uma varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça em um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e também pode ter sofrido uma lesão na cabeça. O método compreende:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

(a) determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL ou o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL; ou

(b) determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, não necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 40 pg/mL a cerca de 130 pg/mL ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 70 pg/mL a cerca de 145 pg/mL.

[034]Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois do ensaio, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT com base no resultado da varredura por TC. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base em uma varredura por TC que já foi realizada. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente (tal como, se o paciente encontra-se inconsciente), uma varredura por TC pode ser realizada pouco após o paciente chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se ele tem uma LCT. Essa varredura por TC pode ser realizada antes de realizar o ensaio para confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, uma ou mais varreduras por TC subsequentes podem ser realizadas com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido uma varredura por TC antes da realização do ensaio.

[035]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um resultado de varredura por TC negativo. Em outra modalidade, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 indicam um resultado de varredura por TC negativo.

[036]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, a amostra é obtida do paciente dentro de cerca de 4 horas a cerca de 16 horas após a lesão real ou suspeita de lesão.

[037]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP é de cerca de 255 pg/mL, em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 95% e uma especificidade igual ou superior a 77%.

[038]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP é de cerca de 264 pg/mL, em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 77%.

[039]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP é de cerca de 125 pg/mL, em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 45%.

[040]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 745 pg/mL, em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 66% e uma especificidade igual ou superior a 95%.

[041]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 102 pg/mL, em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 39%. Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que comprehende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma

GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[042]Em ainda outro aspecto, a presente revelação refere-se a um método para ajudar no diagnóstico de se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça possui uma lesão cerebral traumática (LCT) moderada a grave. O método compreende as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão real ou suspeita de lesão para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

(a) determinar que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL; ou

(b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL.

[043]Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente pode ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base em um escore na Escala de Coma de Glasgow que foi obtido previamente. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente, um escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser calculado pouco após o paciente chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se o paciente tem uma LCT. Esse escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser obtido antes de realizar o ensaio para

confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, um ou mais escores na Escala de Coma de Glasgow subsequentes podem ser obtidos com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes da realização do ensaio.

[044]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada a grave com base em um escore GCS inferior ou igual a 12. Em outra modalidade, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 indicam que o paciente possui uma LCT moderada a grave.

[045]Em algumas modalidades, o nível de referência para determinar se um paciente sofreu uma LCT moderada a grave usado no método acima é:

- a. de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL para UCH-L1;
- b. de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL para UCH-L1;
- c. de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para UCH-L1;
- d. de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.360 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 880 pg/mL para UCH-L1;
- e. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL para UCH-L1;
- f. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.900 pg/mL para UCH-L1;

g. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.800 pg/mL para UCH-L1;

h. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.700 pg/mL para UCH-L1;

i. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.600 pg/mL para UCH-L1;

j. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL;

k. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.400 pg/mL para UCH-L1;

l. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.300 pg/mL para UCH-L1;

m. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.200 pg/mL para UCH-L1; ou

n. de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.100 pg/mL para UCH-L1.

[046]Em algumas modalidades, o nível de referência para determinar que um paciente não sofreu uma LCT moderada a grave no método acima é:

de cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 110 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 110 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 125 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 125 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 130 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 130 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 150 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 160 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 170 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 145 pg/mL para GFAP ou de cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 170 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 160 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 165 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 155 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 150 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 195 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 190 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1;
ou

de cerca de 185 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1;
ou

de cerca de 180 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1.

[047]Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a métodos para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT). O método compreende as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e/ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e/ou

determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 associam-se a um paciente com uma LCT.

[048]Em outra modalidade do método descrito acima, o paciente pode ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha

uma lesão cerebral traumática com base em um escore na Escala de Coma de Glasgow que foi obtido previamente. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente, um escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser calculado pouco após o paciente chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se o paciente tem uma LCT. Esse escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser obtido antes de realizar o ensaio para confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, um ou mais escores na Escala de Coma de Glasgow subsequentes podem ser obtidos com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes da realização do ensaio.

[049]Na verdade, em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em outras modalidades, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[050]Em algumas modalidades, o método descrito acima envolve diagnosticar um paciente com uma lesão ortopédica como tendo ou sofrendo de uma LCT. Em outras modalidades, o método descrito acima envolve diagnosticar um paciente com uma lesão ortopédica como não tendo ou sofrendo de uma LCT.

[051]Em algumas modalidades do método descrito acima, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 é:

(a) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

(b) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 97% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%;

(c) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 35% e cerca de 100%;

(d) determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%;

(e) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;

(f) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 90%;

(g) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 100%;

(h) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%;

(i) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; ou

(j) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[052]Em algumas modalidades do método descrito acima, a amostra é (a) coletada entre cerca de 0 a 4 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (b) coletada entre cerca de 4 a 8 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao

menos cerca de 35%; (c) coletada entre cerca de 8 horas a 12 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (d) coletada entre cerca de 12 horas a 16 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (e) coletada entre cerca de 16 horas a 20 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; ou (f) coletada entre cerca de 20 horas a 24 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%.

[053]Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP:

(a) entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 40 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL;

(b) entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL ou entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 45 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 60 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 300 pg/mL ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL;

(c) entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL; ou

(d) de cerca de 5 pg/mL, de cerca de 10 pg/mL, de cerca de 11 pg/mL; de cerca de 45 pg/mL ou de cerca de 72 pg/mL.

[054]Em outras modalidades do método descrito acima, o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1:

- (a) entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL;
- (b) entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL, entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 280 pg/mL, entre cerca de 105 pg/mL e cerca de 116 pg/mL, entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 520 pg/mL ou entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 365 pg/mL;
- (c) entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 950 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou entre cerca de 970 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;
- (d) entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 290 pg/mL, entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 270 pg/mL ou entre cerca de 270 pg/mL e cerca de 290 pg/mL; ou
- (e) de cerca de 105 pg/mL, de cerca de 106 pg/mL, de cerca de 225 pg/mL, de cerca de 247 pg/mL, de cerca de 269 pg/mL ou de cerca de 290 pg/mL.

[055]Em ainda outras modalidades do método descrito acima:

- (a) o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL; ou
- (b) o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL.

[056]Em ainda outras modalidades do método descrito acima:

(a) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(b) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 20 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 230 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(c) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 195 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(d) coleta-se a amostra dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 275 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(e) coleta-se a amostra dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 165 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(f) coleta-se a amostra dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(g) coleta-se a amostra dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL

e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(h) coleta-se a amostra dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 1.230 pg/mL; ou

(i) coleta-se a amostra dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 315 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[057]Em ainda outras modalidades do método descrito acima:

(a) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL;

(b) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL;

(c) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL;

(d) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL; ou

(e) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL.

[058]Em outra modalidade do método descrito acima, medir o nível de GFAP na amostra compreende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

(a) medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

[059]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, medir o nível de UCH-L1 na amostra compreende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de

captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

[060]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o método compreende ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[061]Em outra modalidade, o método descrito acima envolve ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática e, como opção, monitorar o paciente após o tratamento (tal como, por exemplo, cirurgia e/ou administração de um ou mais fármacos). Em ainda outra modalidade, o método descrito acima compreende ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT (tal como no caso em que o paciente não recebe nenhum tipo de tratamento).

[062]Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que compreende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[063]Em outra modalidade, a presente revelação refere-se a métodos para ajudar na determinação ou a determinar se deve-se realizar uma varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça em um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e também pode ter sofrido uma lesão na cabeça. O método envolve as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e/ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL.

[064]Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois do ensaio, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT com base no resultado da varredura por TC. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base em uma varredura por TC que já foi realizada. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente (tal como, se o paciente encontra-se inconsciente), uma varredura por TC pode ser realizada pouco após o paciente chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se ele tem uma LCT. Essa varredura por TC pode ser realizada antes de realizar o ensaio para confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, uma ou mais varreduras por TC subsequentes podem ser realizadas com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido uma varredura por TC antes da realização do ensaio.

[065]Em algumas modalidades do método acima, a amostra é obtida do paciente dentro de cerca de 4 horas a cerca de 16 horas após a lesão real ou suspeita de lesão.

[066]Em ainda outras modalidades do método descrito acima, o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, entre cerca de 600 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre cerca de 600 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, entre cerca de 700 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, ou entre cerca de 700 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL.

[067]Em ainda outras modalidades do método descrito acima, o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 810 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 750 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 810 pg/mL, entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 750 pg/mL, ou entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 700 pg/mL.

[068]Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que compreende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[069]Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um método para ajudar no diagnóstico de se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) moderada a grave. O método compreende as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o nível de hidrolase carbóxi-

terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) ou uma combinação de GFAP e UCH-L1 na amostra; e

(a) determinar que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL; ou

(b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando (i) o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de cerca de 215 pg/mL.

[070]Em algumas modalidades do método descrito acima, o paciente pode ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio. Em algumas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base em um escore na Escala de Coma de Glasgow que foi obtido previamente. Por exemplo, dependendo da condição médica do paciente, um escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser calculado pouco após o paciente chegar à unidade de emergência, centro traumático ou outro local a fim de estimar e/ou avaliar se o paciente tem uma LCT. Esse escore na Escala de Coma de Glasgow pode ser obtido antes de realizar o ensaio para confirmar e determinar se o paciente tem ou não uma LCT leve ou moderada ou grave. Após realizar o ensaio, um ou mais escores na Escala de Coma de Glasgow

subsequentes podem ser obtidos com base nos resultados do ensaio como parte da supervisão do médico (ou de outro profissional de saúde) para a LCT (tal como, por exemplo, para determinar se uma intervenção cirúrgica e/ou farmacológica se faz necessária). Em outras modalidades, o paciente pode não ter recebido um escore na Escala de Coma de Glasgow antes da realização do ensaio.

[071]Em ainda outra modalidade do método descrito acima, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada a grave com base em um escore GCS inferior ou igual a 12. Em outra modalidade, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 indicam que o paciente possui uma LCT moderada a grave.

[072]Em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.300 pg/mL, ou de cerca de 1.500 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL.

[073]Em ainda outras modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de cerca de 220 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 950 pg/mL, de cerca de 970 pg/mL a cerca de 2.100 pg/mL, ou de cerca de 2.300 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL.

[074]Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que compreende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[075]Em qualquer um dos métodos descritos acima, a amostra pode ser selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

Em algumas modalidades, a amostra é uma amostra de sangue total. Em algumas modalidades, a amostra é uma amostra de plasma. Em ainda outras modalidades, a amostra é uma amostra de soro. Em ainda outras modalidades, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente. Em ainda outras modalidades, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por tremores físicos. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por uma ou mais quedas. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica decorrente de uma explosão ou detonação.

[076]Em qualquer um dos métodos descritos acima, o ensaio é um imunoensaio. Em algumas modalidades, o ensaio é um ensaio no ponto de atendimento. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio químico clínico. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio de detecção de molécula única. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um imunoensaio, o paciente é um ser humano e a amostra é do sangue total. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio no ponto de atendimento, o paciente é um ser humano e a amostra é do sangue total. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio químico clínico e a amostra é do sangue total. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio de detecção de molécula única e a amostra é do sangue total. Em ainda outras

modalidades, o ensaio é um imunoensaio, o paciente é um ser humano e a amostra é do soro. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio no ponto de atendimento, o paciente é um ser humano e a amostra é do soro. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio químico clínico e a amostra é do soro. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio de detecção de molécula única e a amostra é do soro. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um imunoensaio, o paciente é um ser humano e a amostra é do plasma. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio no ponto de atendimento, o paciente é um ser humano e a amostra é do plasma. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio químico clínico e a amostra é do plasma. Em ainda outras modalidades, o ensaio é um ensaio de detecção de molécula única e a amostra é do plasma.

[077]Em ainda outra modalidade, a presente revelação refere-se a um *kit* que comprehende ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método descrito acima, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[078]A FIG. 1A ilustra uma análise característica operacional do receptor (ROC) dos níveis de GFAP em todas as amostras com LCT em comparação aos níveis de GFAP em todas as amostras controle. A FIG. 1B ilustra uma análise ROC dos níveis de UCH-L1 em todas as amostras com LCT em comparação aos níveis de UCH-L1 em todas as amostras controle.

[079]A FIG. 2A ilustra uma análise ROC dos níveis de GFAP em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de GFAP em amostras controle ortopédicas. A FIG. 2B ilustra uma análise ROC dos níveis de UCH-L1 em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de UCH-L1 em amostras controle ortopédicas.

[080]A FIG. 3A ilustra uma análise ROC dos níveis de GFAP em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de GFAP em amostras controle saudáveis. A FIG. 3B ilustra uma análise ROC dos níveis de UCH-L1 em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de UCH-L1 em amostras controle saudáveis.

[081]A FIG. 4 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em amostras coletadas de pacientes com suspeita de LCT em comparação a amostras coletadas de pacientes com uma lesão ortopédica.

[082]A FIG. 5 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em amostras coletadas dentro de cerca de 0 a 4 horas da lesão ou suspeita de lesão de pacientes com suspeita de LCT em comparação a amostras coletadas de pacientes sem lesão (saudáveis).

[083]A FIG. 6 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com LCT com base em um resultado de varredura por TC (TC positiva) e pacientes controle ortopédicos (TC negativa).

[084]A FIG. 7 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes com um escore GCS atribuído; os pacientes com um escore GCS atribuído ≤ 12 provaram-se positivos (LCT moderada ou grave) e os pacientes com um escore GCS atribuído $12 >$ provaram-se negativos (LCT leve e controles ortopédicos).

[085]A FIG. 8 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com LCT com base em um resultado de IRM (IRM positiva) e pacientes controle ortopédicos (IRM negativa).

[086]A FIG. 9 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com LCT com base no escore GOSE (1 = LCT/óbito) e pacientes ortopédicos saudáveis (8 = saudável/recuperado).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[087]A presente revelação refere-se a métodos que ajudam na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve (LCTI), com base nos níveis de UCH-L1, GFAP, ou uma combinação desses. Esses métodos envolvem medir os níveis de UCH-L1, GFAP, ou uma combinação desses, em uma ou mais amostras coletadas do paciente em um ponto no tempo dentro de cerca de 48 horas, por exemplo, dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), desde a lesão ortopédica. A medição de níveis de GFAP e/ou UCH-L1, fragmentos dessas, ou combinações desses, iguais ou superiores aos níveis de referência de GFAP e/ou UCH-L1 serve de auxílio na determinação ou para determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma LCT, tal como uma LCT leve ou uma LCT moderada a grave, e/ou se necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça (por exemplo, imagiologia por CT e/ou IRM). Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano.

[088]Para surpresa geral e inesperadamente, os inventores da presente revelação descobriram que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, podem ser usados e são proveitosos para distinguir pacientes com LCT leve negativa na TC de pacientes com traumatismo ortopédico. Essa descoberta é contrária ao que foi descrito na técnica anterior, quando os níveis de GFAP e UCH-L1 não distinguiam entre pacientes com LCT leve negativa na TC e pacientes com traumatismo ortopédico. Essas descobertas fazem crer que pacientes com

traumatismo ortopédico e altos níveis de UCH-L1 ou GFAP poderiam ser falsamente diagnosticados como sofrendo de uma LCT leve concomitante, predispondo-os a diagnósticos injustificados e imagiologia do cérebro sem necessidade. Em contrapartida, os métodos e ensaios da presente revelação podem ser usados na avaliação de uma LCT em pacientes ortopédicos, tais como, por exemplo, a necessidade de imagiologia (TC e/ou IRM) e identificação da gravidade da lesão.

[089]A presente revelação também se refere a métodos que ajudam na determinação ou a determinar se um paciente humano sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, com base nos níveis de UCH-L1, GFAP, ou uma combinação desses. Esses métodos envolvem medir os níveis de UCH-L1, GFAP, ou uma combinação desses, em uma ou mais amostras coletadas do paciente humano em um ponto no tempo dentro de cerca de 48 horas, por exemplo, dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), desde a lesão na cabeça ou suspeita de lesão na cabeça. A medição de níveis de GFAP e/ou UCH-L1, fragmentos dessas, ou combinações desses, iguais ou superiores aos níveis de referência de GFAP e/ou UCH-L1 serve de auxílio na determinação ou para determinar se um paciente humano sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve ou LCT moderada a grave.

[090]Os títulos das seções, conforme usados nesta seção e em toda a revelação neste documento, são meramente para fins de organização e não tencionam-se que sejam exaustivos.

1. DEFINIÇÕES

[091]Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado comumente entendido pelos versados na técnica. Em caso de conflito, o presente documento, incluindo suas definições, prevalecerá. Métodos e materiais preferidos são descritos abaixo, embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste

documento possam ser usados na prática ou teste da presente revelação. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionados incorporam-se ao presente documento por referência na íntegra. Os materiais, métodos e exemplos revelados neste documento são meramente ilustrativos e não visam a ser exaustivos.

[092]Os verbos "compreender", "incluir", "possuir", "ter", "poder", "conter" e suas variações, conforme usados neste documento, devem ser interpretados como sintagmas, termos ou palavras transicionais abertos que não impedem a possibilidade de ações ou estruturas adicionais. As formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem flexões no plural, salvo quando o contexto ditar claramente o contrário. A presente revelação também contempla outras modalidades "compreendendo", "compostas por" e "compostas essencialmente por" modalidades ou elementos apresentados neste documento, sejam eles mencionados explicitamente ou não.

[093]Quanto à citação de faixas numéricas neste documento, contempla-se explicitamente cada número interposto com o mesmo grau de precisão. Por exemplo, no caso da faixa de 6 a 9, os números 7 e 8 são contemplados além de 6 e 9 e, no caso da faixa de 6,0 a 7,0, os números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 e 7,0 são explicitamente contemplados.

[094]O termo "anticorpo de afinidade maturada" é usado neste documento em alusão a um anticorpo com uma ou mais alterações em uma ou mais CDRs que resultam em melhora na afinidade (isto é, K_D , k_d ou k_a) do anticorpo por um antígeno alvo em comparação ao anticorpo-pai, que não possui as uma ou mais alterações. Anticorpos de afinidade maturada exemplificativos terão afinidades nanomolares ou mesmo picomolares pelo antígeno alvo. Uma variedade de procedimentos para produzir anticorpos de afinidade maturada é conhecida na técnica, incluindo a triagem de uma biblioteca combinatória de anticorpos que foi preparada usando

biodisplay. Por exemplo, Marks *et al.*, *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992), descrevem a maturação da afinidade por embaralhamento dos domínios VH e VL. A mutagênese aleatória de CDRs e/ou resíduos de *framework* é descrita por Barbas *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). A mutação seletiva em posições de mutagênese selecionadas e em posições de contato ou hipermutação com um resíduo de aminoácido intensificador de atividade é descrita na Patente dos EUA nº 6.914.128 B1.

[095]"Anticorpo" e "anticorpos", conforme usados neste documento, referem-se a anticorpos monoclonais, anticorpos monoespecíficos (por exemplo, que podem ser monoclonais, ou que também podem ser produzidos por outros meios em vez de produzi-los a partir de uma célula germinativa em comum), anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados (total ou parcialmente), anticorpos de animais tais como, entre outros, de uma ave (por exemplo, um pato ou um ganso), um tubarão, uma baleia e um mamífero, incluindo um mamífero não primata (por exemplo, um boi, um porco, um camelo, um lhama, um cavalo, um bode, um coelho, um carneiro, um *hamster*, um preá, um gato, um cão, um rato, um camundongo etc.) ou um primata não humano (por exemplo, um macaco, um chimpanzé etc.), anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos, Fvs de cadeia única ("scFv"), anticorpos de cadeia única, anticorpos de domínio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, Fvs ligados por dissulfeto ("sdFv"), e anticorpos anti-idiotípicos ("anti-Id"), anticorpos de domínio duplo, anticorpos de domínio variável duplo (DVD) ou domínio variável triplo (TVD) (imunoglobulinas de domínio variável duplo e métodos para produzi-las são descritos em Wu, C., *et al.*, *Nature Biotechnology*, 25(11):1290-1297 (2007), e Pedido Internacional PCT WO 2001/058956, cujos conteúdos de cada um incorporam-se ao

presente documento por referência), e fragmentos de ligação com epítopo funcionalmente ativos de qualquer um dos anteriores. Em particular, anticorpos incluem moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina, a saber, moléculas que contêm um sítio de ligação com analito. As moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), ou subclasse. Para fins de simplicidade, um anticorpo contra um analito é frequentemente citado neste documento como um "anticorpo anti-analito" ou simplesmente como um "anticorpo do analito" (por exemplo, um anticorpo anti-GFAP, um anticorpo da GFAP, um anticorpo anti-UCH-L1, ou um anticorpo da UCH-L1).

[096]"Fragmento de anticorpo", conforme usado neste documento, refere-se a uma fração de um anticorpo intacto que compreende o sítio ou região variável de ligação com antígeno. A fração não inclui os domínios de cadeia pesada constantes (isto é, CH₂, CH₃ ou CH₄, dependendo do isótipo do anticorpo) da região Fc do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, entre outros, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, diacorpos, moléculas de Fv de cadeia única (scFv), polipeptídeos de cadeia única contendo apenas um domínio variável de cadeia leve, polipeptídeos de cadeia única contendo as três CDRs do domínio variável de cadeia leve, polipeptídeos de cadeia única contendo apenas uma região variável de cadeia pesada, e polipeptídeos de cadeia simples contendo as três CDRs da região variável de cadeia pesada.

[097]A "área sob a curva" ou "AUC" refere-se à área sob uma curva de ROC. A AUC sob uma curva de ROC é uma medida de precisão. Uma AUC igual a 1 representa um teste perfeito, ao passo que uma AUC igual a 0,5 representa um teste insignificante. Uma AUC preferida pode ser de ao menos cerca de 0,700, ao menos

cerca de 0,750, ao menos cerca de 0,800, ao menos cerca de 0,850, ao menos cerca de 0,900, ao menos cerca de 0,910, ao menos cerca de 0,920, ao menos cerca de 0,930, ao menos cerca de 0,940, ao menos cerca de 0,950, ao menos cerca de 0,960, ao menos cerca de 0,970, ao menos cerca de 0,980, ao menos cerca de 0,990, ou ao menos cerca de 0,995.

[098]"Conta" e "partícula" são usados neste documento de maneira intercambiável e referem-se a um suporte sólido substancialmente esférico. Um exemplo de uma conta ou partícula é uma micropartícula. Micropartículas que podem ser usadas neste documento podem ser de qualquer tipo conhecido na técnica. Por exemplo, a conta ou partícula podem ser uma conta magnética ou partícula magnética. Contas/partículas magnéticas podem ser ferromagnéticas, ferrimagnéticas, paramagnéticas, superparamagnéticas ou ferrofluídicas. Exemplos de Materiais ferromagnéticos incluem Fe, Co, Ni, Gd, Dy, CrO₂, MnAs, MnBi, EuO e NiO/Fe. Exemplos de materiais ferrimagnéticos incluem NiFe₂O₄, CoFe₂O₄, Fe₃O₄ (ou FeO·Fe₂O₃). As contas podem ter uma parte de núcleo sólida que é magnética e circundada por uma ou mais camadas não magnéticas. Como alternativa, a parte magnética pode ser uma camada em torno de um núcleo não magnético. As micropartículas podem ser de qualquer tamanho que funcionaria nos métodos descritos neste documento, por exemplo, de cerca de 0,75 a cerca de 5 nm, ou de cerca de 1 a cerca de 5 nm, ou de cerca de 1 a cerca de 3 nm.

[099]"Proteína de ligação" é um termo usado neste documento em alusão a uma proteína monomérica ou multimérica que liga-se a um parceiro de ligação, tal como, por exemplo, um polipeptídeo, um antígeno, um composto químico ou outra molécula, ou a um substrato de qualquer tipo, e forma um complexo com ele. Uma proteína de ligação liga-se especificamente a um parceiro de ligação. Proteínas de ligação incluem anticorpos, bem como fragmentos de ligação com antígeno dos mesmos e outras várias formas e derivados dos mesmos como é de conhecimento

na técnica e descrito neste documento abaixo, e outras moléculas compreendendo um ou mais domínios de ligação com antígeno que ligam-se a uma molécula de antígeno ou a um sítio específico (epítopo) na molécula de antígeno. Logo, uma proteína de ligação inclui, entre outros, um anticorpo, uma imunoglobulina tetramérica, uma molécula de IgG, uma molécula de IgG1, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo enxertado com CDR, um anticorpo humanizado, um anticorpo de afinidade maturada, e fragmentos de quaisquer desses anticorpos que mantenham a capacidade de ligar-se a um antígeno.

[0100]"Anticorpo biespecífico" é usado neste documento em alusão a um anticorpo de comprimento total que é gerado pela tecnologia de quadromas (vide Milstein *et al.*, *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), pela conjugação química de dois anticorpos monoclonais diferentes (vide Staerz *et al.*, *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)), ou pela abordagem *knob-into-hole* ou por abordagens semelhantes, que introduzem mutações na região Fc (vide Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), resultando em várias espécies de imunoglobulina diferentes das quais só uma é o anticorpo biespecífico funcional. Um anticorpo biespecífico liga-se a um antígeno (ou epítopo) em um de seus dois braços de ligação (um par de HC/LC) e liga-se a um antígeno diferente (ou epítopo) em seu segundo braço (o outro do par HC/LC). De acordo com essa definição, um anticorpo biespecífico possui dois braços de ligação com antígeno distintos (tanto em sequências de especificidade e CDR) e é monovalente para cada antígeno ao qual se liga.

[0101]"CDR" é usado neste documento em alusão a "região determinante de complementaridade" dentro de uma sequência de anticorpo variável. Há três CDRs em cada uma das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve. Partindo do terminal N de uma cadeia pesada ou leve, essas regiões são indicadas por "CDR1", "CDR2" e "CDR3" para cada uma das regiões variáveis. O termo "conjunto de

CDRs", conforme usado neste documento, refere-se a um grupo de três CDRs que ocorrem em uma região variável simples que se liga ao antígeno. Um sítio de ligação com antígeno, portanto, pode incluir seis CDRs, compreendendo o conjunto de CDRs de cada uma das regiões variáveis de cadeia pesada e leve. Um polipeptídeo compreendendo uma única CDR (por exemplo, CDR1, CDR2 ou CDR3) pode ser chamado de "unidade de reconhecimento molecular". Análises cristalográficas de complexos antígeno-anticorpo demonstraram que os resíduos de aminoácido das CDRs formam contato extensivo com o antígeno ligado, em que o contato com antígeno mais extensivo é com a CDR3 de cadeia pesada. Sendo assim, as unidades de reconhecimento molecular podem ser as principais responsáveis pela especificidade de um sítio de ligação com antígeno. Em geral, os resíduos de CDR estão diretamente e mais substancialmente envolvidos em influenciar a ligação com o antígeno.

[0102]Os limites exatos dessas CDRs são definidos diferentemente de acordo com diferentes sistemas. O sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) e (1991)) não só proporciona um sistema de numeração de resíduos inequívoco aplicável a qualquer região variável de um anticorpo, mas também oferece limites de resíduo precisos definindo as três CDRs. Essas CDRs podem ser chamadas de "CDRs de Kabat". Chothia e colaboradores (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); e Chothia *et al.*, *Nature*, 342: 877-883 (1989)) descobriram que certas subporções dentro das CDRs de Kabat adotam conformações de *backbone* peptídico praticamente idênticas, apesar de exibirem grande diversidade no nível da sequência de aminoácidos. As subporções foram designadas "L1", "L2" e "L3" ou "H1", "H2" e "H3", onde "L" e "H" indicam as regiões de cadeia leve e cadeia pesada, respectivamente. Essas regiões podem ser chamadas de "CDRs de Chothia", que possuem limites que sobrepõem-se às CDRs

de Kabat. Outros limites definindo CDRs que sobrepõem-se às CDRs de Kabat foram descritos por Padlan, *FASEB J.*, 9: 133-139 (1995), e MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5): 732-745 (1996). Ainda outras definições de limites da CDR podem não seguir estritamente nenhum dos sistemas neste documento, mas ainda assim sobrepõem-se às CDRs de Kabat, embora possam ser encurtadas ou alongadas à luz de predição ou descobertas experimentais de que resíduos específicos ou grupos de resíduos específicos ou mesmo CDRs inteiras não impactam significativamente na ligação com o antígeno. Os métodos adotados neste documento podem utilizar CDRs definidas de acordo com qualquer um desses sistemas, embora certas modalidades utilizem as CDRs definidas por Kabat ou Chothia.

[0103]"Componente", "componentes" ou "ao menos um componente" referem-se em geral a um anticorpo de captura, um conjugado de detecção, um calibrador, um controle, um painel de sensibilidade, um recipiente, um tampão, um diluente, um sal, uma enzima, um cofator para uma enzima, um reagente de detecção, um reagente/solução de pré-tratamento, um substrato (por exemplo, como uma solução), uma solução de interrupção e seus semelhantes que podem ser incluídos em um *kit* para o ensaio de uma amostra de teste, tal como uma amostra de urina, sangue total, soro ou plasma do paciente, de acordo com os métodos descritos neste documento e outros métodos conhecidos na técnica. Alguns componentes podem ser em solução ou liofilizados para reconstrução para uso em um ensaio.

[0104]"Controles", conforme usados neste documento, referem-se em geral a um reagente cujo propósito consiste em avaliar o desempenho de um sistema de medição a fim de garantir que ele continue produzindo resultados dentro dos limites permissíveis (por exemplo, limites na faixa de medidas apropriadas para um ensaio para uso em pesquisa, de um lado, e para limites analíticos estabelecidos por

especificações de qualidade para um ensaio comercial, do outro). Para tanto, um controle deve ser indicativo dos resultados nos pacientes e, como opção, deve avaliar de alguma forma o impacto do erro na medição (por exemplo, erro devido a estabilidade do reagente, variabilidade do calibrador, variabilidade do instrumento, e seus semelhantes). Conforme usado neste documento, um "paciente controle" refere-se a um ou mais pacientes que não sofreram uma lesão cerebral traumática (LCT). Um "controle ortopédico ou controle orto", conforme usado neste documento, refere-se a (por exemplo, baseia-se em) amostras ou informações de um ou mais pacientes que sofreram uma lesão ortopédica mas não sofreram uma LCT aparente. Conforme usado neste documento, um "paciente controle ortopédico ou paciente controle orto" refere-se a um ou mais pacientes que sofreram uma lesão ortopédica mas não sofreram uma LCT aparente. Em alguns casos, "pacientes controle ortopédicos" são pacientes ortopédicos adultos com um Escore de Lesão Abreviado de ≤ 4 (sem risco de morte) para sua lesão de extremidade e/ou pelve e/ou fratura de costela. Um "controle saudável", conforme usado neste documento, refere-se a (por exemplo, baseia-se em) amostras ou informações de um ou mais pacientes considerados saudáveis e que não sofreram uma LCT ou lesão ortopédica aparente. Conforme usado neste documento, um "paciente controle saudável" refere-se a um ou mais pacientes considerados saudáveis e que não sofreram uma LCT ou lesão ortopédica aparente. Conforme usado neste documento, "controle LCT", conforme usado neste documento, refere-se a (por exemplo, baseia-se em) amostras ou informações de um ou mais pacientes que sofreram uma lesão na cabeça mas não sofreram uma LCT aparente. Conforme usado neste documento, um "paciente controle LCT" refere-se a um ou mais pacientes que sofreram uma lesão na cabeça mas não sofreram uma LCT aparente.

[0105]"Correlacionar-se", conforme usado neste documento, refere-se a "equiparar-se".

[0106]"Varredura por TC", conforme usado neste documento, refere-se a uma varredura por tomografia computadorizada (TC). Uma varredura por TC combina uma série de imagens de raio X tiradas de diferentes ângulos e utiliza processamento de computador para gerar imagens, ou cortes, transversais dos ossos, vasos sanguíneos e tecidos moles dentro do corpo. A varredura por TC pode utilizar TC por raios X, tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), tomografia axial computadorizada (varredura por TCA), ou tomografia assistida por computador. A varredura por TC pode ser uma varredura por TC convencional ou uma varredura por TC espiral/helicoidal. Em uma varredura por TC convencional, a varredura é feita corte por corte e, depois de cada corte, a varredura cessa e desce para o próximo corte, por exemplo, do topo do abdome à pelve. A varredura por TC convencional requer que os pacientes prendam a respiração para evitar artefatos de movimento. A varredura por TC espiral/helicoidal é uma varredura contínua que é tirada em espiral e é um processo muito mais rápido quando as imagens varridas são contíguas.

[0107]"Derivado" de um anticorpo, conforme usado neste documento, pode referir-se a um anticorpo que possui uma ou mais modificações em sua sequência de aminoácidos em comparação a um anticorpo genuíno ou pai e que exibe uma estrutura de domínio modificada. O derivado ainda pode ser capaz de adotar a configuração de domínio típica encontrada em anticorpos nativos, bem como uma sequência de aminoácidos, que seja capaz de ligar-se a alvos (antígenos) com especificidade. Exemplos típicos de derivados de anticorpo são anticorpos ligados a outros polipeptídeos, domínios de anticorpo organizados, ou fragmentos de anticorpos. O derivado também pode compreender ao menos um composto adicional, por exemplo, um domínio de proteína, o referido domínio de proteína sendo ligado por ligações covalentes ou não covalentes. A ligação pode basear-se na fusão genética de acordo com os métodos conhecidos na técnica. O domínio

adicional presente na proteína de fusão que compreende o anticorpo pode ser ligado de preferência por um ligante flexível, vantajosamente um ligante peptídico, em que o referido ligante peptídico compreende vários aminoácidos hidrófilos ligados por peptídeo de um comprimento suficiente para transpor a distância entre a extremidade terminal C do domínio de proteína adicional e a extremidade terminal N do anticorpo ou vice-versa. O anticorpo pode ser ligado a uma molécula efetora com uma conformação adequada para a atividade biológica ou ligação seletiva com um suporte sólido, uma substância biologicamente ativa (por exemplo, uma citocina ou hormônio de crescimento), um agente químico, um peptídeo, uma proteína, ou um fármaco, por exemplo.

[0108]"Determinado por um ensaio" é usado neste documento em alusão à determinação de (determinar) um nível de referência por meio de qualquer ensaio apropriado. A determinação de um nível de referência pode ser obtida, em algumas modalidades, por um ensaio do mesmo tipo que o ensaio que será aplicado à amostra do paciente (por exemplo, por um imunoensaio, ensaio químico clínico, ensaio de detecção de molécula única, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, análise química, análise por SDS-PAGE e *Western blot*, ou imunocoloração de proteínas, análise por eletroforese, ensaio de proteínas, ensaio de ligação competitiva, ensaio funcional de proteínas, ou métodos de cromatografia ou espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS)). A determinação de um nível de referência pode ser obtida, em algumas modalidades, por um ensaio do mesmo tipo e sob mesmas condições de ensaio que o ensaio que será aplicado à amostra do paciente. Conforme mencionado acima, a presente revelação propõe níveis de referência exemplificativos (por exemplo, calculados comparando níveis de referência em diferentes pontos no tempo). Encontra-se dentro da capacidade dos versados na técnica adaptar a revelação neste documento para outros ensaios a fim

de obter níveis de referência específicos ao ensaio para esses outros ensaios com base na descrição dada nesta revelação. Por exemplo, um conjunto de amostras de treinamento compreendendo amostras obtidas de pacientes humanos que sabidamente sofreram uma lesão na cabeça (e, mais particularmente, amostras obtidas de pacientes humanos que sabidamente sofreram uma lesão ortopédica e/ou (i) LCT leve; e/ou (ii) LCT moderada a grave) e amostras obtidas de pacientes humanos que sabidamente não sofreram uma lesão na cabeça (e, mais particularmente, amostras obtidas de pacientes humanos que sabidamente não sofreram nenhuma LCT) e/ou uma lesão ortopédica podem ser usadas para obter níveis de referência específicos ao ensaio. Perceber-se-á que um nível de referência "determinado por um ensaio" e com um nível mencionado de "sensibilidade" e/ou "especificidade" é usado neste documento em alusão a um nível de referência que foi determinado para oferecer um método da sensibilidade e/ou especificidade citadas quando o referido nível de referência for adotado nos métodos da revelação. Encontra-se dentro da capacidade dos versados na técnica determinar a sensibilidade e a especificidade associadas a dado nível de referência nos métodos da revelação, por exemplo, por repetidas análises estatísticas dos dados de ensaio usando vários níveis de referência possíveis diferentes.

[0109]"Droga" é usado neste documento em alusão a uma ou mais substâncias viciantes (tais como um fármaco) tomadas por razões não médicas (tais como, por exemplo, uso recreativo e/ou efeitos mentais). O abuso, uso ou dependência dessas drogas geralmente são chamados de "abuso de substância". Exemplos de drogas incluem álcool, barbitúricos, benzodiazepinas, cânabis, cocaína, halucinógenos (tais como cetamina, mescalina (peyote), PCP, psilocibina, DMT e/ou LSD), metaqualona, opioides, anfetaminas (incluindo metanfetaminas), esteroides anabólicos, inalantes (a saber, substâncias contendo substâncias voláteis

que contêm propriedades psicoativas tais como, por exemplo, nitritos, tintas de spray, fluidos de limpeza, marcadores, colas etc.) e combinações desses.

[0110]"Anticorpo duplo-específico" é usado neste documento para referir-se a um anticorpo de comprimento total que pode ligar-se a dois抗ígenos diferentes (ou epítopos) em cada um de seus dois braços de ligação (um par de HC/LC) (vide a publicação PCT WO 02/02773). Logo, uma proteína de ligação duplo-específica possui dois braços de ligação com抗ígeno idênticos, com especificidade idêntica e sequências de CDR idênticas, e é bivalente para cada抗ígeno ao qual se liga.

[0111]"Domínio variável duplo" é usado neste documento para referir-se a dois ou mais sítios de ligação com抗ígeno em uma proteína de ligação, que pode ser bivalente (dois sítios de ligação com抗ígeno), tetravalente (quatro sítios de ligação com抗ígeno), ou proteínas de ligação multivalentes. Os DVDs podem ser monoespecíficos, isto é, capazes de ligar-se a um抗ígeno (ou um epítopo específico), ou multiespecíficos, isto é, capazes de ligar-se a dois ou mais抗ígenos (isto é, dois ou mais epítopos da mesma molécula de抗ígeno alvo ou dois ou mais epítopos de抗ígenos alvo diferentes). Uma proteína de ligação de DVD preferida compreende dois polipeptídeos de DVD de cadeia pesada e dois polipeptídeos de DVD de cadeia leve e é chamada de "imunoglobulina de DVD" ou "DVD-Ig". Essa proteína de ligação DVD-Ig é, portanto, tetramérica e remanescente de uma molécula de IgG, mas oferece mais sítios de ligação com抗ígeno do que uma molécula de IgG. Sendo assim, cada metade de uma molécula de DVD-Ig tetramérica é remanescente de metade de uma molécula de IgG e compreende um polipeptídeo de DVD de cadeia pesada e um polipeptídeo de DVD de cadeia leve, mas, à diferença de um par de cadeias pesada e leve de uma molécula de IgG que oferece um domínio de ligação com抗ígeno único, um par de cadeias pesada e leve de uma DVD-Ig oferece dois ou mais sítios de ligação com抗ígeno.

[0112]Cada sítio de ligação com antígeno de uma proteína de ligação DVD-Ig pode ser derivado de um anticorpo monoclonal doador ("pai") e, portanto, compreende um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VH) com um total de seis CDRs envolvidas na ligação com antígeno por sítio de ligação com antígeno. Logo, uma proteína de ligação DVD-Ig que liga-se a dois epítopos diferentes (isto é, dois epítopos diferentes de duas moléculas de antígeno diferentes ou dois epítopos diferentes da mesma molécula de antígeno) compreende um sítio de ligação com antígeno derivado de um primeiro anticorpo monoclonal pai e um sítio de ligação com antígeno de um segundo anticorpo monoclonal pai.

[0113]Uma descrição do conceito, expressão e caracterização das moléculas de ligação de DVD-Ig é dada na Publicação PCT nº WO 2007/024715, Patente dos EUA nº 7.612.181, e Wu *et al.*, *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007). Um exemplo preferido dessas moléculas de DVD-Ig compreende uma cadeia pesada que compreende a fórmula estrutural VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, em que VD1 é um primeiro domínio de variável de cadeia pesada, VD2 é um segundo domínio variável de cadeia pesada, C é um domínio constante de cadeia pesada, X1 é um ligante contanto que não seja CH1, X2 é uma região Fc, e n é 0 ou 1, mas de preferência 1; e uma cadeia leve que compreende a fórmula estrutural VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, em que VD1 é um primeiro domínio variável de cadeia leve, VD2 é um segundo domínio variável de cadeia leve, C é um domínio constante de cadeia leve, X1 é um ligante contanto que não seja CH1, e X2 não compreende uma região Fc; e n é 0 ou 1, mas de preferência 1. Esse DVD-Ig pode compreender duas dessas cadeias pesadas e duas dessas cadeias leves, em que cada cadeia compreende domínios variáveis ligados em tandem sem uma região constante entre posta entre regiões variáveis, em que uma cadeia pesada e uma cadeia leve associam-se para formar sítios de ligação com antígeno funcionais *tandem*, e um par de cadeias

pesada e leve pode associar-se a outro par de cadeias pesada e leve para formar uma proteína de ligação tetramérica com quatro sítios de ligação com antígeno funcionais. Em outro exemplo, uma molécula de DVD-Ig pode compreender cadeias pesadas e leves, cada uma das quais compreende três domínios variáveis (VD1, VD2, VD3) ligados em tandem sem uma região constante interposta entre domínios variáveis, em que um par de cadeias pesada e leve pode associar-se para formar três sítios de ligação com antígeno, e em que um par de cadeias pesada e leve pode associar-se a outro par de cadeias pesada e leve para formar uma proteína de ligação tetramérica com seis sítios de ligação com antígeno.

[0114]Em uma modalidade preferida, uma proteína de ligação DVD-Ig não só liga-se às mesmas moléculas alvo ligadas por seus anticorpos monoclonais pai, mas também possui uma ou mais propriedades desejáveis de um ou mais de seus anticorpos monoclonais pai. De preferência, essa propriedade adicional é um parâmetro de anticorpo de um ou mais dos anticorpos monoclonais pai. Parâmetros de anticorpo que podem ser passados para uma proteína de ligação DVD-Ig de um ou mais de seus anticorpos monoclonais pai incluem, entre outros, especificidade de antígeno, afinidade de antígeno, potência, função biológica, reconhecimento de epítopo, estabilidade de proteína, solubilidade de proteína, eficiência de produção, imunogenicidade, farmacocinética, biodisponibilidade, reatividade cruzada de tecido, e ligação com antígeno ortólogo.

[0115]Uma proteína de ligação DVD-Ig liga-se a ao menos um epítopo de GFAP e/ou UCH-L1. Exemplos não exaustivos de uma proteína de ligação DVD-Ig incluem uma proteína de ligação DVD-Ig que liga-se a um ou mais epítopenos de GFAP e/ou UCH-L1, uma proteína de ligação DVD-Ig que liga-se a um epítopo de uma GFAP e/ou UCH-L1 humana e/ou a um epítopo de GFAP e/ou UCH-L1 de outra espécie (por exemplo, de camundongo), e uma proteína de ligação DVD-Ig que liga-

se a um epítopo de uma GFAP e/ou UCH-L1 humana e a um epítopo de outra molécula alvo.

[0116]"Faixa dinâmica", conforme usado neste documento, refere-se à faixa na qual a leitura de um ensaio é proporcional à quantidade de molécula alvo ou analito na amostra sendo analisada.

[0117]"Epítopo" ou "epítópos" ou "epítopos de interesse" referem-se a um ou mais sítios em qualquer molécula que são reconhecidos por um ou mais sítios complementares em seu parceiro de ligação específico e podem ligar-se a eles. A molécula e parceiro de ligação específico são parte de um par de ligação específico. Por exemplo, um epítopo pode ser um polipeptídeo, uma proteína, um hapteno, um antígeno de carboidrato (tal como, entre outros, glicolipídios, glicoproteínas ou lipopolissacarídeos), ou um polissacarídeo. Seu parceiro de ligação específico pode ser, entre outros, um anticorpo.

[0118]"Fragmento de ligação com antígeno" ou "fragmento Fab", conforme usados neste documento, referem-se a um fragmento de um anticorpo que liga-se a抗ígenos e que contém um sítio de ligação com antígeno, uma cadeia leve completa e parte de uma cadeia pesada. Fab é um fragmento monovalente composto pelos domínios VL, VH, CL e CH1. Fab é composto por um domínio constante e um domínio variável de cada uma das cadeias pesada e leve. O domínio variável contém o parátopo (o sítio de ligação com antígeno), compreendendo um conjunto de regiões determinantes complementares, na extremidade de terminal amino do monômero. Cada braço de Y, portanto, liga-se a um epítopo no antígeno. Fragmentos Fab podem ser obtidos tal como foi descrito na técnica, por exemplo, usando a enzima papaína, que pode servir para clivar um monômero de imunoglobulina em dois fragmentos Fab e um fragmento Fc, ou podem ser produzidos por meios recombinantes.

[0119]"Fragmento F(ab')₂", conforme usado neste documento, refere-se a anticorpos gerados pela digestão de pepsina por anticorpos IgG totais para remover a maior parte da região Fc enquanto deixa-se intacta parte da região de dobradiça. Os fragmentos F(ab')₂ têm duas porções F(ab) de ligação com antígeno ligadas uma à outra por ligações dissulfeto, e, portanto, são bivalentes com um peso molecular de cerca de 110 kDa. Os fragmentos de anticorpo bivalentes (fragmentos F(ab')₂) são menores do que as moléculas de IgG totais e permitem uma melhor penetração no tecido, facilitando assim um melhor reconhecimento do antígeno na imunohistoquímica. O uso de fragmentos F(ab')₂ também evita a ligação não específica com um receptor de Fc em células vivas ou com uma Proteína A/G. Os fragmentos F(ab')₂ podem tanto ligar-se a抗ígenos como precipitá-los.

[0120]"Framework" (FR) ou "sequência de framework", conforme usado neste documento, podem significar as sequências remanescentes de uma região variável menos as CDRs. Como a definição exata de uma sequência de CDR pode ser determinada por diferentes sistemas (por exemplo, vide acima), o significado de uma sequência de *framework* submete-se a interpretações correspondentemente diferentes. As seis CDRs (CDR-L1, -L2 e -L3 de cadeia leve e CDR-H1, -H2 e -H3 de cadeia pesada) também dividem as regiões de *framework* na cadeia leve e na cadeia pesada em quatro sub-regiões (FR1, FR2, FR3 e FR4) em cada cadeia, sendo que a CDR1 é posicionada entre a FR1 e a FR2, a CDR2 entre a FR2 e a FR3, e a CDR3 entre a FR3 e a FR4. Sem especificar as sub-regiões específicas como FR1, FR2, FR3 ou FR4, uma região de *framework*, como é chamada por outros, representa as FRs combinadas dentro da região variável de uma cadeia de imunoglobulina de ocorrência natural única. Conforme usado neste documento, FR representa uma das quatro sub-regiões, e FRs representa duas ou mais das quatro sub-regiões que constituem uma região de *framework*.

[0121] Sequências de FR de cadeia pesada e cadeia leve humanas são conhecidas na técnica, as quais podem ser usadas como sequências de *framework* "aceitantes" de cadeia pesada e cadeia leve (ou simplesmente sequências "aceitantes") para humanizar um anticorpo não humano usando técnicas conhecidas no setor. Em uma modalidade, sequências aceitantes de cadeia pesada e cadeia leve humanas são selecionadas dentre as sequências de *framework* listadas em bancos de dados publicamente disponíveis tais como V-base (protocolo de transferência de hipertexto://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) ou no sistema de informações internacional ImMunoGeneTics® (IMGT®) (protocolo de transferência de hipertexto://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/).

[0122]"Sítio de ligação com antígeno funcional", conforme usado neste documento, pode significar um sítio em uma proteína de ligação (por exemplo, um anticorpo) que é capaz de ligar-se a um antígeno alvo. A afinidade de ligação com antígeno do sítio de ligação com antígeno pode não ser tão forte quanto a da proteína de ligação pai, por exemplo, anticorpo pai, da qual o sítio de ligação com antígeno é derivado, mas a capacidade de ligar-se ao antígeno deve ser mensurável usando qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos para avaliar uma proteína, por exemplo, anticorpo, ligando-se a um antígeno. Ademais, a afinidade de ligação com antígeno de cada um dos sítios de ligação com antígeno de uma proteína multivalente, por exemplo, anticorpo multivalente, neste documento não precisa ser quantitativamente a mesma.

[0123]"GFAP" é usado neste documento para descrever uma proteína ácida fibrilar glial. GFAP é uma proteína que é codificada pelo gene *GFAP* nos seres humanos, e que pode ser produzida (por exemplo, por meios recombinantes) em outras espécies.

[0124]"Condição da GFAP" pode significar ou o nível ou a quantidade de GFAP em um ponto no tempo (tal como com uma medida simples da GFAP), o nível

ou a quantidade de GFAP associada a monitoramento (tal como com um teste repetido em um paciente para identificar aumento ou redução na quantidade de GFAP), o nível ou a quantidade de GFAP associada ao tratamento contra lesão cerebral traumática (seja uma lesão cerebral primária e/ou uma lesão cerebral secundária), ou combinações desses.

[0125]"Escala de Coma de Glasgow" ou "GCS", conforme usados neste documento, referem-se a uma escala de 15 pontos para estimar e categorizar as consequências da lesão cerebral com base na capacidade social geral ou dependência dos outros. O teste mede a resposta motora, a resposta verbal e a resposta de abertura dos olhos com os seguintes valores: I. Resposta Motora (6 – Obedece totalmente a comandos; 5 – Localiza estímulos nocivos; 4 – Recolhe-se de estímulos nocivos; 3 – Flexão anormal, isto é, postura de decorticção; 2 – Resposta extensora, isto é, postura de descerebração; e 1 – Sem resposta); II. Resposta Verbal (5 – Alerta e Orientada; 4 – Fala confusa, porém coerente; 3 – Palavras inapropriadas e sintagmas embaralhados compostos por palavras; 2 – Sons incompreensíveis; e 1 – Sem som); e III. Abertura dos olhos (4 – Abertura espontânea dos olhos; 3 – Olhos abrem-se durante a fala; 2 – Olhos abrem-se em reação à dor; e 1 – Sem abertura dos olhos). O escore final é determinado adicionando os valores de I + II + III. O escore final pode ser categorizado em quatro níveis de sobrevivência possíveis, onde um número mais baixo indica uma lesão mais grave e um prognóstico mais desfavorável: Leve (13 a 15); Inaptidão Moderada (9 a 12) (Perda de consciência superior a 30 minutos; Disfunções físicas ou cognitivas que podem ou não desaparecer; e Benefício com a Reabilitação); Inaptidão Grave (3 a 8) (Coma: estado de inconsciência; Sem resposta significativa, sem atividade voluntária); e Estado Vegetativo (Menos de 3) (Ciclos de sono e despertar; Excitação, mas sem interação com o ambiente; Sem resposta localizada à dor). "Lesão cerebral moderada" é definida como uma lesão cerebral que resulta em

perda da consciência por 20 minutos a 6 horas e uma Escala de Coma de Glasgow de 9 a 12. "Lesão cerebral grave" é definida como uma lesão cerebral que resulta em perda da consciência por mais de 6 horas e uma Escala de Coma de Glasgow de 3 a 8.

[0126]"Escala de Resultados de Glasgow", conforme usado neste documento, refere-se a uma escala global para resultados funcionais que avalia a condição do paciente em uma de cinco categorias: Óbito, Estado Vegetativo, Inaptidão Grave, Inaptidão Moderada ou Boa Recuperação.

[0127]"Escala de Resultados de Glasgow Ampliada" ou "GOSE", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, oferecem uma categorização mais detalhada em oito categorias subdividindo as categorias de inaptidão grave, inaptidão moderada e boa recuperação em uma categoria superior e outra inferior conforme ilustra a Tabela 1.

Tabela 1

1	Óbito	D	
2	Estado vegetativo	VX	Condição de inconsciência somente com respostas de reflexo mas com períodos de abertura espontânea dos olhos.
3	Inaptidão grave inferior	SD -	Paciente dependente de apoio diário por inaptidão mental ou física, usualmente uma combinação de ambas. Se for possível deixar o paciente sozinho por mais de 8 horas em casa, trata-se do nível superior de SD, do contrário, trata-se do nível inferior de SD.
4	Inaptidão grave superior	SD +	
5	Inaptidão moderada inferior	MD -	Pacientes com alguma inaptidão tal como afasia, hemiparesia ou epilepsia e/ou déficits de memória ou personalidade mas capazes de cuidar de si próprios. Eles são independentes em casa, mas dependentes
6	Inaptidão moderada superior	MD +	

			fora. Se eles forem capazes de voltar para casa mesmo com arranjos especiais, trata-se do nível superior de MD, do contrário, trata-se do nível inferior de MD.
7	Boa recuperação inferior	GR -	Retomada da vida normal com a possibilidade de trabalhar ainda que o estado pré-lesão não tenha sido recuperado. Alguns pacientes têm déficits neurológicos ou psicológicos modestos. Se esses déficits não forem incapacitantes, trata-se do nível superior de GR, se sim trata-se do nível inferior de GR.
8	Boa recuperação superior	GR +	

[0128]"Anticorpo humanizado" é usado neste documento para descrever um anticorpo que comprehende sequências de região variável de cadeia pesada e cadeia leve de uma espécie não humana (por exemplo, de camundongo) mas em que ao menos uma parte das sequências VH e/ou VL foi alterada para ser mais "humana", isto é, mais semelhante a sequências variáveis de linhas germinativas humanas. Um "anticorpo humanizado" é um anticorpo ou uma variante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo que liga-se imunoespecificamente a um antígeno de interesse e que possui uma região de *framework* (FR) contendo substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo humano e uma região determinante de complementaridade (CDR) contendo substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo não humano. Conforme usado neste documento, o termo "substancialmente" no contexto de uma CDR refere-se a uma CDR com uma sequência de aminoácidos ao menos 80%, ao menos 85%, ao menos 90%, ao menos 95%, ao menos 98% ou ao menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de uma CDR de anticorpo não humana. Um anticorpo humanizado comprehende substancialmente todos de ao menos um domínio variável (Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv), tipicamente dois, em que todas ou praticamente todas as regiões de CDR

correspondem às de uma imunoglobulina não humana (isto é, anticorpo doador) e todas ou praticamente todas as regiões de *framework* são de uma sequência consenso da imunoglobulina humana. Em uma modalidade, um anticorpo humanizado também compreende ao menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente de uma imunoglobulina humana. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém a cadeia leve bem como ao menos o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, dobradiça, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado só contém uma região leve humanizada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado só contém uma região pesada humanizada. Em modalidades específicas, um anticorpo humanizado só contém um domínio variável humanizado de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada humanizada.

[0129]Um anticorpo humanizado pode ser selecionado dentre qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isótipo, incluindo, entre outros, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Um anticorpo humanizado pode compreender sequências de mais de uma classe ou isótipo, e domínios constantes específicos podem ser selecionados para otimizar funções efetoras desejadas usando técnicas bem conhecidas no setor.

[0130]As regiões de *framework* e CDRs de um anticorpo humanizado não precisam corresponder precisamente às sequências-mãe, por exemplo, a CDR do anticorpo doador ou o *framework* consenso podem ser mutageneizados pela substituição, introdução e/ou deleção de ao menos um resíduo de aminoácido de tal modo que a CDR ou resíduo de *framework* nesse sítio não corresponda nem ao anticorpo doador nem ao *framework* consenso. Em uma modalidade preferida, essas mutações, contudo, não serão extensivas. Usualmente, ao menos 80%, de preferência ao menos 85%, mais preferivelmente ao menos 90%, e mais preferivelmente ao menos 95% dos resíduos de anticorpo humanizado

corresponderão aos das sequências de FR e CDR pai. Conforme usado neste documento, o termo "*framework consenso*" refere-se à região de *framework* na sequência de imunoglobulina consenso. Conforme usado neste documento, o termo "sequência de imunoglobulina consenso" refere-se à sequência formada pelos aminoácidos (ou nucleotídeos) que ocorrem mais frequentemente em uma família de sequências de imunoglobulina relacionadas (vide, por exemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). Uma "sequência de imunoglobulina consenso" pode compreender, portanto, uma ou mais "regiões de framework consenso" e/ou uma ou mais "CDRs consenso". Em uma família de imunoglobulinas, cada posição na sequência consenso é ocupada pelo aminoácido que ocorre com mais frequência nessa posição na família. Se dois aminoácidos ocorrerem com a mesma frequência, qualquer um deles pode ser incluído na sequência consenso.

[0131]"Idêntica" ou "identidade", conforme usados neste documento no contexto de duas ou mais sequências de polipeptídeo ou polinucleotídeo, podem significar que as sequências têm uma porcentagem especificada de resíduos que são os mesmos ao longo de uma região especificada. A porcentagem pode ser calculada pela etapas de alinhar idealmente as duas sequências, comparar as duas sequências ao longo da região especificada, determinar o número de posições nas quais ocorre um resíduo idêntico em ambas as sequências para obter o número de posições coincidentes, dividir o número de posições coincidentes pelo número total de posições na região especificada, e multiplicar o resultado por 100 para obter a porcentagem de identidade de sequência. Nos casos em que as duas sequências são de comprimentos diferentes ou em que o alinhamento produz uma ou mais extremidades vacilantes e a região especificada de comparação inclui só uma sequência, os resíduos da sequência única são incluídos no denominador mas não no numerador do cálculo.

[0132]"Procedimento de imagiologia", conforme usado neste documento, refere-se a um teste médico que permite que o interior do corpo seja observado a fim de diagnosticar, tratar e monitorar condições de saúde. Um procedimento de imagiologia pode ser um procedimento não invasivo que permite o diagnóstico de doenças e lesões sem intrusão. Exemplos de procedimentos de imagiologia incluem IRM, varredura por TC, raios X, varredura por tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), e varredura por imagiologia por tensor de difusão (DTI).

[0133]"Lesão na cabeça" ou "lesão de cabeça", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, referem-se a qualquer traumatismo no couro cabeludo, crânio ou cérebro. Essas lesões podem incluir só um pequeno galo no crânio ou podem ser uma lesão cerebral séria. Essas lesões incluem lesões primárias ao cérebro e/ou lesões secundárias ao cérebro. Lesões cerebrais primárias ocorrem durante o trauma inicial e decorrem do deslocamento das estruturas físicas do cérebro. Mais especificamente, uma lesão cerebral primária é o dano físico à parênquima (tecido, vasos) que ocorre durante o evento traumático, resultando no cisalhamento e compressão do tecido cerebral circundante. Lesões cerebrais secundárias ocorrem subsequentemente à lesão primária e podem envolver uma série de processos celulares. Mais especificamente, uma lesão cerebral secundária refere-se às mudanças que se desenvolvem ao longo de um período de tempo (de horas a dias) após a lesão cerebral primária. Ela inclui uma cascata inteira de mudanças às células, à química, aos tecidos ou aos vasos sanguíneos no cérebro que contribuem para a destruição adicional do tecido cerebral.

[0134]Uma lesão na cabeça pode ser fechada ou aberta (penetrante). Uma lesão na cabeça fechada refere-se a um traumatismo no couro cabeludo, crânio ou cérebro onde não há penetração do crânio por um objeto perfurante. Uma lesão na

cabeça aberta refere-se a um traumatismo no couro cabeludo, crânio ou cérebro onde há penetração do crânio por um objeto perfurante. Uma lesão na cabeça pode ser causada por tremores físicos de uma pessoa, pelo impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa que resulte em um traumatismo de cabeça fechado ou aberto (por exemplo, acidente de veículo, tal como de automóvel, avião, trem etc.; golpe na cabeça tal como com um taco de beisebol, ou com uma arma de fogo), por um acidente vascular cerebral (por exemplo, derrame), por uma ou mais quedas (por exemplo, como em esportes ou outras atividades), por explosões ou detonações (coletivamente "lesões de explosão") e por outros tipos de traumatismo por força contundente. Como alternativa, uma lesão na cabeça pode ser causada pela ingestão e/ou exposição a um produto químico, toxina ou uma combinação de produto químico e toxina. Exemplos desses produtos químicos e/ou toxinas incluem incêndios, bolores, amianto, pesticidas e inseticidas, solventes orgânicos, tintas, colas, gases (tais como monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, e cianeto), metais orgânicos (tais como mercúrio metílico, chumbo tetraetila e estanho orgânico) e/ou uma ou mais drogas. Como alternativa, uma lesão na cabeça pode ser causada como resultado de um paciente sofrendo de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, um ou mais vírus, meningite, hidrocefalia, hipoxia ou quaisquer combinações desses. Em alguns casos, não é possível ter certeza de se qualquer um desses eventos ou lesões ocorreu ou aconteceu de fato. Por exemplo, pode não haver histórico sobre o paciente, o paciente pode ser incapaz de falar, o paciente pode não estar ciente de a quais eventos foi exposto etc. Essas circunstâncias são descritas neste documento como o paciente "pode ter sofrido uma lesão na cabeça". Em certas modalidades neste documento, a lesão na cabeça fechada não inclui e especificamente exclui um acidente vascular cerebral, tal como derrame.

[0135]"Polinucleotídeo isolado", conforme usado neste documento, pode significar um polinucleotídeo (por exemplo, de origem genômica, cDNA, ou de origem sintética, ou uma combinação desses), em que, em virtude de sua origem, o polinucleotídeo isolado não é associado a todo ou parte de um polinucleotídeo com o qual o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza; liga-se operacionalmente a um polinucleotídeo ao qual não se liga na natureza; ou não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

[0136]"Marcador" ou "marcador detectável", conforme usados neste documento, referem-se a um grupamento ligado a um anticorpo ou analito para tornar a reação entre o anticorpo e o analito detectável, e diz-se do anticorpo ou analito assim marcado que ele é "marcado detectavelmente". Um marcador pode produzir um sinal que é detectável por meios visuais ou instrumentais. Vários marcadores incluem substâncias produtoras de sinal, tais como cromógenos, compostos fluorescentes, compostos quimioluminescentes, compostos radioativos e seus semelhantes. Exemplos representativos de marcadores incluem grupamentos que produzem luz, por exemplo, compostos de acridínio, e grupamentos que produzem fluorescência, por exemplo, fluoresceína. Outros marcadores são descritos neste documento. Nesse contexto, o grupamento em si pode não ser detectável mas pode tornar-se detectável mediante reação com ainda outro grupamento. O uso do termo "marcado detectavelmente" visa a abranger esse tipo de marcação.

[0137]Qualquer marcador detectável adequado tal como conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, o marcador detectável pode ser um marcador radioativo (tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho e ^{153}Sm), um marcador enzimático (tal como peroxidase de raiz-forte, alcalino peroxidase, glicose 6-fosfato desidrogenase, e seus semelhantes), um marcador quimioluminescente (tal como ésteres de acridínio, tioésteres ou

sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridínio, e seus semelhantes), um marcador fluorescente (tal como fluoresceína (por exemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, e seus semelhantes)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, pontos quânticos (por exemplo, seleneto de cádmio recoberto com sulfeto de zinco), um marcador termométrico, ou um marcador de reação em cadeia da imuno-polimerase. Uma introdução a marcadores, procedimentos de marcação e detecção de marcadores é encontrada em Polak e Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2^a ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), e em Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que é um guia e catálogo combinados publicado pela Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Um marcador fluorescente pode ser usado em um imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) (vide, por exemplo, as Patentes dos EUA nº 5.593.896, 5.573.904, 5.496.925, 5.359.093 e 5.352.803, que incorporam-se ao presente documento por referência na íntegra). Um composto de acridínio pode ser usado como marcador detectável em um ensaio quimioluminescente homogêneo (vide, por exemplo, Adamczyk *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 3917-3921 (2004); e Adamczyk *et al.*, *Org. Lett.*, 5: 3779-3782 (2003)).

[0138]Em um aspecto, o composto de acridínio é uma acridínio-9-carboxamida. Métodos para preparar acridínio-9-carboxamidas são descritos em Mattingly, J., *Biolumin. Chemilumin.*, 6: 107-114 (1991); Adamczyk *et al.*, *J. Org. Chem.*, 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk *et al.*, *Tetrahedron*, 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk *et al.*, *Org. Lett.*, 1: 779-781 (1999); Adamczyk *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 11: 714-724 (2000); Mattingly *et al.*, em *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105

(2002); Adamczyk *et al.*, *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003); e Patentes dos EUA nº 5.468.646, 5.543.524 e 5.783.699 (cada um dos quais incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra por seus ensinamentos com relação ao mesmo).

[0139]Outro exemplo de um composto de acridínio é um aril éster de acridínio-9-carboxilato. Um exemplo de aril éster de acridínio-9-carboxilato de fórmula II é o fluorossulfonato de 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridínio (disponibilizado pela Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Métodos para preparar aril éteres de acridínio-9-carboxilato são descritos em McCapra *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 4: 1111-1121 (1965); Razavi *et al.*, *Luminescence*, 15: 245-249 (2000); Razavi *et al.*, *Luminescence*, 15: 239-244 (2000); e Patente dos EUA nº 5.241.070 (cada um dos quais incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra por seus ensinamentos com relação ao mesmo). Esses aril éteres de acridínio-9-carboxilato são indicadores quimioluminescentes eficientes para o peróxido de hidrogênio produzido na oxidação de um analito por ao menos uma oxidase em termos de intensidade do sinal e/ou rapidez do sinal. O curso da emissão quimioluminescente do aril éster de acridínio-9-carboxilato é concluído rapidamente, isto é, em menos de 1 segundo, ao passo que a emissão quimioluminescente da acridínio-9-carboxamida dura mais de 2 segundos. O aril éster de acridínio-9-carboxilato, contudo, perde suas propriedades quimioluminescentes na presença de proteína. Logo, seu uso requer a ausência de proteína durante a geração e detecção dos sinais. Métodos para separar ou remover proteínas na amostra são bem conhecidos pelos versados na técnica e incluem, entre outros, ultrafiltração, extração, precipitação, diálise, cromatografia e/ou digestão (vide, por exemplo, Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies, Elsevier (2003)). A quantidade de proteínas removida ou separada da amostra de teste pode ser de cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de

65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, ou cerca de 95%. Outros detalhes com relação ao aril éster de acridínio-9-carboxilato e seu uso são definidos no Pedido de Patente dos EUA nº 11/697.835, depositado no dia 9 de abril de 2007. Aril ésteres de acridínio-9-carboxilato podem ser dissolvidos em qualquer solvente adequado, tal como N,N-dimetilformamida anidra desgaseificada (DMF) ou colato de sódio aquoso.

[0140]"Sequência ligante" ou "sequência de peptídeos ligante" refere-se a uma sequência de polipeptídeo natural ou artificial que conecta-se a uma ou mais sequências de polipeptídeo de interesse (por exemplo, de comprimento total, fragmentos etc.). O termo "conectar-se" refere-se à união da sequência ligante com a sequência de polipeptídeo de interesse. Essas sequências de polipeptídeo são preferivelmente unidas por uma ou mais ligações de peptídeo. As sequências ligantes podem ter um comprimento de cerca de 4 a cerca de 50 aminoácidos. De preferência, o comprimento da sequência ligante é de cerca de 6 a cerca de 30 aminoácidos. Sequências ligantes naturais podem ser modificadas por substituições, adições ou deleções de aminoácidos para criar sequências ligantes artificiais. Sequências ligantes podem ser usadas para muitas finalidades, inclusive em Fabs recombinantes. Exemplos de sequências ligantes incluem, entre outros: (i) etiquetas de Histidina (His), tais como uma etiqueta 6X His, que possui uma sequência de aminoácidos de HHHHHH (SEQ ID Nº: 3), são úteis como sequências ligantes para facilitar o isolamento e a purificação de polipeptídeos e anticorpos de interesse; (ii) sítios de clivagem da enteroquinase, como etiquetas de His, são úteis no isolamento e purificação de proteínas e anticorpos de interesse. Geralmente, sítios de clivagem da enteroquinase são usados junto com etiquetas de His no isolamento e purificação de proteínas e anticorpos de interesse. Há conhecimento de vários sítios de clivagem da enteroquinase na técnica. Exemplos de sítios de clivagem da enteroquinase incluem, entre outros, a sequência de aminoácidos de DDDDK (SEQ

ID Nº: 4) e derivados dessa (por exemplo, ADDDDK (SEQ ID Nº: 5) etc.); (iii) Sequências variadas podem ser usadas para ligar ou conectar as regiões variáveis de cadeia leve e/ou pesada de fragmentos de região variável de cadeia única. Exemplos de outras sequências ligantes podem ser encontrados em Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426 (1988); Huston *et al.*, *PNAS USA* 85: 5879-5883 (1988); e McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990). Sequências ligantes também podem ser modificadas para funções adicionais, tais como ligação de fármacos ou ligação com suportes sólidos. No contexto da presente revelação, o anticorpo monoclonal, por exemplo, pode conter uma sequência ligante, tal como uma etiqueta de His, um sítio de clivagem da enteroquinase, ou ambos.

[0141]"Anticorpo monoclonal", conforme usado neste documento, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, em que os diferentes anticorpos que compõem a população são idênticos, salvo possíveis mutações de ocorrência natural que podem se fazer presentes em quantidades mínimas. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único antígeno. Além disso, à diferença dos preparados de anticorpos policlonais que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Os anticorpos monoclonais neste documento incluem especificamente anticorpos "quiméricos", em que uma parte da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, ao passo que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, contanto que exibam a atividade biológica desejada.

[0142]"IRM", conforme usado neste documento, refere-se a imagiologia por ressonância magnética, que é uma técnica de imagiologia médica usada na radiologia para formar imagens da anatomia e dos processos fisiológicos do corpo tanto na saúde quanto na doença. Varredores de IRM, que baseiam-se na ciência da ressonância magnética nuclear (RMN), utilizam fortes campos magnéticos, ondas de rádio e gradientes de campo para gerar imagens do interior do corpo.

[0143]"Proteína de ligação multivalente" é usado neste documento em alusão a uma proteína que compreende dois ou mais sítios de ligação com antígeno (também chamados neste documento de "domínios de ligação com antígeno"). Uma proteína de ligação multivalente é preferivelmente desenvolvida em laboratório para conter três ou mais sítios de ligação com antígeno, e em geral não é um anticorpo de ocorrência natural. O termo "proteína de ligação multiespecífica" refere-se a uma proteína de ligação que pode ligar-se a dois ou mais alvos relacionados ou não relacionados, incluindo uma proteína de ligação capaz de ligar-se a dois ou mais epítopos diferentes da mesma molécula alvo.

[0144]"Valor preditivo negativo" ou "VPN", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, referem-se à probabilidade de que um paciente tenha um resultado negativo (isto é, de que o resultado proposto se faça ausente) dado que ele exiba um resultado de teste negativo (isto é, a probabilidade que o paciente cujo teste deu negativo para o resultado proposto não exiba o resultado proposto).

[0145]Conforme usado neste documento, o sintagma "razão de chances" refere-se a um número ou valor que é usado para comparar as chances relativas da ocorrência de um resultado de interesse (por exemplo, doença, transtorno ou lesão (por exemplo, tal como uma lesão cerebral traumática)), dada a exposição a uma variável de interesse (por exemplo, característica de saúde, evento (tal como, por exemplo, ter sofrido uma lesão (tal como uma lesão de cabeça e/ou ortopédica)) ou

aspecto do histórico médico. Uma razão de chances também pode ser usada para determinar se uma exposição específica é um fator de risco para um resultado específico e para comparar a grandeza de vários fatores de risco para esse resultado.

[0146]"Lesão ortopédica" refere-se a uma ou mais lesões a uma ou mais partes do sistema musculoesquelético, incluindo lesão aos ossos do esqueleto, músculos, cartilagem, tendão, ligamentos, juntas e outros tecidos conectivos que sustentam e interligam tecidos e órgãos. Em um aspecto, uma lesão ortopédica pode ser o resultado de um acidente repentino e exigir atenção médica. Exemplos de lesões ortopédicas incluem deslocamentos (tais como, por exemplo, de uma junta), fraturas (incluindo, por exemplo, fraturas por estresse ou compressão) ou quebras (por exemplo, de um ou mais ossos), torções (tais como, por exemplo, de um tornozelo, pulso, joelho, ombro etc.), rompimentos (tais como, por exemplo, rompimento de um ligamento tal como rompimento do LCA ou rompimento do menisco, o rompimento de uma cartilagem tal como um rompimento labral ou o rompimento de um tendão e/ou músculo tal como rompimento do manguito rotador), ou lesões de sobreuso (tais como, por exemplo, fascite plantar, cotovelo de tenista, síndrome do túnel do carpo). Em um aspecto, a lesão ortopédica é uma fratura. Em outro aspecto, a lesão ortopédica é uma quebra. Em outro aspecto, a lesão ortopédica é uma torção. Em ainda outro aspecto, a lesão ortopédica é um rompimento. Em ainda outro aspecto, a lesão ortopédica é um ou mais de uma fratura, quebra, torção ou rompimento.

[0147]"Dispositivo *point-of-care*" refere-se a um dispositivo usado para fazer testes de diagnóstico médico no ponto de atendimento ou próximo ao ponto de atendimento (a saber, fora do laboratório), no horário e local de atendimento ao paciente (tal como em um hospital, no consultório do médico, na emergência ou em outras instalações de atendimento médico, na casa do paciente, em uma clínica de

repouso e/ou em uma instalação de atendimento de longo prazo e/ou hospício). Exemplos de dispositivos *point-of-care* incluem os produzidos pela Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) (por exemplo, i-STAT e i-STAT Alinity, Universal Biosensors (Rowville, Austrália) (vide US 2006/0134713), Axis-Shield PoC AS (Oslo, Noruega) e Clinical Lab Products (Los Angeles, EUA).

[0148]"Valor preditivo positivo" ou "VPP", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, referem-se à probabilidade de que um paciente tenha um resultado positivo (isto é, de que o resultado proposto se faça presente) dado que ele exiba um resultado de teste positivo (isto é, a probabilidade de que o paciente cujo teste deu positivo para o resultado proposto exiba o resultado proposto).

[0149]"Reagentes de controle de qualidade", no contexto de imunoensaios e *kits* descritos neste documento, incluem, entre outros, calibradores, controles e painéis de sensibilidade. Um "calibrador" ou "padrão" tipicamente é usado (por exemplo, um ou mais, tal como vários) a fim de estabelecer as curvas de calibragem (padrão) para interpolação da concentração de um analito, tal como um anticorpo ou um analito. Como alternativa, pode-se usar um calibrador simples, que seja próximo a um nível de referência ou nível controle (por exemplo, níveis "baixo", "médio" ou "alto"). Vários calibradores (isto é, mais de um calibrador ou uma quantidade variada de calibradores) podem ser usados em conjunto para compor um "painei de sensibilidade".

[0150]Uma curva da "característica operacional do receptor" ou curva "ROC" refere-se a um gráfico que ilustra o desempenho de um sistema classificador binário à medida em que seu limite de discriminação varia. Por exemplo, uma curva ROC pode ser um gráfico da taxa de verdadeiros positivos em relação à taxa de falsos positivos para os diferentes pontos de corte possíveis em um teste diagnóstico. Ela é gerada relacionando a fração de verdadeiros positivos dentre os positivos (TVP =

taxa de verdadeiros positivos) e a fração de falsos positivos dentre os negativos (TFP = taxa de falsos positivos), em vários cenários limite. A TVP também é conhecida como sensibilidade, e a TFP é um menos a especificidade ou taxa de verdadeiros negativos. A curva ROC demonstra o relação de *tradeoff* entre sensibilidade e especificidade (qualquer aumento na sensibilidade será acompanhado por uma queda na especificidade); quanto mais de perto a curva segue a borda esquerda e então a borda superior do espaço ROC, mais preciso o teste; quanto mais próxima a curva chega da linha diagonal de 45 graus do espaço ROC, menos preciso é o teste; a inclinação da linha tangente em um ponto de corte dá a razão de probabilidade (RP) para esse valor de teste; e a área sob a curva é uma medida da precisão do teste.

[0151]"Anticorpo recombinante" e "anticorpos recombinantes" referem-se a anticorpos preparados por uma ou mais etapas, incluindo clonar sequências de ácido nucleico que codificam todo ou parte de um ou mais anticorpos monoclonais em um vetor de expressão apropriado por meio de técnicas recombinantes e subsequentemente expressar o anticorpo em uma célula hospedeira apropriada. Os termos incluem, entre outros, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados (total ou parcialmente humanizados), estruturas multiespecíficas ou multivalentes compostas por fragmentos de anticorpo, anticorpos bifuncionais, anticorpos heteroconjugados, DVD-Ig®s, e outros anticorpos conforme descritos neste documento em (i), todos produzidos recombinantemente. (Imunoglobulinas de domínio variável duplo e métodos para produzi-las são descritos em Wu, C., et al., *Nature Biotechnology*, 25: 1290-1297 (2007)). O termo "anticorpo bifuncional", conforme usado neste documento, refere-se a um anticorpo que comprehende um primeiro braço com especificidade por um sítio antigênico e um segundo braço com especificidade por um sítio antigênico diferente, isto é, os anticorpos bifuncionais têm especificidade dupla.

[0152]"Nível de referência", conforme usado neste documento, refere-se a um valor (ou nível) de corte do ensaio que é usado para avaliar a eficácia diagnóstica, prognóstica ou terapêutica e que é ligado ou associado neste documento a vários parâmetros clínicos (por exemplo, presença da doença, estágio da doença, gravidade da doença, progressão, não progressão ou recuperação da doença, etc.). Conforme usado neste documento, o termo "corte" refere-se a um limite (por exemplo, tal como um número) acima do qual ocorre certo resultado clínico ou um resultado clínico específico e abaixo do qual ocorre certo resultado clínico diferente ou um resultado clínico específico diferente.

[0153]A presente revelação propõe níveis de referência exemplificativos. No entanto, sabe-se bem que os níveis de referência podem variar dependendo da natureza do imunoensaio (por exemplo, dos anticorpos empregados, das condições de reação, da pureza da amostra etc.) e que os ensaios podem ser comparados e padronizados. Também encontra-se notoriamente dentro da capacidade dos versados na técnica adaptar a revelação neste documento para outros imunoensaios a fim de obter níveis de referência específicos ao imunoensaio para esses outros imunoensaios com base na descrição dada nesta revelação. Dado que o valor preciso do nível de referência pode variar entre ensaios, as descobertas conforme descritas neste documento devem ser em geral aplicáveis e capazes de ser extrapoladas para outros ensaios.

[0154]"Avaliação de risco", "classificação de risco", identificação de risco" ou "estratificação de risco" dos voluntários (isto é, pacientes), conforme usados neste documento, referem-se à avaliação de fatores, incluindo biomarcadores, para prever o risco de ocorrência de futuros eventos, incluindo princípio da doença ou progressão da doença, de tal modo que decisões sobre o tratamento no que diz respeito ao paciente possam ser tomadas com base em informações.

[0155]"Amostra", "amostra de teste", "prova", "amostra de um paciente" e "amostra do paciente", conforme usados neste documento, podem ser usados de maneira intercambiável e podem referir-se a uma amostra de sangue, tal como de sangue total, tecido, urina, soro, plasma, fluido amniótico, fluido cerebroespinhal, células placentárias ou tecido placentário, células endoteliais, leucócitos ou monócitos. Em algumas modalidades, a amostra é de sangue total. Em algumas modalidades, a amostra é de plasma. Em outras modalidades, a amostra é de soro. A amostra pode ser usada diretamente tal como obtida do paciente ou pode ser pré-tratada, tal como por filtragem, destilação, extração, concentração, centrifugação, inativação de componentes interferentes, adição de reagentes, e seus semelhantes, para modificar o caráter da amostra de alguma forma conforme discutido neste documento ou então como for de conhecimento de técnica.

[0156]Uma variedade de tipos de célula, tecido ou fluido corporal pode ser utilizada para obter uma amostra. Esses tipos de célula, tecidos e fluido podem incluir seções de tecido tais como amostras de biópsia e autópsia, seções congeladas coletadas para fins histológicos, sangue (tal como sangue total), plasma, soro, glóbulos vermelhos, plaquetas, fluido intersticial, fluido cerebroespinhal etc. Os tipos de célula e tecidos também podem incluir fluido linfático ou fluido cerebroespinhal. Um fluido coletado por um tipo de tecido ou célula pode ser provido para remover uma amostra de células de um ser humano ou outro animal não humano, mas isso também pode ser consumado usando células previamente isoladas (por exemplo, isoladas por outra pessoa, em outro momento, e/ou com outra finalidade). Tecidos arquivados, tais como com histórico de tratamento ou resultados, também podem ser usados. O isolamento e/ou a purificação de proteínas ou nucleotídeos podem não ser necessários.

[0157]"Sensibilidade" refere-se à proporção de pacientes cujos resultados deram positivo que são identificados corretamente como positivos (por exemplo,

discernir corretamente os pacientes com uma doença ou condição mental para a qual os testes foram realizados. Isso pode incluir, por exemplo, discernir corretamente pacientes com uma lesão ortopédica e uma LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT, discernir corretamente pacientes com uma LCT moderada a grave de pacientes com uma LCT leve, discernir corretamente pacientes com uma LCT leve de pacientes com uma LCT moderada a grave, discernir corretamente pacientes com uma LCT moderada a grave de pacientes sem LCT ou discernir corretamente pacientes com uma LCT leve de pacientes sem LCT etc.).

[0158]A "especificidade" de um ensaio, conforme usada neste documento, refere-se à proporção de pacientes cujos resultados deram negativo que são identificados corretamente como negativos (por exemplo, discernindo corretamente os pacientes que não têm uma doença ou condição mental para a qual os testes foram realizados. Isso pode incluir, por exemplo, discernir corretamente pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT de pacientes com uma lesão ortopédica e LCT, discernir corretamente pacientes sem uma LCT moderada a grave de pacientes com uma LCT leve, discernir corretamente pacientes sem uma LCT leve de pacientes com uma LCT moderada a grave, discernir corretamente pacientes sem nenhuma uma LCT etc.).

[0159]"Série de composições calibradoras" refere-se a uma pluralidade de composições que compreendem uma concentração conhecida do analito, tal como GFAP e/ou UCH-L1, em que cada uma das composições difere das demais na série no que tange à concentração do analito, tal como GFAP e/ou UCH-L1.

[0160]Conforme usado neste documento, o termo "detecção de molécula única" refere-se à detecção e/ou medição de uma única molécula de um analito em uma amostra de teste em níveis de concentração baixíssimos (tais como pg/mL ou femtograma/mL). Uma diversidade de diferentes dispositivos ou analisadores de molécula única é conhecida na técnica e inclui dispositivos de nanoporos e

nanopoços. Exemplos de dispositivos de nanoporos são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161402, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Exemplos de dispositivos de nanopoços são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161400, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra.

[0161]"Fase sólida" ou "suporte sólido", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, referem-se a qualquer material que possa ser usado para ligar-se e/ou atrair e imobilizar (1) um ou mais agentes de captura ou parceiros de ligação específica de captura ou (2) um ou mais agentes de detecção ou parceiros de ligação específica de detecção. A fase sólida pode ser escolhida por sua capacidade intrínseca de atrair e imobilizar um agente de captura. Como alternativa, a fase sólida pode ter fixado nela um agente de ligação capaz de atrair e imobilizar (1) o agente de captura ou parceiro de ligação específica de captura ou (2) o agente de detecção ou parceiro de ligação específica de detecção. Por exemplo, o agente de ligação pode incluir uma substância carregada cuja carga é oposta em relação ao próprio agente de captura (por exemplo, ao parceiro de ligação específica de captura) ou ao próprio agente de detecção (por exemplo, ao agente de ligação específica de detecção) ou a uma substância carregada conjugada (1) ao agente de captura ou parceiro de ligação específica de captura ou (2) ao agente de detecção ou parceiro de ligação específica de detecção. Em termos gerais, o agente de ligação pode ser qualquer parceiro de ligação (de preferência específica) que é imobilizado na fase sólida (ligado a ela) e que tem a capacidade de imobilizar (1) o agente de captura ou parceiro de ligação específica de captura ou (2) o agente de detecção ou parceiro de ligação específica de detecção através de uma reação de ligação. O agente de ligação permite a ligação indireta do agente de captura com um material de fase sólida antes da realização do ensaio ou durante a realização do ensaio. Por exemplo, a fase sólida pode ser de plástico, plástico derivatizado, metal

magnético ou não magnético, vidro ou silício, incluindo, por exemplo, um tubo de ensaio, poço de microtitulação, chapa, conta, micropartícula, *chip* e outras configurações conhecidas pelos versados na técnica.

[0162]"Ligaçāo específica" ou "ligar-se especificamente", conforme usados neste documento, podem referir-se à interação de um anticorpo, proteína ou peptídeo com uma segunda espécie química, em que a interação depende da presença de uma estrutura específica (por exemplo, de um determinante ou epítopo antigênico) na espécie química; por exemplo, um anticorpo reconhece e liga-se a uma estrutura de proteína específica em vez de a proteínas em geral. Se um anticorpo é específico ao epítopo "A", a presença de uma molécula contendo o epítopo A (ou A livre e não marcado), em uma reação que contém "A" marcado e o anticorpo, reduzirá a quantidade de A marcado ligado ao anticorpo.

[0163]"Parceiro de ligação específica" é um dos membros de um par de ligação específica. Um par de ligação específica compreende duas moléculas diferentes, que ligam-se especificamente uma à outra através de meios químicos ou físicos. Logo, além dos pares de ligação específica antígeno e anticorpo dos imunoensaios típicos, outros pares de ligação específica podem incluir biotina e avidina (ou estreptavidina), carboidratos e lectinas, sequências de nucleotídeo complementares, moléculas efetoras e receptoras, cofatores e enzimas, enzimas e inibidores de enzima, e seus semelhantes. Além disso, pares de ligação específica podem incluir membros que são análogos dos membros de ligação específica originais, por exemplo, analito-análogo. Membros de ligação específica imunorreativos incluem antígenos, fragmentos de antígeno e anticorpos, incluindo anticorpos monoclonais e policlonais, bem como complexos e fragmentos dos mesmos, sejam isolados ou produzidos recombinantemente.

[0164]"Estatisticamente significativo", conforme usado neste documento, refere-se à probabilidade de que uma relação entre duas ou mais variáveis tenha

uma causa outra que não o mero acaso. O teste de hipóteses estatísticas serve para determinar se o resultado de um conjunto de dados é estatisticamente significativo. No teste de hipóteses estatísticas, um resultado estatístico significativo é obtido sempre que o valor p observado de um teste estatístico for menor que o nível de significância definido do estudo. O valor p corresponde à probabilidade de obter resultados ao menos tão extremos quanto os observados, dado que a hipótese nula seja verdadeira. Exemplos de análise de hipóteses estatísticas incluem o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon, teste t, Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher. "Significativo", conforme usado neste documento, refere-se a uma mudança que não foi determinada como estatisticamente significativa (por exemplo, pode não ter sido submetida ao teste de hipóteses estatísticas).

[0165]"Paciente", conforme usado neste documento, refere-se a qualquer vertebrado, incluindo, entre outros, um mamífero (por exemplo, vaca, porco, camelo, lhama, cavalo, bode, coelho, carneiro, *hamster*, preá, gato, cão, rato e camundongo, um primata não humano (por exemplo, um macaco, tal como um macaco cinomolgo ou reso, chimpanzé etc.) e um ser humano). Em algumas modalidades, o paciente pode ser um ser humano ou outro mamífero não humano. Em outras modalidades, o paciente é um ser humano. O paciente pode estar sendo submetido a outras formas de tratamento. Em algumas modalidades, quando o paciente é um ser humano, ele não inclui nenhum humano que tenha sofrido um acidente vascular cerebral (por exemplo, derrame).

[0166]"Tratar" ou "tratamento" são usados de maneira intercambiável neste documento para descrever a reversão, alívio ou inibição do progresso de uma doença e/ou lesão, ou de um ou mais sintomas dessa doença, à qual o termo é aplicado. Dependendo da condição do paciente, o termo também se refere a prevenir uma doença e inclui prevenir o princípio de uma doença, ou prevenir os sintomas associados a uma doença. Um tratamento pode ser realizado de maneira

aguda ou crônica. O termo também refere-se a reduzir a gravidade de uma doença ou de sintomas associados à doença em questão antes do acometimento por ela. Essa prevenção ou redução da gravidade de uma doença antes do acometimento refere-se à administração de uma composição farmacêutica a um paciente que, quando da administração, não foi acometido pela doença. "Prevenir" também refere-se a prevenir a recorrência de uma doença ou de um ou mais sintomas associados à doença em questão. "Tratamento" e "terapeuticamente" referem-se ao ato de tratar, tal como "tratar" é definido acima.

[0167]"Lesão Cerebral Traumática" ou "LCT", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, referem-se a uma lesão complexa com um amplo espectro de sintomas e limitações. A LCT é mais frequentemente um evento agudo semelhante a outras lesões. A LCT pode ser classificada como "leve", "moderada" ou "grave". As causas da LCT são diversas e incluem, por exemplo, tremores físicos de uma pessoa, um acidente de carro, lesões por armas de fogo, acidentes vasculares cerebrais (por exemplo, derrames), quedas, explosões ou detonações e outros tipos de traumatismo por força contundente. Outras causas de LCT incluem a ingestão e/ou exposição a um ou mais produtos químicos ou toxinas (tais como incêndios, bolores, amianto, pesticidas e inseticidas, solventes orgânicos, tintas, colas, gases (tais como monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio e cianeto), metais orgânicos (tais como mercúrio metílico, chumbo tetraetila e estanho orgânico), uma ou mais drogas ou combinações desses). Como alternativa, a LCT pode ocorrer em pacientes que sofrem de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, hipoxia, um ou mais vírus, meningite, hidrocefalia ou combinações desses. Adultos jovens e os idosos encontram-se nos grupos de idade com o maior risco de LCT. Em certas modalidades neste documento, a lesão cerebral traumática ou LCT não inclui e exclui especificamente acidente vascular cerebral, tal como derrames.

[0168]"LCT leve", conforme usado neste documento, refere-se a uma lesão cerebral em que a perda da consciência é breve e tipicamente de alguns segundos ou minutos e/ou em que a confusão e desorientação não duram mais que 1 hora. A LCT leve também é aludida como uma concussão, traumatismo de cabeça modesto, LCT modesta, lesão cerebral modesta e lesão de cabeça modesta. Embora as varreduras por IRM e TC pareçam normais, o indivíduo com LCT leve pode sofrer problemas cognitivos tais como dor de cabeça, dificuldade para pensar, problemas de memória, déficits de atenção, oscilações de humor e frustração.

[0169]A LCT leve é a mais prevalente das LCTs e muitas vezes passa por despercebida quando da lesão inicial. Tipicamente, um paciente com um número na escala de Glasgow de Coma entre 13 e 15 (tal como 13 a 15 ou 14 a 15). Quinze por cento (15%) das pessoas com LCT leve exibem sintomas que duram 3 meses ou mais. A LCT leve é definida como resultado de movimento ou impacto vigoroso da cabeça causando uma breve alteração do estado mental (confusão, desorientação ou perda de memória) ou perda da consciência por menos de 30 minutos. Sintomas comuns da LCT leve incluem fadiga, dores de cabeça, distúrbios visuais, perda de memória, atenção/concentração deficiente, distúrbios do sono, vertigem/perda do equilíbrio, irritabilidade-distúrbios de emocionais, sentimentos de depressão, e convulsões. Outros sintomas associados à LCT leve incluem náusea, perda do olfato, sensibilidade à luz e a sons, mudanças de humor, perder-se ou confundir-se, e/ou lentidão de pensamento.

[0170]"LCT moderada", conforme usado neste documento, refere-se a uma lesão cerebral em que a perda da consciência e/ou confusão e desorientação se dão entre 1 e 24 horas, e o paciente exibe um número na escala de Coma de Glasgow entre 9 e 12. O indivíduo com LCT moderada exibe resultados de imagiologia cerebral anômalos. "LCT grave", conforme usado neste documento, refere-se a uma lesão cerebral em que a perda da consciência dura mais de 24 horas, e a perda de

memória após a lesão ou penetração no crânio dura mais do que 24 horas, e o paciente exibe um número na escala de Coma de Glasgow entre 3 e 8. Os déficits variam de prejuízo das funções cognitivas de nível mais alto a estados comatosos. Os sobreviventes podem exibir função limitada dos braços ou pernas, fala ou discurso anormais, perda da capacidade de pensar ou problemas emocionais. Indivíduos com lesões graves podem se ver em estados não responsivos de longa duração. Para muitas pessoas com LCT grave, a reabilitação de longo prazo geralmente se faz necessária para maximizar a atividade e independência.

[0171]Sintomas comuns de LCT moderada grave incluem déficits cognitivos incluindo dificuldades de atenção, concentração, distração, memória, velocidade de processamento, confusão, perseverança, impulsividade, processamento linguístico, e/ou "funções executivas", não compreensão de palavras faladas (afasia receptiva), dificuldade em falar e ser entendido (afasia expressiva), fala ininteligível, fala muito rápida ou muito lenta, problemas de leitura, problemas na escrita, dificuldades com a interpretação de toques, temperatura, movimento, posição dos membros e discriminação refinada, integração ou padronização de impressões sensoriais em dados psicologicamente significativos, perda parcial ou total da visão, fraqueza dos músculos oculares e visão duplicada (diplopia), visão borrada, problemas para julgar distâncias, movimentos involuntários dos olhos (nistagmo), intolerância à luz (fotofobia), audição, tal como perda ou redução da audição, zumbido nos ouvidos (tinito), aumento da sensibilidade a sons, perda ou percepção reduzida do olfato (anosmia), perda ou percepção reduzida do paladar, convulsões associadas a epilepsia que podem ser de vários tipos e podem envolver surtos de consciência, percepção sensorial, ou movimentos motores, controle do intestino ou bexiga, distúrbios do sono, perda de estamina, mudanças de apetite, regulação da temperatura corporal, dificuldades de menstruação, comportamentos dependentes,

capacidade emocional, perda de motivação, irritabilidade, agressividade, depressão, desinibição, ou negação/falta de consciência.

[0172]"Hidrolase cárboxi-terminal da ubiquitina L1" ou "UCH-L1", conforme usados de maneira intercambiável neste documento, referem-se a uma enzima desubiquitinante codificada pelo gene *UCH-L1* em seres humanos. A UCH-L1, também conhecida como esterase carboxil-terminal da ubiquitina L1 e tioesterase da ubiquitina, é um membro de uma família de genes cujos produtos hidrolisam pequenos adutos C-terminais da ubiquitina para gerar o monômero ubiquitina.

[0173]"Condição da UCH-L1" pode significar ou o nível ou a quantidade de UCH-L1 em um ponto no tempo (tal como com uma medida simples da UCH-L1), o nível ou a quantidade de UCH-L1 associada a monitoramento (tal como com um teste repetido em um paciente para identificar um aumento ou redução na quantidade de UCH-L1), o nível ou a quantidade de UCH-L1 associada ao tratamento contra lesão cerebral traumática (seja uma lesão cerebral primária e/ou uma lesão cerebral secundária), ou combinações desses.

[0174]"Variante" é usado neste documento para descrever um peptídeo ou polipeptídeo que difere quanto à sequência de aminoácidos por causa da introdução, deleção ou substituição conservadora de aminoácidos, mas retém ao menos uma atividade biológica. Exemplos representativos de "atividade biológica" incluem a capacidade de ser ligado por um anticorpo específico ou de promover uma resposta imunológica. "Variante" também é usado neste documento para descrever uma proteína com uma sequência de aminoácidos que é substancialmente idêntica à de uma proteína mencionada com uma sequência de aminoácidos que retém ao menos uma atividade biológica. Uma substituição conservadora de um aminoácido, isto é, substituir um aminoácido por um aminoácido diferente de propriedades similares (por exemplo, hidrofilia, grau e distribuição de regiões carregadas), é reconhecida na técnica como envolvendo tipicamente uma mudança ínfima. Essas mudanças

ínfimas podem ser identificadas, em parte, considerando o índice hidropático dos aminoácidos, como é entendido na técnica. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). O índice hidropático de um aminoácido baseia-se na consideração de sua hidrofilia e carga. Sabe-se na técnica que aminoácidos de índices hidropáticos semelhantes podem ser substituídos e ainda reter a função proteica. Em um aspecto, aminoácidos com índices hidropáticos de ± 2 são substituídos. A hidrofilia dos aminoácidos também pode ser usada para revelar substituições que resultariam em proteínas retendo a função biológica. A consideração da hidrofilia dos aminoácidos no contexto de um peptídeo permite calcular a maior hidrofilia média local desse peptídeo, uma medida útil que, segundo informações, correlaciona-se bem com a antigenicidade e imunogenicidade. Patente dos EUA nº 4.554.101, incorporada ao presente documento na íntegra por referência. A substituição de aminoácidos com valores de hidrofilia semelhantes pode resultar em peptídeos retendo a atividade biológica, por exemplo, imunogenicidade, como é entendido na técnica. As substituições podem ser realizadas com aminoácidos com valores de hidrofilia dentro de ± 2 um do outro. Tanto o índice de hidrofobia quanto o valor de hidrofilia dos aminoácidos são influenciados pelo lado da cadeia específico do aminoácido em questão. Em consonância com essa observação, entende-se que as substituições de aminoácidos que são compatíveis com a função biológica dependem da semelhança relativa dos aminoácidos e, em particular, das cadeias laterais desses aminoácidos, conforme revelado pela hidrofobia, hidrofilia, carga, tamanho e outras propriedades. "Variante" também pode ser usado para referir-se a um fragmento antigenicamente reativo de um anticorpo anti-analito (tal como GFAP e/ou UCH-L1) que difere do fragmento correspondente do anticorpo anti-analito (tal como GFAP e/ou UCH-L1) na sequência de aminoácidos mas ainda assim é antigenicamente reativo e capaz de competir com o fragmento correspondente do anticorpo anti-analito (tal como GFAP e/ou UCH-L1) para ligar-se ao analito (tal

como GFAP e/ou UCH-L1). "Variante" também pode ser usado para descrever um polipeptídeo ou fragmento do mesmo que foi diferencialmente processado, tal como por proteólise, fosforilação ou outra modificação pós-translacional, e ainda retém sua reatividade antigênica.

[0175]"Vetor" é usado neste documento para descrever uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual se ligou. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que refere-se a um *loop* de DNA de fita dupla circular ao qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Certos vetores podem replicar-se autonomamente em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos com uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos epissônicos). Outros vetores (por exemplo, vetores mamíferos não epissônicos) podem ser integrados ao genoma de uma célula hospedeira quando da introdução na célula hospedeira, e com isso são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais se ligam operacionalmente. Esses vetores são chamados neste documento de "vetores de expressão recombinante" (ou simplesmente de "vetores de expressão"). Em termos gerais, vetores de expressão úteis em técnicas de DNA recombinante são geralmente na forma de plasmídeos. "Plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de maneira intercambiável visto que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. No entanto, podem-se utilizar outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus de réplica imperfeita, adenovírus e vírus adenoassociados), que servem a funções equivalentes. Sob esse aspecto, versões de RNA dos vetores (incluindo vetores virais de RNA) também podem encontrar uso no contexto da presente revelação.

[0176]"YJ", conforme usado neste documento, refere-se à estatística J de Youden (também chamada de índice de Youden) e é uma estatística simples que capta o desempenho de um teste diagnóstico dicotômico. A YJ é representada pelas fórmulas abaixo:

$$J = \text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 1$$

sendo as duas quantidades à direita sensibilidade e especificidade. A fórmula expandida é dada abaixo:

$$J = \frac{\text{verdeiros positivos}}{\text{verdeiros positivos} + \text{falsos negativos}} + \frac{\text{verdeiros negativos}}{\text{verdeiros negativos} + \text{falsos positivos}} - 1$$

[0177]Salvo definição em contrário, termos científicos e técnicos usados com relação à presente revelação terão os significados comumente entendidos pelos versados na técnica. Por exemplo, as técnicas de cultura celular e tecidual, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e química e hibridização das proteínas e ácidos nucleicos descritas neste documento, e a nomenclatura relativa às mesmas, são aquelas familiares e comumente usadas na técnica. O significado e o âmbito dos termos devem ser evidentes; porém, no caso de qualquer ambiguidade latente, as definições dadas neste documento prevalecerão sobre qualquer definição nos dicionários ou outras definições extrínsecas. Além disso, a não ser que o contexto dite o contrário, termos no singular incluem o plural e termos no plural incluem o singular.

2. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça

[0178]A presente revelação refere-se, entre outros métodos, a um método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente (tal como um ser humano) que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça. O método pode ajudar a determinar se o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve. Conforme usado neste

documento, "determinar se o paciente também sofreu uma LCT" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, sofreu uma LCT, tal como uma LCT leve, e/ou, mais provavelmente do que não, evidenciará uma descoberta positiva ou negativa em um procedimento de imagiologia da cabeça, tal como um resultado de IRM positivo ou negativo ou um resultado de varredura por TC positivo ou negativo. Mais especificamente, esse método pode compreender as etapas de: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de GFAP e/ou UCH-L1 na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve, quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1, ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. A amostra pode ser uma amostra biológica, tal como a amostra de um ser humano. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT leve de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, tal como entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 200 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou o nível de referência de

UCH-L1 é entre cerca de 90 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, tal como entre 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL. Mais especificamente, em uma modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 80 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 45 pg/mL e cerca de 80 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 80 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 60 pg/mL e cerca de 80 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 950 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em outra modalidade, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 970 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0179]Em algumas modalidades, é determinado que um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática leve quando o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP (i) de cerca de 68 pg/ml a cerca de 181 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido

uma LCT leve for de cerca de 45 a cerca de 90, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 50% e cerca de 71%; ou (ii) de cerca de 47 pg/ml a cerca de 67 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 43 a cerca de 56, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 71% e cerca de 76%. Como alternativa, ou em aditamento, é determinado que um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática leve quando o nível de UCH-L1 na amostra for superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/ml a cerca de 289 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 5 a cerca de 7, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade entre cerca de 30% e cerca de 36%. Em ambos os casos, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um paciente com uma LCT leve. Em algumas modalidades, o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP: (a) de cerca de 160 pg/ml a cerca de 175 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 46,0 a cerca de 49,0, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 55,6% e cerca de 57,0%; (b) de cerca de 130 pg/ml a cerca de 150 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 50,5 a cerca de 56,8, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 57,7% e cerca de 60,5%; ou (b) de cerca de 50 pg/ml a cerca de 60 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 47,8 a cerca de 52,9, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 72,7% e cerca de 74,6%. Em aditamento, ou como alternativa, em algumas modalidades, o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1: (a) de cerca de 265 pg/ml a cerca de 285 pg/mL e a razão de chances de que o paciente

tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 5,1 a cerca de 5,8, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade entre cerca de 30,4% e cerca de 33,2%; ou (b) de cerca de 249 pg/ml a cerca de 256 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 6,2 a cerca de 6,4, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade entre cerca de 34,7% e cerca de 35,2%.

[0180]Em algumas modalidades, é determinado que um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática leve quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma lesão cerebral traumática é: (ii) de cerca de 45 a cerca de 90 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 50% e cerca de 71%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 68 pg/mL a cerca de 181 pg/mL; ou (ii) de cerca de 43 a cerca de 56 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 71% e cerca de 76%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 47 pg/mL a cerca de 67 pg/mL. Como alternativa, ou em aditamento, é determinado que um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática leve quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma lesão cerebral traumática leve for de cerca de 5 a cerca de 7 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade de cerca de 30% a cerca de 36%, onde o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/ml a cerca de 289 pg/mL. Em ambos os casos, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um paciente com uma LCT leve. Em algumas modalidades, a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP é (i) de cerca de 46,0 a cerca de 49,0 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 55,6% e cerca de 57,0%, em que o nível de

GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 160 pg/mL a cerca de 175 pg/mL; (ii) de cerca de 50,5 a cerca de 56,8 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 57,7% e cerca de 60,5%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 130 pg/mL a cerca de 150 pg/mL; ou (iii) de cerca de 47,8 a cerca de 52,9 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 72,7% e cerca de 74,6%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 50 pg/mL a cerca de 60 pg/mL. Em aditamento, ou como alternativa, em algumas modalidades, a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 é (i) de cerca de 5,1 a cerca de 5,8 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade de cerca de 30,4% a cerca de 33,2%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 265 pg/mL a cerca de 285 pg/mL; ou (ii) de cerca de 6,2 a cerca de 6,4 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade de cerca de 34,7% a cerca de 35,2%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 249 pg/mL a cerca de 256 pg/mL.

[0181]A presente revelação também se refere, entre outros métodos, a um método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça se beneficiaria de um procedimento de imagiologia, e portanto o receberia, tal como IRM ou varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente se beneficiaria de um procedimento de imagiologia, e portanto o receberia" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, sofreu uma LCT, tal como uma LCT leve, e, mais

provavelmente do que não, evidenciará uma descoberta positiva em um procedimento de imagiologia da cabeça, tal como um resultado de IRM da cabeça positivo ou um resultado de varredura por TC positivo. Mais especificamente, esse método pode compreender as etapas de: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de GFAP ou UCH-L1 na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve, quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1, e realizar um procedimento de imagiologia da cabeça; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. A amostra pode ser uma amostra biológica, tal como a amostra de um ser humano. Inversamente, um nível baixo de um ou mais dos biomarcadores GFAP e UCH-L1 é capaz de prever se a varredura tende a ser negativa, conforme descrito neste documento.

[0182]Em algumas modalidades, o método pode incluir obter uma amostra dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), de uma lesão ortopédica para o paciente e colocar a amostra em contato com um anticorpo para a GFAP ou com um anticorpo para a UCH-L1 para permitir a formação de um complexo anticorpo e GFAP ou anticorpo e UCH-L1. O método também inclui detectar o complexo anticorpo-GFAP ou o complexo anticorpo-UCH-L1 resultante.

[0183]Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 48 horas da lesão ortopédica, tal como dentro de cerca de 0 a cerca de 4 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 0 a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em outras modalidades, a amostra pode ser coletada do paciente humano dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas, ou cerca de 25 horas da lesão ortopédica. Em algumas modalidades, o princípio da presença de GFAP e/ou UCH-L1 aparece dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou cerca de 25 horas após a lesão ortopédica.

[0184]Em algumas modalidades, o paciente pode receber um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois de determinar o nível de GFAP e/ou UCH-L1 em um ou mais pontos no tempo. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base em uma TC da cabeça anormal. Em algumas modalidades, o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois de realizar o ensaio. Em algumas modalidades, o paciente exibe uma TC da cabeça normal.

[0185]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática de moderada a grave. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 3 a 12. Em algumas modalidades, suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática leve. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0186]Em termos gerais, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 também pode ser usado como um referencial em comparação ao qual avaliam-se os resultados obtidos quando do ensaio de uma amostra teste quanto à GFAP e/ou UCH-L1. Em termos gerais, ao fazer essa comparação, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é obtido realizando um ensaio específico por um número suficiente de vezes e em condições apropriadas para que possa-se fazer uma ligação ou associação entre a presença, quantidade ou concentração do analito e um estágio específico ou *endpoint* da LCT ou a indícios específicos. Tipicamente,

obtém-se o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 por meio de ensaios com pacientes de referência (ou populações de pacientes de referência). A GFAP e/ou a UCH-L1 medidas podem incluir fragmentos das mesmas, produtos de degradação das mesmas e/ou produtos de clivagem enzimática das mesmas.

[0187]Em certas modalidades, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle que não sofreram uma lesão na cabeça.

de 75% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é de ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 81,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 87,5%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%.

[0189]Em algumas modalidades, a especificidade (para GFAP e/ou UCH-L1) é entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 40%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 35%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 90%, entre

ao menos cerca de 50% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100%. Em algumas modalidades, a especificidade é de ao menos cerca de 30,0%, ao menos cerca de 31,0%, ao menos cerca de 32,0%, ao menos cerca de 33,0%, ao menos cerca de 34,0%, ao menos cerca de 35,0%, ao menos cerca de 36,0%, ao menos cerca de 37,0%, ao menos cerca de 38,0%, ao menos cerca de 39,0%, ao menos cerca de 40,0%, ao menos cerca de 45,0%, ao menos cerca de 50,0%, ao menos cerca de 55,0%, ao menos cerca de 60,0%, ao menos cerca de 65,0%, ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 81,0%, ao menos cerca de 82,0%, ao menos cerca de 83,0%, ao menos cerca de 84,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 91,0%, ao menos cerca de 92,0%, ao

menos cerca de 93,0%, ao menos cerca de 94,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 96,0%, ao menos cerca de 97,0%, ao menos cerca de 98,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%. Por exemplo, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 75%, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 99%, ou a sensibilidade é de ao menos cerca de 100% e a especificidade é de ao menos cerca de 100%.

[0190]Em algumas modalidades, a amostra é (a) coletada dentro de 0 a 4 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (b) coletada dentro de 4 a 8 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; (c) coletada entre cerca de 8 horas a 12 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; (d) coletada entre cerca de 12 horas a 16 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; (e) coletada entre cerca de 16 horas a 20 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; ou (f) coletada entre cerca de 20 horas a 24 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 71% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%.

[0191]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 10 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre ao menos cerca de 45 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre ao menos

cerca de 50 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 60 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL.

[0192]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP pode ser de ao menos cerca de 5,0 pg/mL, ao menos cerca de 6,0 pg/mL, ao menos cerca de 7,0 pg/mL, ao menos cerca de 8,0, pg/mL, ao menos cerca de 9,0 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 11 pg/mL, ao menos cerca de 12 pg/mL, ao menos cerca de 13 pg/mL, ao menos cerca de 14 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 16 pg/mL, ao menos cerca de 17 pg/mL, ao menos cerca de 18 pg/mL, ao menos cerca de 19 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 21 pg/mL, ao menos cerca de 22 pg/mL, ao menos cerca de 23 pg/mL, ao menos cerca de 24 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 26 pg/mL, ao menos cerca de 27 pg/mL, ao menos cerca de 28 pg/mL, ao menos cerca de 29 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 31 pg/mL, ao menos cerca de 32 pg/mL, ao menos cerca de 33 pg/mL, ao menos cerca de 34 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 36 pg/mL, ao menos cerca de 37 pg/mL, ao menos cerca de 38 pg/mL, ao menos cerca de 39 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 41 pg/mL, ao menos cerca de 42 pg/mL, ao menos cerca de 43 pg/mL, ao menos cerca de 44 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ao menos cerca de 46 pg/mL, ao menos cerca de 47 pg/mL, ao menos cerca de 48 pg/mL, ao menos cerca de 49 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ao menos cerca de 75 pg/mL, ao menos cerca de 80 pg/mL, ao menos cerca de 90 pg/mL, ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 120 pg/mL, ao menos cerca de 130 pg/mL, ao menos cerca de 140 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 160 pg/mL, ao menos cerca de 170 pg/mL, ao menos cerca de 180 pg/mL, ao menos cerca de 190 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 210 pg/mL, ao menos cerca de 220 pg/mL, ao menos cerca de 230 pg/mL, ao menos cerca de 240 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL,

ao menos cerca de 260 pg/mL, ao menos cerca de 270 pg/mL, ao menos cerca de 280 pg/mL, ao menos cerca de 290 pg/mL ou ao menos cerca de 300 pg/mL.

[0193]Em outra modalidade, a quantidade de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 110 pg/mL, entre ao menos cerca de 95 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 95 pg/mL e cerca de 110 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 350 pg/mL, entre ao

menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 320 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 250 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 e cerca de 290 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 270 pg/mL, entre ao menos cerca de

270 pg/mL e cerca de 290 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 970 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0194]Em algumas modalidades, a quantidade de UCH-L1 pode ser de ao menos cerca de 90 pg/mL, ao menos cerca de 95 pg/mL, ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 105 pg/mL, ao menos cerca de 106 pg/mL, ao menos cerca de 107 pg/mL, ao menos cerca de 108 pg/mL, ao menos cerca de 109 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 115 pg/mL, ao menos cerca de 120 pg/mL, ao menos cerca de 130 pg/mL, ao menos cerca de 140 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 160 pg/mL, ao menos 170 pg/mL,

ao menos 180 pg/mL, ao menos 190 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos 210 pg/mL, ao menos 220 pg/mL, ao menos 230 pg/mL, ao menos 240 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL, ao menos 260 pg/mL, ao menos 270 pg/mL, ao menos 280 pg/mL, ao menos 290 pg/mL, ao menos cerca de 300 pg/mL, ao menos 310 pg/mL, ao menos 320 pg/mL, ao menos 330 pg/mL, ao menos 340 pg/mL, ao menos cerca de 350 pg/mL, ao menos 360 pg/mL, ao menos 370 pg/mL, ao menos 380 pg/mL, ao menos 390 pg/mL, ao menos cerca de 400 pg/mL, ao menos 410 pg/mL, ao menos 420 pg/mL, ao menos 430 pg/mL, ao menos 440 pg/mL, ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos 460 pg/mL, ao menos 470 pg/mL, ao menos 480 pg/mL, ao menos 490 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos 510 pg/mL, ao menos 520 pg/mL, ao menos 530 pg/mL, ao menos 540 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos 560 pg/mL, ao menos 570 pg/mL, ao menos 580 pg/mL, ao menos 590 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ao menos 610 pg/mL, ao menos 620 pg/mL, ao menos 630 pg/mL, ao menos 640 pg/mL, ao menos cerca de 650 pg/mL, ao menos 660 pg/mL, ao menos 670 pg/mL, ao menos 680 pg/mL, ao menos 690 pg/mL, ao menos cerca de 700 pg/mL, ao menos 710 pg/mL, ao menos 720 pg/mL, ao menos 730 pg/mL, ao menos 740 pg/mL, ao menos cerca de 750 pg/mL, ao menos 760 pg/mL, ao menos 770 pg/mL, ao menos 780 pg/mL, ao menos 790 pg/mL, ao menos cerca de 800 pg/mL, ao menos 810 pg/mL, ao menos 820 pg/mL, ao menos 830 pg/mL, ao menos 840 pg/mL, ao menos cerca de 850 pg/mL, ao menos 860 pg/mL, ao menos 870 pg/mL, ao menos 880 pg/mL, ao menos 890 pg/mL, ao menos cerca de 900 pg/mL, ao menos 910 pg/mL, ao menos 920 pg/mL, ao menos 930 pg/mL, ao menos 940 pg/mL, ao menos cerca de 950 pg/mL, ao menos 960 pg/mL, ao menos 970 pg/mL, ao menos 980 pg/mL, ao menos 990 pg/mL, ao menos cerca de 1.000 pg/mL, ao menos cerca de 1.010 pg/mL, ao menos 1.020 pg/mL, ao menos 1.030 pg/mL, ao menos 1.040 pg/mL, ao menos cerca de 1.050 pg/mL, ao menos 1.060 pg/mL, ao

menos 1.070 pg/mL, ao menos 1.080 pg/mL, ao menos 1.090 pg/mL, ao menos cerca de 1.100 pg/mL, ao menos cerca de 1.110 pg/mL, ao menos cerca de 1.120 pg/mL, ao menos cerca de 1.130 pg/mL, ao menos cerca de 1.140 pg/mL, ao menos cerca de 1.150 pg/mL, ao menos cerca de 1.160 pg/mL, ao menos 1.170 pg/mL, ao menos 1.180 pg/mL, ao menos 1.190 pg/mL, ao menos cerca de 1.200 pg/mL, ao menos cerca de 1.210 pg/mL, ao menos cerca de 1.220 pg/mL, ao menos cerca de 1.230 pg/mL, ao menos cerca de 1.240 pg/mL, ao menos cerca de 1.250 pg/mL, ao menos cerca de 1.260 pg/mL, ao menos 1.270 pg/mL, ao menos 1.280 pg/mL, ao menos 1.290 pg/mL, ao menos cerca de 1.300 pg/mL, ao menos cerca de 1.410 pg/mL, ao menos cerca de 1.420 pg/mL, ao menos cerca de 1.430 pg/mL, ao menos cerca de 1.440 pg/mL, ao menos cerca de 1.450 pg/mL, ao menos cerca de 1.460 pg/mL, ao menos 1.470 pg/mL, ao menos 1.480 pg/mL, ao menos 1.490 pg/mL, ao menos cerca de 1.500 pg/mL, ao menos cerca de 1.510 pg/mL, ao menos cerca de 1.520 pg/mL, ao menos cerca de 1.530 pg/mL, ao menos cerca de 1.540 pg/mL, ao menos cerca de 1.550 pg/mL, ao menos cerca de 1.560 pg/mL, ao menos 1570 pg/mL, ao menos 1580 pg/mL, ao menos 1.590 pg/mL, ao menos cerca de 1.600 pg/mL, ao menos cerca de 1.610 pg/mL, ao menos cerca de 1.620 pg/mL, ao menos cerca de 1.630 pg/mL, ao menos cerca de 1.640 pg/mL, ao menos cerca de 1.650 pg/mL, ao menos cerca de 1.660 pg/mL, ao menos 1.670 pg/mL, ao menos 1680 pg/mL, ao menos 1.690 pg/mL, ao menos cerca de 1.700 pg/mL, ao menos cerca de 1.710 pg/mL, ao menos cerca de 1.720 pg/mL, ao menos cerca de 1.730 pg/mL, ao menos cerca de 1.740 pg/mL, ao menos cerca de 1.750 pg/mL, ao menos cerca de 1.760 pg/mL, ao menos 1.770 pg/mL, ao menos 1.780 pg/mL, ao menos 1.790 pg/mL, ao menos cerca de 1.800 pg/mL, ao menos cerca de 1.810 pg/mL, ao menos cerca de 1.820 pg/mL, ao menos cerca de 1.830 pg/mL, ao menos cerca de 1.840 pg/mL, ao menos cerca de 1.850 pg/mL, ao menos cerca de 1.860 pg/mL, ao menos 1.870 pg/mL, ao menos 1.880 pg/mL, ao menos 1.890 pg/mL, ao menos cerca de

1.900 pg/mL, ao menos cerca de 1.910 pg/mL, ao menos cerca de 1.920 pg/mL, ao menos cerca de 1.930 pg/mL, ao menos cerca de 1.940 pg/mL, ao menos cerca de 1.950 pg/mL, ao menos cerca de 1.960 pg/mL, ao menos 1.970 pg/mL, ao menos 1.980 pg/mL ou ao menos 1.990 pg/mL, ou ao menos cerca de 2.000 pg/mL.

[0195]Em algumas modalidades, a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinal e uma amostra de plasma. Em algumas modalidades, a amostra é uma amostra de sangue total obtida de um ser humano. Em outras modalidades, a amostra é uma amostra de soro obtida de um ser humano. Em ainda outras modalidades, a amostra é uma amostra do fluido cerebroespinal obtida de um ser humano. Em ainda outras modalidades, a amostra é uma amostra de plasma obtida de um ser humano. Em algumas modalidades, a amostra é obtida após o paciente (por exemplo, ser humano) sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente. Em algumas modalidades, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda. Em ainda outras modalidades, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente. Em ainda outras modalidades, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por tremores físicos. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma

lesão ortopédica causada por impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por uma ou mais quedas. Em ainda outra modalidade, a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica decorrente de uma explosão ou detonação.

[0196]Em algumas modalidades, o método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, valores de laboratório do paciente, classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave e tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão ortopédica.

[0197]Em algumas modalidades, o método pode incluir ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT leve com um tratamento para lesão cerebral traumática, conforme descrito abaixo. Em algumas modalidades, o método pode incluir ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT leve, conforme descrito abaixo.

[0198]A natureza do ensaio empregado nos métodos descritos neste documento não é crítica, e o teste pode ser qualquer ensaio conhecido na técnica, tal como, por exemplo, imunoensaios, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, análise química, análise por SDS-PAGE e *Western blot*, ou imunocoloração de proteínas, análise por eletroforese, ensaio de proteínas, ensaio de ligação competitiva, ensaio funcional de proteínas, ou métodos de cromatografia ou espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS). Além disso, o ensaio pode ser realizado em um formato químico clínico tal como seria de conhecimento dos versados na técnica. Esses ensaios são descritos em mais detalhes neste documento nas Seções de 7 a 10. Sabe-se na técnica que os valores (por exemplo,

níveis de referência, cortes, limites, especificidades, sensibilidades, concentrações de calibradores e/ou controles etc.) usados em um ensaio que faz uso de um tipo de amostra específico (por exemplo, tal como um imunoensaio que utiliza o soro ou um dispositivo *point-of-care* que faz uso do sangue total) podem ser extrapolados para outros formatos de ensaio usando técnicas conhecidas no setor, tais como padronização de ensaios. Por exemplo, uma das formas como uma padronização de ensaios pode ser realizada é aplicando um fator ao calibrador usado no ensaio para fazer com que a concentração da amostra seja lida mais alta ou mais baixa a fim de obter uma inclinação que alinhe-se ao método comparador. Outros métodos para padronizar resultados obtidos em um ensaio em outro ensaio são bem conhecidos e foram descritos na literatura (vide, por exemplo, David Wild, *Immunoassay Handbook*, 4^a edição, capítulo 3.5, páginas 315 a 322, cujo conteúdo incorpora-se ao presente documento por referência).

3. Método para ajudar na determinação ou a determinar uma LCT de se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça usando uma combinação de GFAP e UCH-L1

[0199]A presente revelação refere-se, entre outros métodos, a um método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça. O método pode ajudar a determinar se o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve ou LCT moderada a grave. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente também sofreu uma LCT" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, sofreu uma LCT, tal como uma LCT leve, e/ou, mais provavelmente do que não, evidenciará uma descoberta positiva em um procedimento de imagiologia da cabeça, tal como um resultado de IRM da cabeça

positivo ou um resultado de varredura por TC positivo. Além disso, o método pode ser usado para prever quem tende a exibir uma descoberta de imagiologia negativa. Mais especificamente, esse método pode compreender as etapas de: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de GFAP e/ou UCH-L1 na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve ou LCT moderada a grave, quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e/ou (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando (i) o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. A amostra pode ser uma amostra biológica. Mais especificamente, a amostra biológica pode ser uma amostra obtida de um ser humano. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT leve de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, tal como entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 25 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Mais especificamente, em uma modalidade, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em alguns casos, os pacientes exibem níveis de GFAP e UCH-L1 superiores a esse limite superior. Os métodos descritos neste documento são

capazes de avaliar a faixa superior de valores que podem ser encontrados em uma população de pacientes.

[0200]O método também pode ajudar a determinar se o paciente necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, sofreu uma LCT, tal como uma LCT leve ou LCT moderada a grave, e necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça. Mais especificamente, esse método pode compreender as etapas de: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de GFAP e UCH-L1 na amostra; e (a) determinar que o paciente necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT leve de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, tal como entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou o nível de referência de UCH-L1

é entre cerca de 25 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em ainda outras modalidades, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. A amostra pode ser uma amostra biológica.

[0201]A presente revelação também se refere, entre outros métodos, a um método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça se beneficiaria de um procedimento de imagiologia, e portanto o receberia, tal como IRM ou varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente se beneficiaria de um procedimento de imagiologia, e portanto o receberia" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, sofreu uma LCT, tal como uma LCT leve, e, mais provavelmente do que não, evidenciará uma descoberta positiva em um procedimento de imagiologia da cabeça, tal como um resultado de IRM da cabeça positivo ou um resultado de varredura por TC positivo. Mais especificamente, esse método pode compreender as etapas de: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de GFAP ou UCH-L1 na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), tal como uma LCT leve, quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e/ou (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1, e realizar um procedimento de imagiologia na cabeça; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando (i) o nível de GFAP na

amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. A amostra pode ser uma amostra biológica. Em outras modalidades, a amostra pode ser uma amostra de um ser humano.

[0202]Em algumas modalidades, o método pode incluir obter uma amostra dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), de uma lesão ortopédica para o paciente e colocar a amostra em contato com um anticorpo para a GFAP ou com um anticorpo para a UCH-L1 para permitir a formação de um complexo anticorpo e GFAP ou anticorpo e UCH-L1. O método também inclui detectar o complexo anticorpo-GFAP ou o complexo anticorpo-UCH-L1 resultante.

[0203]Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 48 horas da lesão ortopédica, tal como dentro de cerca de 0 a cerca de 4 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 0 a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em outras modalidades, a amostra pode ser coletada do paciente humano dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca

de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas, ou cerca de 25 horas da lesão ortopédica. Em algumas modalidades, o princípio da presença de GFAP e/ou UCH-L1 aparece dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou cerca de 25 horas após a lesão ortopédica.

[0204]Em algumas modalidades, o paciente pode receber um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois de determinar o nível de GFAP e/ou UCH-L1 em um ou mais pontos no tempo. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base em uma TC da cabeça anormal. Em algumas modalidades, o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois de realizar o ensaio. Em algumas modalidades, o paciente exibe uma TC da cabeça normal.

[0205]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática de moderada a grave. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 3 a 12. Em algumas modalidades, suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática leve. Em algumas modalidades, o

nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0206]Em termos gerais, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 também pode ser usado como um referencial em comparação ao qual avaliam-se os resultados obtidos quando do ensaio de uma amostra teste quanto à GFAP e/ou UCH-L1. Em termos gerais, ao fazer essa comparação, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é obtido realizando um ensaio específico por um número suficiente de vezes e em condições apropriadas para que possa-se fazer uma ligação ou associação entre a presença, quantidade ou concentração do analito e um estágio específico ou *endpoint* da LCT ou a indícios específicos. Tipicamente, obtém-se o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 por meio de ensaios com pacientes de referência (ou populações de pacientes de referência). A GFAP e/ou a UCH-L1 medidas podem incluir fragmentos das mesmas, produtos de degradação das mesmas e/ou produtos de clivagem enzimática das mesmas.

[0207]Em certas modalidades, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle que não sofreram uma lesão na cabeça.

[0208]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é determinado por um ensaio com uma sensibilidade (para GFAP e/ou UCH-L1) entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 85%, entre

ao menos cerca de 75% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é de ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 87,5%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%.

[0209]Em algumas modalidades, a especificidade (de GFAP e/ou UCH-L1) é entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 99%, entre ao menos

cerca de 50% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100,0%. Em algumas modalidades, a especificidade é de ao menos cerca de 30,0%, ao menos cerca de 31,0%, ao menos cerca de 32,0%, ao menos cerca de 33,0%, ao menos cerca de 34,0%, ao menos cerca de 35,0%, ao menos cerca de 36,0%, ao menos cerca de 37,0%, ao menos cerca de 38,0%, ao menos cerca de 39,0%, ao menos cerca de 40,0%, ao menos cerca de 45,0%, ao menos cerca de 50,0%, ao menos cerca de 55,0%, ao menos cerca de 60,0%, ao menos cerca de 65,0%, ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 91,0%, ao menos cerca de 92,0%, ao menos cerca de 93,0%, ao

menos cerca de 94,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 96,0%, ao menos cerca de 97,0%, ao menos cerca de 98,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%. Por exemplo, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 75%, a sensibilidade é de ao menos cerca de 90% e a especificidade é de ao menos cerca de 50%; a sensibilidade é de ao menos cerca de 90% e a especificidade é de ao menos cerca de 80%, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 99%, ou a sensibilidade é de ao menos cerca de 100% e a especificidade é de ao menos cerca de 100%.

[0210]Em algumas modalidades, a quantidade de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 10 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos

cerca de 5 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 10 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 45 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 75 pg/mL.

[0211]Em uma modalidade, a quantidade de GFAP é entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 140 pg/mL e cerca de 1.150

pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP pode ser de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP pode ser de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP pode ser de ao menos cerca de 600 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP pode ser de ao menos cerca de 700 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de referência de GFAP pode ser de ao menos cerca de 700 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL.

[0212]Em algumas modalidades, a quantidade de GFAP pode ser de ao menos cerca de 5,0 pg/mL, ao menos cerca de 6,0 pg/mL, ao menos cerca de 7,0 pg/mL, ao menos cerca de 8,0 pg/mL, ao menos cerca de 9,0 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 11 pg/mL, ao menos cerca de 12 pg/mL, ao menos cerca de 13 pg/mL, ao menos cerca de 14 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 16 pg/mL, ao menos cerca de 17 pg/mL, ao menos cerca de 18 pg/mL, ao menos cerca de 19 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 21 pg/mL, ao menos cerca de 22 pg/mL, ao menos cerca de 23 pg/mL, ao menos cerca de 24 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 26 pg/mL, ao menos cerca de 27 pg/mL, ao menos cerca de 28 pg/mL, ao menos cerca de 29 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 31 pg/mL, ao menos cerca de 32 pg/mL, ao menos cerca de 33 pg/mL, ao menos cerca de 34 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 36 pg/mL, ao menos cerca de 37 pg/mL, ao menos cerca de 38 pg/mL, ao menos cerca de 39 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 41 pg/mL, ao menos cerca de 42 pg/mL, ao menos cerca de 43 pg/mL, ao menos cerca de 44 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ao menos cerca de 46 pg/mL, ao menos cerca de 47 pg/mL, ao menos cerca de 48 pg/mL, ao menos cerca de 49 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ao menos cerca de 75 pg/mL, ao menos cerca de 80 pg/mL, ao menos cerca de 90 pg/mL, ao menos

cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 120 pg/mL, ao menos cerca de 130 pg/mL, ao menos cerca de 140 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 160 pg/mL, ao menos cerca de 170 pg/mL, ao menos cerca de 180 pg/mL, ao menos cerca de 190 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 210 pg/mL, ao menos cerca de 220 pg/mL, ao menos cerca de 230 pg/mL, ao menos cerca de 240 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL, ao menos cerca de 260 pg/mL, ao menos cerca de 270 pg/mL, ao menos cerca de 280 pg/mL, ao menos cerca de 290 pg/mL, ao menos cerca de 300 pg/mL, ao menos 310 pg/mL, ao menos 320 pg/mL, ao menos 330 pg/mL, ao menos 340 pg/mL, ao menos cerca de 350 pg/mL, ao menos 360 pg/mL, ao menos 370 pg/mL, ao menos 380 pg/mL, ao menos 390 pg/mL, ao menos cerca de 400 pg/mL, ao menos 410 pg/mL, ao menos 420 pg/mL, ao menos 430 pg/mL, ao menos 440 pg/mL, ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos 460 pg/mL, ao menos 470 pg/mL, ao menos 480 pg/mL, ao menos 490 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos 510 pg/mL, ao menos 520 pg/mL, ao menos 530 pg/mL, ao menos 540 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos 560 pg/mL, ao menos 570 pg/mL, ao menos 580 pg/mL, ao menos 590 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ao menos 610 pg/mL, ao menos 620 pg/mL, ao menos 630 pg/mL, ao menos 640 pg/mL, ao menos cerca de 650 pg/mL, ao menos 660 pg/mL, ao menos 670 pg/mL, ao menos 680 pg/mL, ao menos 690 pg/mL, ao menos cerca de 700 pg/mL, ao menos 710 pg/mL, ao menos 720 pg/mL, ao menos 730 pg/mL, ao menos 740 pg/mL, ao menos cerca de 750 pg/mL, ao menos 760 pg/mL, ao menos 770 pg/mL, ao menos 780 pg/mL, ao menos 790 pg/mL, ao menos cerca de 800 pg/mL, ao menos 810 pg/mL, ao menos 820 pg/mL, ao menos 830 pg/mL, ao menos 840 pg/mL, ao menos cerca de 850 pg/mL, ao menos 860 pg/mL, ao menos 870 pg/mL, ao menos 880 pg/mL, ao menos 890 pg/mL, ao menos cerca de 900 pg/mL, ao menos 910 pg/mL, ao menos 920 pg/mL, ao menos 930 pg/mL, ao menos 940

pg/mL, ao menos cerca de 950 pg/mL, ao menos 960 pg/mL, ao menos 970 pg/mL, ao menos 980 pg/mL, ao menos 990 pg/mL, ao menos cerca de 1.000 pg/mL, ao menos cerca de 1.010 pg/mL, ao menos 1.020 pg/mL, ao menos 1.030 pg/mL, ao menos 1.040 pg/mL, ao menos cerca de 1050 pg/mL, ao menos 1.060 pg/mL, ao menos 1.070 pg/mL, ao menos 1.080 pg/mL, ao menos 1.090 pg/mL, ao menos cerca de 1.100 pg/mL, ao menos cerca de 1.110 pg/mL, ao menos cerca de 1.120 pg/mL, ao menos cerca de 1130 pg/mL, ao menos cerca de 1.140 pg/mL, ou ao menos cerca de 1.150 pg/mL.

[0213]Em outra modalidade, a quantidade de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, tal como entre cerca de 110 pg/ml e cerca de 200 pg/ml. Em algumas modalidades, o nível de referência de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 300

pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 380 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 270 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 120 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 300 pg/mL,

entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 220 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 810 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 750 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 810 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 750 pg/mL, entre ao

menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 600 pg/mL.

[0214]Em algumas modalidades, a quantidade de UCH-L1 é de ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 120 pg/mL, ao menos cerca de 130 pg/mL, ao menos cerca de 140 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 160 pg/mL, ao menos cerca de 170 pg/mL, ao menos cerca de 180 pg/mL, ao menos cerca de 190 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 210 pg/mL, ao menos cerca de 220 pg/mL, ao menos cerca de 230 pg/mL, ao menos cerca de 240 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL, ao menos cerca de 260 pg/mL, ao menos cerca de 270 pg/mL, ao menos cerca de 280 pg/mL, ao menos cerca de 290 pg/mL, ao menos cerca de 300 pg/mL, ao menos 310 pg/mL, ao menos 320 pg/mL, ao menos 330 pg/mL, ao menos 340 pg/mL, ao menos cerca de 350 pg/mL, ao menos 360 pg/mL, ao menos 370 pg/mL, ao menos 380 pg/mL, ao menos 390 pg/mL, ao menos cerca de 400 pg/mL, ao menos 410 pg/mL, ao menos 420 pg/mL, ao menos 430 pg/mL, ao menos 440 pg/mL, ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos 460 pg/mL, ao menos 470 pg/mL, ao menos 480 pg/mL, ao menos 490 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos 510 pg/mL, ao menos 520 pg/mL, ao menos 530 pg/mL, ao menos 540 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos 560 pg/mL, ao menos 570 pg/mL, ao menos 580 pg/mL, ao menos 590 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ao menos 610 pg/mL, ao menos 620 pg/mL, ao menos 630 pg/mL, ao menos 640 pg/mL, ao menos cerca de 650 pg/mL, ao menos 660 pg/mL, ao menos 670 pg/mL, ao menos 680 pg/mL, ao menos 690 pg/mL, ao menos cerca de 700 pg/mL, ao menos 710 pg/mL, ao menos 720 pg/mL, ao menos 730 pg/mL, ao menos 740 pg/mL, ao menos cerca de 750 pg/mL, ao menos 760 pg/mL, ao menos 770 pg/mL, ao menos 780 pg/mL, ao menos 790 pg/mL, ao menos cerca de 800 pg/mL, ao menos 810 pg/mL.

[0215]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL; o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL e o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL; o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL e o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL; o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL e o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL; ou o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL e o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL. Em uma modalidade específica, o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 100 pg/mL.

[0216]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 25 pg/mL e cerca de 700 pg/mL.

[0217]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 6 pg/mL e cerca de 900 pg/mL.

[0218]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e/ou cerca de 4.000 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 2 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL.

[0219]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 4 pg/mL e cerca de 900 pg/mL.

[0220]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 500 pg/mL.

[0221]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e/ou cerca de 4.000 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 7 pg/mL e cerca de 450 pg/mL.

[0222]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 3 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 18 pg/mL e cerca de 350 pg/mL.

[0223]Em ainda outras modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0224]Em ainda outras modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 230 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0225]Em ainda outras modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 195 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0226]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é

entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 275 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0227]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 165 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0228]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0229]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0230]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 1.230 pg/mL.

[0231]Em algumas modalidades, a amostra é coletada dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 315 pg/mL, e/ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0232]Em algumas modalidades, a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma. Em algumas modalidades, a amostra é uma amostra de sangue total de um ser humano. Em outras modalidades, a amostra é uma amostra de soro obtida de um ser humano. Em ainda outras

modalidades, a amostra é uma amostra do fluido cerebroespinhal obtida de um ser humano. Em ainda outra modalidade, a amostra é uma amostra de plasma obtida de um ser humano. Em algumas modalidades, a amostra é obtida após o paciente (por exemplo, um ser humano) sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente. Em algumas modalidades, a amostra é obtida após o paciente (por exemplo, ser humano) sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

[0233]Em algumas modalidades, o método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, valores de laboratório do paciente, classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave e tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão ortopédica.

[0234]Em algumas modalidades, o método pode incluir ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT, tal como uma LCT leve, com um tratamento para lesão cerebral traumática, conforme descrito abaixo. Em algumas modalidades, o método pode incluir ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT, tal como uma LCT leve, conforme descrito abaixo.

[0235]A natureza do ensaio empregado nos métodos descritos neste documento não é crítica, e o teste pode ser qualquer ensaio conhecido na técnica, tal como, por exemplo, imunoensaios, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, *Western blot*, ou imunocoloração de proteínas, ou métodos de espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS). Além disso, o ensaio pode ser realizado em um formato químico clínico ou ensaio de detecção de molécula

única, tal como seria de conhecimento dos versados na técnica. Esses ensaios são descritos em mais detalhes neste documento nas Seções de 7 a 10.

4. Métodos para ajudar no diagnóstico e avaliação de se um paciente humano sofreu uma lesão na cabeça

[0236]A presente revelação refere-se, entre outros métodos, a um método para ajudar no diagnóstico e avaliação de se um paciente humano sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça. O método pode ajudar a determinar se um paciente humano com uma suspeita de lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática, tal como uma lesão cerebral traumática leve ou lesão cerebral traumática moderada a grave. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, tem uma lesão cerebral traumática. O método pode incluir realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente humano dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após uma suspeita de lesão na cabeça para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra e determinar se o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT). Em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP ou o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1. Em algumas modalidades, é determinado que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. A amostra pode ser uma amostra biológica. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1

correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes saudáveis sem lesão de pacientes com uma LCT. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0237]Em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP (i) de cerca de 136 pg/ml a cerca de 181 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 84 a cerca de 99,5, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 64,0%; ou (ii) de cerca de 67 pg/ml a cerca de 135 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 100 a cerca de 160, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,0% e cerca de 75,0%. Em aditamento, ou como alternativa, em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de UCH-L1 na amostra for superior a um nível de referência de GFAP (i) de cerca de 307 pg/ml a cerca de 345 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 24 a cerca de 28, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade de cerca de 30% a cerca de 35%; ou (ii) de cerca de 247 pg/ml a cerca de 301 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 9 a cerca de 13, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 35% e cerca de 43%. Em algumas modalidades, o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP: (a) de cerca de 170 pg/ml a cerca de 180 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 85 a cerca de 87,5, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 61,8%; (b) de cerca de 160 pg/ml a cerca de 169 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha

sofrido uma LCT é de cerca de 87,7 a cerca de 90,2, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%; (c) de cerca de 150 pg/ml a cerca de 159 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 90 a cerca de 92, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%; (d) de cerca de 140 pg/ml a cerca de 149 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 93 a cerca de 98, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 63,3% e cerca de 64,0%; ou (e) de cerca de 105 pg/ml a cerca de 125 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 104 a cerca de 115, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,9% e cerca de 68,2%. Em aditamento, ou como alternativa, em algumas modalidades, o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1: (a) de cerca de 326 pg/ml a cerca de 345 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 24 a cerca de 26, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 31,0% e cerca de 32,5%; (b) de cerca de 290 pg/ml a cerca de 300 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 9,4 a cerca de 10,1, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 35,2% e cerca de 36,7%; ou (c) de cerca de 248 pg/ml a cerca de 262 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 12,0 a cerca de 12,6, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 41,0% e cerca de 42,0%.

[0238]Em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para GFAP for (i) de cerca de 84 a cerca de 99,5 em um ensaio com uma especificidade

de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 64,0%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 136 pg/mL a cerca de 181 pg/mL; ou (ii) de cerca de 100 a cerca de 160 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,0% e cerca de 75,0%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 67 pg/mL a cerca de 135 pg/mL. Em aditamento, ou como alternativa, em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para UCH-L1 é (i) de cerca de 24 a cerca de 28 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade de cerca de 30% a cerca de 35%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 307 pg/mL a cerca de 345 pg/mL; ou (ii) de cerca de 9 a cerca de 12 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 35% a cerca de 43%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é mais superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/mL a cerca de 301 pg/mL. Em algumas modalidades, a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para GFAP é: (ii) de cerca de 85 a cerca de 87,5 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 61,8%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 170 pg/mL a cerca de 180 pg/mL; (ii) de cerca de 87,7 a cerca de 90,2 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 160 pg/mL a cerca de 169 pg/mL; (iii) de cerca de 90 a cerca de 92 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 150 pg/mL a cerca de 159 pg/mL; (iv) de cerca de

93 a cerca de 98 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 63,3% e cerca de 64,0%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 149 pg/mL; ou (v) de cerca de 104 a cerca de 115 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,9% e cerca de 68,2%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 105 pg/mL a cerca de 125 pg/mL. Em aditamento, ou como alternativa, em algumas modalidades, a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para UCH-L1 é (i) de cerca de 24 a cerca de 26 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade de cerca de 31,0% a cerca de 32,5%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 326 pg/mL a cerca de 345 pg/mL; (ii) de cerca de 9,4 a cerca de 10,1 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 35,2% a cerca de 36,7%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 290 pg/mL a cerca de 300 pg/mL; ou (iii) de cerca de 12,0 a cerca de 12,6 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 41,0% a cerca de 42,0%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 248 pg/mL a cerca de 262 pg/mL.

[0239]Em algumas modalidades, o método pode incluir obter uma amostra dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), de uma suspeita de lesão no paciente e colocar a amostra em contato com um anticorpo para a GFAP ou com um anticorpo para a UCH-L1 para permitir a formação de um complexo anticorpo e GFAP ou anticorpo e UCH-L1. O método também inclui detectar o complexo anticorpo-GFAP ou o complexo anticorpo-UCH-L1 resultante.

[0240]Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 48 horas da lesão ou suspeita de lesão na cabeça, tal como dentro de cerca de 0 a cerca de 4 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 0 a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em outras modalidades, a amostra pode ser coletada do paciente humano dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou cerca de 25 horas da lesão ou suspeita de lesão na cabeça. Em algumas modalidades, o princípio da presença de GFAP e/ou UCH-L1 aparece dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas ou cerca de 25 horas após a lesão na cabeça.

[0241]Em algumas modalidades, o paciente pode receber um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois de determinar o nível de GFAP e/ou UCH-L1 em um ou mais pontos no tempo. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base em uma TC da cabeça anormal. Em algumas modalidades, o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois de realizar o ensaio. Em algumas modalidades, o paciente exibe uma TC da cabeça normal.

[0242]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática de moderada a grave. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 3 a 12. Em algumas modalidades, suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática leve. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0243]Em termos gerais, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 também pode ser usado como um referencial em comparação ao qual avaliam-se os resultados obtidos quando do ensaio de uma amostra teste quanto à GFAP e/ou UCH-L1. Em termos gerais, ao fazer essa comparação, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é obtido realizando um ensaio específico por um número suficiente de vezes e em condições apropriadas para que possa-se fazer uma ligação ou associação entre a presença, quantidade ou concentração do analito e um estágio específico ou *endpoint* da LCT ou a indícios específicos. Tipicamente,

obtém-se o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 por meio de ensaios com pacientes de referência (ou populações de pacientes de referência). A GFAP e/ou a UCH-L1 medidas podem incluir fragmentos das mesmas, produtos de degradação das mesmas e/ou produtos de clivagem enzimática das mesmas.

[0244]Em certas modalidades, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle que não sofreram uma lesão na cabeça. Por exemplo, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle saudáveis, tal como pacientes que não sofreram nenhuma lesão. Em certas modalidades, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle que sofreram uma lesão ortopédica mas não sofreram uma lesão na cabeça.

[0245]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é de ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 87,5%, ao menos

cerca de 90,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%.

[0246]Em algumas modalidades, a especificidade é entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 65%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 55%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 45%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 40%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 35%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 30%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 25%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 20%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 15%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 10%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 5%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 0%.

70%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100,0%. Em algumas modalidades, a especificidade é de ao menos cerca de 30,0%, ao menos cerca de 31,0%, ao menos cerca de 32,0%, ao menos cerca de 33,0%, ao menos cerca de 34,0%, ao menos cerca de 35,0%, ao menos cerca de 36,0%, ao menos cerca de 37,0%, ao menos cerca de 38,0%, ao menos cerca de 39,0%, ao menos cerca de 40,0%, ao menos cerca de 45,0%, ao menos cerca de 50,0%, ao menos cerca de 55,0%, ao menos cerca de 60,0%, ao menos cerca de 65,0%, ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 91,0%, ao menos cerca de 92,0%, ao menos cerca de 93,0%, ao menos cerca de 94,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 96,0%, ao menos cerca de 97,0%, ao menos cerca de 98,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%. Por exemplo, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 75%, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao

menos cerca de 99%, ou a sensibilidade é de ao menos cerca de 100% e a especificidade é de ao menos cerca de 100%.

[0247]Em algumas modalidades, a quantidade de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 10 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 75 pg/mL e cerca de 100 pg/mL

[0248]Em algumas modalidades, a quantidade de GFAP pode ser de ao menos cerca de 5,0 pg/mL, ao menos cerca de 6,0 pg/mL, ao menos cerca de 7,0 pg/mL, ao menos cerca de 8,0, pg/mL, ao menos cerca de 9,0 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ou ao menos cerca de 100 pg/mL.

[0249]Em outra modalidade, a quantidade de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de

100 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 300 pg/mL,

pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 600 pg/mL.

[0250]Em algumas modalidades, a quantidade de UCH-L1 é de ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL, ao menos cerca de 300 pg/mL, ao menos cerca de 350 pg/mL, ao menos cerca de 400 pg/mL, ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ao menos cerca de 650 pg/mL, ao menos cerca de 700 pg/mL, ao menos cerca de 750 pg/mL, ao menos cerca de 800 pg/mL, ao menos cerca de 850 pg/mL, ao menos cerca de 900 pg/mL, ao menos cerca de 950 pg/mL, ao menos cerca de 1.000 pg/mL, ao menos cerca de 1.500 pg/mL, ou ao menos cerca de 2.000 pg/mL.

[0251]Em algumas modalidades, o método inclui ainda tratar o paciente humano determinado como tendo sofrido uma lesão cerebral traumática com um tratamento para lesão cerebral traumática, conforme descrito abaixo. Em algumas modalidades, o método inclui ainda monitorar o paciente humano avaliado como tendo uma lesão cerebral traumática, conforme descrito abaixo.

[0252]A natureza do ensaio empregado nos métodos descritos neste documento não é crítica, e o teste pode ser qualquer ensaio conhecido na técnica, tal como, por exemplo, imunoensaios, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, *Western blot*, ou imunocoloração de proteínas, ou métodos de espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS). Além disso, o ensaio pode ser realizado em um formato químico clínico ou ensaio de detecção de molécula única, tal como seria de conhecimento dos versados na técnica. Esses ensaios são descritos em mais detalhes neste documento nas Seções de 7 a 10.

5. Métodos para ajudar no diagnóstico e avaliação de se um paciente humano sofreu ou pode ter sofrido uma LCT leve ou uma LCT moderada a grave

[0253]Em algumas modalidades, a presente revelação refere-se, entre outros métodos, a um método para ajudar no diagnóstico e avaliação de se um paciente humano sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça. O método pode ajudar a determinar se um paciente humano com uma suspeita de lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática leve. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática leve" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, tem uma lesão cerebral traumática leve. Como alternativa, o método pode ajudar a determinar se um paciente humano com uma suspeita de lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática moderada a grave. Conforme usado neste documento, "determinar se o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática moderada a grave" refere-se ao fato de que o método supramencionado pode ser usado, por exemplo, junto com outras informações (por exemplo, dados de avaliação clínica), para determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, tem uma lesão cerebral traumática moderada a grave. O

método pode incluir realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente humano dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), após uma suspeita de lesão na cabeça para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e/ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra e determinar se o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT). Em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT leve quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1. Em algumas modalidades, é determinado que o paciente não sofreu uma LCT leve quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. Em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1. Em algumas modalidades, é determinado que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1. A amostra pode ser uma amostra biológica. Em algumas modalidades, a amostra biológica é obtida de um ser humano. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve e distinguem pacientes com uma LCT leve de pacientes saudáveis sem lesão. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 205 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL, entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.300 pg/mL, ou entre cerca de 1.500 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL, e/ou em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre

cerca de 215 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL, entre cerca de 220 pg/mL e cercas de 3.000 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 950 pg/mL, entre cerca de 970 pg/mL e cerca de 2.100 pg/mL, entre cerca de 2.300 pg/mL e cerca de 3.000 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada a grave e distinguem pacientes com uma LCT moderada a grave de pacientes com uma LCT leve ou de pacientes saudáveis sem lesão.

[0254]Em algumas modalidades, determina-se que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP (i) de cerca de 19 pg/ml a cerca de 27 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 71 a cerca de 99, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 81% e cerca de 86%. Como alternativa, ou em aditamento, em algumas modalidades, determina-se que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando o nível de UCH-L1 na amostra for superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 94 pg/ml a cerca de 106 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 38 a cerca de 48, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 70% a cerca de 75%. Em ainda outras modalidades, determina-se que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP (i) de cerca de 20 pg/ml a cerca de 25 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 76,6 a cerca de 94,2, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 82,7% e cerca de 85,5%. Como alternativa, ou em aditamento, em algumas modalidades, determina-se que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando o nível de UCH-L1 na amostra for superior ao nível de referência de UCH-L1 de cerca de 95

pg/ml a cerca de 105 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 39,5 a cerca de 46,4, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 71,0% e cerca de 74,3%.

[0255]Em algumas modalidades, determina-se que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP for de cerca de 71 a cerca de 99 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 81% e cerca de 86%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 19 pg/mL a cerca de 27 pg/mL. Como alternativa, ou em aditamento, em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT leve quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 for de cerca de 38 a cerca de 48 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 70% a cerca de 75%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 94 pg/mL a cerca de 106 pg/mL. Em ainda outras modalidades, determina-se que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP for de cerca de 76,6 a cerca de 94,2 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 82,7% e cerca de 85,5%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 20 pg/mL a cerca de 25 pg/mL. Como alternativa, ou em aditamento, em algumas modalidades, determina-se que o paciente sofreu uma LCT leve quando a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 for de cerca de 39,5 a cerca de 46,4 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 71,0% a cerca de 74,3%, em que o nível de UCH-L1 na

amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 95 pg/mL a cerca de 105 pg/mL.

[0256]Em algumas modalidades, o método pode incluir obter uma amostra dentro de cerca de 48 horas, tal como dentro de cerca de 24 horas (por exemplo, de zero a cerca de 25 horas), de uma suspeita de lesão no paciente e colocar a amostra em contato com um anticorpo para a GFAP ou com um anticorpo para a UCH-L1 para permitir a formação de um complexo anticorpo e GFAP ou anticorpo e UCH-L1. O método também inclui detectar o complexo anticorpo-GFAP ou o complexo anticorpo-UCH-L1 resultantes.

[0257]Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 48 horas da lesão ou suspeita de lesão na cabeça, tal como dentro de cerca de 0 a cerca de 4 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 0 a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 0 a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, uma amostra é coletada do paciente humano dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas, dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas, dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas, dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas, dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, e dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em outras modalidades, a amostra pode ser coletada do paciente humano dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas, ou cerca de 25 horas da lesão ou suspeita de lesão

na cabeça. Em algumas modalidades, o princípio da presença de GFAP e/ou UCH-L1 aparece dentro de cerca de 0 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, cerca de 19 horas, cerca de 20 horas, cerca de 21 horas, cerca de 22 horas, cerca de 23 horas, cerca de 24 horas, ou cerca de 25 horas após a lesão na cabeça.

[0258]Em algumas modalidades, o paciente pode receber um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois de determinar o nível de GFAP e/ou UCH-L1 em um ou mais pontos no tempo. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em certas modalidades, pode haver suspeita de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base em uma TC da cabeça anormal. Em algumas modalidades, o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois de realizar o ensaio. Em algumas modalidades, o paciente exibe uma TC da cabeça normal.

[0259]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática de moderada a grave. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 3 a 12. Em algumas modalidades, suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a pacientes com uma lesão cerebral traumática leve. Em algumas modalidades, o

nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 correlaciona-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0260]Em termos gerais, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 também pode ser usado como um referencial em comparação ao qual avaliam-se os resultados obtidos quando do ensaio de uma amostra teste quanto à GFAP e/ou UCH-L1. Em termos gerais, ao fazer essa comparação, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é obtido realizando um ensaio específico por um número suficiente de vezes e em condições apropriadas para que possa-se fazer uma ligação ou associação entre a presença, quantidade ou concentração do analito e um estágio específico ou *endpoint* da LCT ou a indícios específicos. Tipicamente, obtém-se o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 por meio de ensaios com pacientes de referência (ou populações de pacientes de referência). A GFAP e/ou a UCH-L1 medidas podem incluir fragmentos das mesmas, produtos de degradação das mesmas e/ou produtos de clivagem enzimática das mesmas.

[0261]Em certas modalidades, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle que não sofreram uma lesão na cabeça. Por exemplo, o nível de referência pode correlacionar-se a pacientes controle saudáveis, tal como pacientes que não sofreram nenhuma lesão.

[0262]Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP e/ou UCH-L1 é determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 99%, entre ao menos

cerca de 75% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 75% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%. Em algumas modalidades, a sensibilidade é de ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 87,5%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 95,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%.

[0263]Em algumas modalidades, a especificidade é entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 30% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 40% e cerca de 50%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 95%, entre

ao menos cerca de 50% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 50% e cerca de 60%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 60% e cerca de 70%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 80%, entre ao menos cerca de 70% e cerca de 75%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90%, entre ao menos cerca de 80% e cerca de 85%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 100%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 99%, entre ao menos cerca de 90% e cerca de 95%, entre ao menos cerca de 95% e cerca de 99%, ou entre ao menos cerca de 95% e cerca de 100,0%. Em algumas modalidades, a especificidade é de ao menos cerca de 30,0%, ao menos cerca de 31,0%, ao menos cerca de 32,0%, ao menos cerca de 33,0%, ao menos cerca de 34,0%, ao menos cerca de 35,0%, ao menos cerca de 36,0%, ao menos cerca de 37,0%, ao menos cerca de 38,0%, ao menos cerca de 39,0%, ao menos cerca de 40,0%, ao menos cerca de 45,0%, ao menos cerca de 50,0%, ao menos cerca de 55,0%, ao menos cerca de 60,0%, ao menos cerca de 65,0%, ao menos cerca de 70,0%, ao menos cerca de 75,0%, ao menos cerca de 80,0%, ao menos cerca de 85,0%, ao menos cerca de 90,0%, ao menos cerca de 91,0%, ao menos cerca de 92,0%, ao menos cerca de 93,0%, ao menos cerca de 94,0%, ao menos cerca de

95,0%, ao menos cerca de 96,0%, ao menos cerca de 97,0%, ao menos cerca de 98,0%, ao menos cerca de 99,0%, ao menos cerca de 99,1%, ao menos cerca de 99,2%, ao menos cerca de 99,3%, ao menos cerca de 99,4%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,6%, ao menos cerca de 99,7%, ao menos cerca de 99,8%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100,0%. Por exemplo, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 75%, a sensibilidade é de ao menos cerca de 99% e a especificidade é de ao menos cerca de 99%, ou a sensibilidade é de ao menos cerca de 100% e a especificidade é de ao menos cerca de 100%.

[0264]Em algumas modalidades, a quantidade de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de GFAP pode ser entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 10 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 15 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 75 pg/mL.

[0265]Em algumas modalidades, a quantidade de GFAP pode ser de ao menos cerca de 5,0 pg/mL, ao menos cerca de 6,0 pg/mL, ao menos cerca de 7,0 pg/mL, ao menos cerca de 8,0, pg/mL, ao menos cerca de 9,0 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35

pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ou ao menos cerca de 75 pg/mL.

[0266]Em outra modalidade, a quantidade de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL. Em algumas modalidades, o nível de referência de UCH-L1 pode ser entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500

pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 600 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.500 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 900 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 800 pg/mL, entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 700 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 600 pg/mL.

[0267]Em algumas modalidades, a quantidade de UCH-L1 é de ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL, ao menos cerca de 300 pg/mL, ao menos cerca de 350 pg/mL, ao menos cerca de 400 pg/mL, ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ao menos cerca de 650 pg/mL, ao menos cerca de 700 pg/mL, ao menos cerca de 750 pg/mL, ao menos cerca de 800 pg/mL, ao menos cerca de 850 pg/mL,

ao menos cerca de 900 pg/mL, ao menos cerca de 950 pg/mL, ao menos cerca de 1.000 pg/mL, ao menos cerca de 1.500 pg/mL, ou ao menos cerca de 2.000 pg/mL.

[0268]Em algumas modalidades, os métodos descritos neste documento proporcionam ajuda no diagnóstico de se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça possui uma lesão cerebral traumática (LCT) moderada a grave. Em um aspecto, o método compreende as etapas de:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão real ou suspeita de lesão para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e/ou nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL; ou

determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL.

[0269]Em outro aspecto, o nível de referência para determinar se o paciente sofreu uma LCT moderada a grave para uso no método acima é de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 215 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 215 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.360 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 215 pg/mL a cerca de 880 pg/mL para UCH-L1; de

cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.900 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.800 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.700 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.600 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL e/ou o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.400 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.300 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.200 pg/mL para UCH-L1; ou de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.100 pg/mL para UCH-L1.

[0270]Em ainda outros aspectos deste método, o nível de referência para determinar se um paciente sofreu uma LCT moderada a grave para cada uma de GFAP e UCH-L1 é dado na Tabela A abaixo. A Tabela A também traz as especificidades e sensibilidades para cada um dos níveis de referência de GFAP e UCH-L1:

Tabela A

UCH-L1	GFAP	Sensibilidade	Especificidade
2000	235	93%	50%
2000	265	92%	52%
2000	380	91%	61%
2000	465	90%	65%
2000	435	90%	64%

UCH-L1	GFAP	Sensibilidade	Especificidade
2000	420	90%	63%
2000	540	89%	68%
2000	600	88%	70%
2000	645	87%	72%
2000	655	86%	72%
2000	690	85%	73%
2000	720	84%	74%
2000	835	83%	77%
2000	890	82%	78%
2000	895	81%	78%
2000	950	80%	79%

[0271]Em ainda outro aspecto do método acima, o nível de referência para determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave é de cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 110 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 110 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 125 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 125 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 130 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 130 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 150 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 160 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 170 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 200 pg/mL para UCH-L1; ou de cerca de 170 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1.

[0272]Em ainda outro aspecto do método acima, o nível de referência para determinar que um paciente não sofreu uma LCT moderada a grave no método acima é de cerca de 160 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 165 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 155 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 150 pg/mL para GFAP ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 200 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 195 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 190 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; de cerca de 185 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; ou de cerca de 180 pg/mL para GFAP ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1.

[0273]Em algumas modalidades, o método inclui ainda tratar o paciente humano avaliado como tendo uma lesão cerebral traumática moderada a grave com um tratamento para lesão cerebral traumática, conforme descrito abaixo. Em algumas modalidades, o método inclui ainda monitorar o paciente humano avaliado como tendo uma lesão cerebral traumática leve, conforme descrito abaixo.

[0274]A natureza do ensaio empregado nos métodos descritos neste documento não é crítica, e o teste pode ser qualquer ensaio conhecido na técnica, tal como, por exemplo, imunoensaios, ensaio químico clínico, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, *Western blot*, ou imunocoloração de proteínas, ou métodos de espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS). Além disso, o ensaio pode ser realizado em um formato químico clínico ou ensaio de detecção de molécula única, tal como seria de conhecimento dos versados na técnica. Esses ensaios são descritos em mais detalhes neste documento nas Seções de 7 a 10.

6. Tratamento e Monitoramento de Pacientes Sofrendo de Lesão Cerebral Traumática

[0275]O paciente identificado ou avaliado nos métodos descritos acima como tendo uma lesão cerebral traumática, tal como uma lesão cerebral traumática leve ou lesão cerebral traumática moderada a grave, pode ser tratado ou monitorado. Em algumas modalidades, o método inclui ainda tratar o paciente humano avaliado como tendo uma lesão cerebral traumática com um tratamento para lesão cerebral traumática, tal como quaisquer tratamentos conhecidos na técnica. Por exemplo, o tratamento para lesão cerebral traumática pode assumir uma variedade de formas dependendo da gravidade da lesão na cabeça. Por exemplo, no caso de pacientes sofrendo de uma LCT leve, o tratamento pode incluir um ou mais dentre abster-se de eventos que agravem os sintomas (tais como esportes), evitar a luz ou usar óculos escuros quando em ambientes externos luminosos, controle dos sintomas tal como via medicação para alívio da dor de cabeça ou enxaqueca, medicamento anti-náusea etc. O tratamento para pacientes sofrendo de uma LCT grave pode incluir a administração de um ou mais medicamentos apropriados (tais como, por exemplo, diuréticos, medicamentos anticonvulsivos, medicamentos para sedar e colocar o indivíduo em coma induzido por fármaco, ou outros medicamentos farmacêuticos ou biofarmacêuticos (ou conhecidos ou desenvolvidos no futuro para tratamento de LCT), um ou mais procedimentos cirúrgicos (tais como, por exemplo, remoção de um hematoma, reparo de uma fratura no crânio, craniectomia descompressiva etc.) e uma ou mais terapias (tais como, por exemplo, uma ou mais dentre reabilitação, terapia comportamental cognitiva, controle da raiva, orientação psicológica etc.). Em algumas modalidades, o método inclui ainda monitorar o paciente humano avaliado como tendo uma lesão cerebral traumática (por exemplo, lesão cerebral traumática leve ou moderada a grave). Em algumas modalidades, um paciente identificado como tendo uma lesão cerebral traumática, tal como uma lesão cerebral traumática leve ou lesão cerebral traumática grave, pode ser monitorado com varredura por TC ou IRM.

7. Métodos para medir o nível de UCH-L1

[0276]Nos métodos descritos acima, os níveis de UCH-L1 podem ser medidos por qualquer meio, tal como métodos dependentes de anticorpo, tais como imunoensaios, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, análise química, análise por SDS-PAGE e *Western blot*, imunocoloração de proteínas, análise por eletroforese, ensaio de proteínas, ensaio de ligação competitiva, ensaio funcional de proteínas, ou métodos de cromatografia ou espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS). Além disso, o ensaio pode ser realizado em um formato químico clínico tal como seria de conhecimento dos versados na técnica.

[0277]Em algumas modalidades, medir o nível de UCH-L1 inclui colocar a amostra em contato com um primeiro membro de ligação específica e um segundo membro de ligação específica. Em algumas modalidades, o primeiro membro de ligação específica é um anticorpo de captura e o segundo membro de ligação específica é um anticorpo de detecção. Em algumas modalidades, medir o nível de UCH-L1 inclui colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) ao menos um anticorpo de captura (por exemplo, anticorpo de captura de UCH-L1), que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura-antígeno UCH-L1 (por exemplo, um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1), e (2) ao menos um anticorpo de detecção (por exemplo, anticorpo de detecção de UCH-L1), que inclui um marcador detectável e liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura, para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção (por exemplo, complexo antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1), de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção (por exemplo, um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo

de detecção de UCH-L1) se forme, e medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção.

[0278]Em algumas modalidades, o método compreende ainda um terceiro membro de ligação específica, tal como um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[0279]Em algumas modalidades, o primeiro membro de ligação específica é imobilizado em um suporte sólido. Em algumas modalidades, o segundo membro de ligação específica é imobilizado em um suporte sólido. Em algumas modalidades, o primeiro membro de ligação específica é um anticorpo da UCH-L1 conforme descrito abaixo.

[0280]Em algumas modalidades, a amostra é diluída ou não diluída. A amostra pode ser de cerca de 1 a cerca de 25 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 24 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 23 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 22 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 21 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 20 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 18 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 17 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 16 microlitros, cerca de 15 microlitros ou cerca de 1 microlitro, cerca de 2 microlitros, cerca de 3 microlitros, cerca de 4 microlitros, cerca de 5 microlitros, cerca de 6 microlitros, cerca de 7 microlitros, cerca de 8 microlitros, cerca de 9 microlitros, cerca de 10 microlitros, cerca de 11 microlitros, cerca de 12 microlitros, cerca de 13 microlitros, cerca de 14 microlitros, cerca de 15 microlitros, cerca de 16 microlitros, cerca de 17 microlitros, cerca de 18 microlitros, cerca de 19 microlitros, cerca de 20 microlitros, cerca de 21 microlitros, cerca de 22 microlitros, cerca de 23 microlitros, cerca de 24 microlitros ou cerca de 25 microlitros. Em algumas modalidades, a amostra é de cerca de 1 a cerca de 150 microlitros ou menos ou de cerca de 1 a cerca de 25 microlitros ou menos.

[0281]Alguns instrumentos (tais como, por exemplo, o instrumento ARCHITECT® da Abbott Laboratories, e outros instrumentos de laboratório centrais) que não um dispositivo *point-of-care* podem ser capazes de medir níveis de UCH-L1 em uma amostra superiores ou mais altos do que 25.000 pg/mL.

[0282]Outros métodos de detecção incluem o uso de um dispositivo de nanoporos ou nanopoços, por exemplo, para a detecção de molécula única, ou podem ser adaptados para o uso nele. Exemplos de dispositivos de nanoporos são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161402, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Exemplos de dispositivos de nanopoços são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161400, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Outros dispositivos e métodos apropriados para a detecção de molécula única também podem ser empregados.

8. Métodos para medir o nível de GFAP

[0283]Nos métodos descritos acima, os níveis de GFAP podem ser medidos por qualquer meio, tal como métodos dependentes de anticorpo, tais como imunoensaios, imunoprecipitação de proteínas, imunoelétroforese, análise química, análise por SDS-PAGE e *Western blot*, imunocoloração de proteínas, análise por eletroforese, ensaio de proteínas, ensaio de ligação competitiva, ensaio funcional de proteínas, ou métodos de cromatografia ou espectrometria, tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC/MS). Além disso, o ensaio pode ser realizado em um formato químico clínico tal como seria de conhecimento dos versados na técnica.

[0284]Em algumas modalidades, medir o nível de GFAP inclui colocar a amostra em contato com um primeiro membro de ligação específica e um segundo membro de ligação específica. Em algumas modalidades, o primeiro membro de ligação específica é um anticorpo de captura e o segundo membro de ligação

específica é um anticorpo de detecção. Em algumas modalidades, medir o nível de GFAP inclui colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) ao menos um anticorpo de captura (por exemplo, anticorpo de captura de GFAP), que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura-antígeno GFAP (por exemplo, um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP), e (2) ao menos um anticorpo de detecção (por exemplo, anticorpo de detecção de GFAP), que inclui um marcador detectável e liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo anticorpo de captura, para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção (por exemplo, complexo antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP), de tal modo que a um complexo ao menos um anticorpo de captura-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção (por exemplo, um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP) se forme, e medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura-antígeno GFAP-anticorpo de detecção.

[0285]Em algumas modalidades, o primeiro membro de ligação específica é imobilizado em um suporte sólido. Em algumas modalidades, o segundo membro de ligação específica é imobilizado em um suporte sólido. Em algumas modalidades, o primeiro membro de ligação específica é um anticorpo de GFAP conforme descrito abaixo.

[0286]Em algumas modalidades, a amostra é diluída ou não diluída. A amostra pode ser de cerca de 1 a cerca de 25 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 24 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 23 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 22 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 21 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 20 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 18 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 17 microlitros, de cerca de 1 a cerca de 16 microlitros, cerca de 15 microlitros ou cerca

de 1 microlitro, cerca de 2 microlitros, cerca de 3 microlitros, cerca de 4 microlitros, cerca de 5 microlitros, cerca de 6 microlitros, cerca de 7 microlitros, cerca de 8 microlitros, cerca de 9 microlitros, cerca de 10 microlitros, cerca de 11 microlitros, cerca de 12 microlitros, cerca de 13 microlitros, cerca de 14 microlitros, cerca de 15 microlitros, cerca de 16 microlitros, cerca de 17 microlitros, cerca de 18 microlitros, cerca de 19 microlitros, cerca de 20 microlitros, cerca de 21 microlitros, cerca de 22 microlitros, cerca de 23 microlitros, cerca de 24 microlitros ou cerca de 25 microlitros. Em algumas modalidades, a amostra é de cerca de 1 a cerca de 150 microlitros ou menos ou de cerca de 1 a cerca de 25 microlitros ou menos.

[0287]Alguns instrumentos (tais como, por exemplo, o instrumento ARCHITECT® da Abbott Laboratories, e outros instrumentos de laboratório centrais) que não um dispositivo *point-of-care* podem ser capazes de medir níveis de GFAP em uma amostra superiores ou mais altos do que 50.000 pg/mL.

[0288]Outros métodos de detecção incluem o uso de um dispositivo de nanoporos ou nanopoços, por exemplo, para a detecção de molécula única, ou podem ser adaptados para o uso nele. Exemplos de dispositivos de nanoporos são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161402, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Exemplos de dispositivos de nanopoços são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161400, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Outros dispositivos e métodos apropriados para a detecção de molécula única também podem ser empregados.

9. Anticorpos

[0289]Os métodos descritos neste documento podem utilizar um anticorpo isolado que se ligue especificamente à GFAP e/ou UCH-L1.

a. Anticorpos da UCH-L1

[0290]Os métodos descritos neste documento podem utilizar um anticorpo isolado que ligue-se especificamente à hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 ("UCH-L1") (ou a fragmentos da mesma), chamado de "anticorpo da UCH-L1". Os anticorpos da UCH-L1 podem ser usados para avaliar a condição da UCH-L1 como uma medida de lesão cerebral traumática, detectar a presença de UCH-L1 em uma amostra, quantificar a UCH-L1 presente em uma amostra, ou detectar a presença de UCH-L1 em uma amostra e quantificá-la.

(1) Hidrolase Carbóxi-Terminal da Ubiquitina L1 (UCH-L1)

[0291]A hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 ("UCH-L1"), que também é conhecida como "hidrolase C-terminal da ubiquitina", é uma enzima desubiquitinante. A UCH-L1 é um membro de uma família de genes cujos produtos hidrolisam pequenos adutos C-terminais da ubiquitina para gerar o monômero ubiquitina. A expressão da UCH-L1 é altamente específica a neurônios e a células do sistema neuroendócrino difuso e seus tumores. Ela se faz abundantemente presente em todos os neurônios (responde por 1% a 2% do total de proteínas no cérebro), expressa especificamente nos neurônios e testículos/ovários. A tríade catalítica da UCH-L1 contém uma cisteína na posição 90, um aspartato na posição 176 e uma histidina na posição 161, que são responsáveis por sua atividade hidrolase.

[0292]A UCH-L1 humana pode ter a sequência de aminoácidos a seguir:

MQLKPMEINPEMLNKVLSRLGVAGQWRFVDVLGLEEESLGSVPAPACALLLFPLTAQHENFRKKQIEELKGQEVS PKVYFMKQTIGNSCGTIGLIHAVANNQDKLGFEDGSVLKQFLSETEKMSPEDRAKCFEKNEAIQAAHDAVAQEGQCRVDDKVNHFILFNNVDGHL YELDGRMPFPVNHGASSED TLLKDAAKVCREFTEREQGEVRFSVALCKAA (SEQ ID N^º: 1).

[0293]A UCH-L1 humana pode ser um fragmento ou uma variante da SEQ ID N^º: 1. O fragmento da UCH-L1 pode ter entre 5 e 225 aminoácidos, entre 10 e

225 aminoácidos, entre 50 e 225 aminoácidos, entre 60 e 225 aminoácidos, entre 65 e 225 aminoácidos, entre 100 e 225 aminoácidos, entre 150 e 225 aminoácidos, entre 100 e 175 aminoácidos, ou entre 175 e 225 aminoácidos de comprimento. O fragmento pode compreender um número contíguo de aminoácidos da SEQ ID N°: 1.

(2) Anticorpo de Reconhecimento da UCH-L1

[0294]O anticorpo é um anticorpo que liga-se à UCH-L1, a um fragmento da mesma, a um epítopo da UCH-L1, ou a uma variante do mesmo. O anticorpo pode ser um fragmento do anticorpo anti-UCH-L1 ou uma variante ou derivado do mesmo. O anticorpo pode ser um anticorpo policlonal ou monoclonal. O anticorpo pode ser um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia única, um anticorpo de afinidade maturada, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo totalmente humano ou um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fab, ou uma mistura desses. Fragmentos ou derivados de anticorpo podem compreender fragmentos F(ab')₂, Fv ou scFv. Os derivados de anticorpo podem ser produzidos por peptideomiméticos. Além disso, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única.

[0295]Os anticorpos anti-UCH-L1 podem ser um anticorpo anti-UCH-L1 quimérico ou anticorpo anti-UCH-L1 humanizado. Em uma modalidade, tanto o anticorpo humanizado quanto o anticorpo quimérico são monovalentes. Em uma modalidade, tanto o anticorpo humanizado quanto o anticorpo quimérico compreendem uma única região Fab ligada a uma região Fc.

[0296]Anticorpos humanos podem ser derivados da tecnologia *Phage Display* ou de camundongos transgênicos que expressem genes da imunoglobulina humana. O anticorpo humano pode ser gerado como resultado de uma resposta imunológica humana *in vivo* e isolado. Consulte, por exemplo, Funaro *et al.*, *BMC Biotechnology*, 2008(8):85. Logo, o anticorpo pode ser um produto do repertório humano e não animal. Como é de origem humana, os riscos de reatividade contra

autoantígenos pode ser minimizado. Como alternativa, bibliotecas *display* de leveduras padrão e tecnologias *display* podem ser usadas para selecionar e isolar anticorpos anti-UCH-L1 humanos. Por exemplo, bibliotecas de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) humanos virgens podem ser usados para selecionar anticorpos anti-UCH-L1 humanos. Animais transgênicos podem ser usados para expressar anticorpos humanos.

[0297]Anticorpos humanizados podem ser moléculas de anticorpo de um anticorpo de uma espécie não humana que liga-se ao antígeno desejado com uma ou mais regiões determinantes de complementariedade (CDRs) da espécie não humana e com regiões de *framework* de uma molécula de imunoglobulina humana.

[0298]O anticorpo é discernível dos anticorpos conhecidos porque possui funções biológicas diferentes dos anticorpos conhecidos na técnica.

i. Epítopo

[0299]O anticorpo pode ligar-se imunoespecificamente à UCH-L1 (SEQ ID N°: 1), a um fragmento da mesma ou a uma variante da mesma. O anticorpo pode reconhecer imunoespecificamente e ligar-se a pelo menos três aminoácidos, pelo menos quatro aminoácidos, pelo menos cinco aminoácidos, pelo menos seis aminoácidos, pelo menos sete aminoácidos, pelo menos oito aminoácidos, pelo menos nove aminoácidos, ou pelo menos dez aminoácidos dentro de uma região de epítopo. O anticorpo pode reconhecer imunoespecificamente e ligar-se a um epítopo que possui pelo menos três aminoácidos contíguos, pelo menos quatro aminoácidos contíguos, pelo menos cinco aminoácidos contíguos, pelo menos seis aminoácidos contíguos, pelo menos sete aminoácidos contíguos, pelo menos oito aminoácidos contíguos, pelo menos nove aminoácidos contíguos, ou pelo menos dez aminoácidos contíguos de uma região de epítopo.

(3) Exemplos de anticorpos anti-UCH-L1

[0300]Anticorpos anti-UCH-L1 podem ser gerados usando as técnicas descritas neste documento bem como usando técnicas rotineiras conhecidas no setor. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-UCH-L1 pode ser um anticorpo da UCH-L1 não conjugado, tal como anticorpos da UCH-L1 disponibilizados pela United State Biological (Número de Catálogo: 031320), Cell Signaling Technology (Número de Catálogo: 3524), Sigma-Aldrich (Número de Catálogo: HPA005993), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Números de Catálogo: sc-58593 ou sc-58594), R&D Systems (Número de Catálogo: MAB6007), Novus Biologicals (Número de Catálogo: NB600-1160), Biorbyt (Número de Catálogo: orb33715), Enzo Life Sciences, Inc. (Número de Catálogo: ADI-905-520-1), Bio-Rad (Número de Catálogo: VMA00004), BioVision (Número de Catálogo: 6130-50), Abcam (Números de Catálogo: ab75275 ou ab104938), Invitrogen Antibodies (Número de Catálogo: 480012), ThermoFisher Scientific (Números de Catálogo: MA1-46079, MA5-17235, MA1-90008 ou MA1-83428), EMD Millipore (Número de Catálogo: MABN48) ou Sino Biological Inc. (Número de Catálogo: 50690-R011). O anticorpo anti-UCH-L1 pode ser conjugado a um fluoróforo, tal como anticorpos da UCH-L1 conjugados disponibilizados pela BioVision (Número de Catálogo: 6960-25) ou Aviva Systems Biology (Números de Catálogo: OAAF01904-FITC). Outros anticorpos da UCH-L1 que podem ser usados nos métodos descritos neste documento incluem os descritos na WO 2018/081649, cujo conteúdo incorpora-se ao presente documento por referência.

b. Anticorpos da GFAP

[0301]Os métodos descritos neste documento podem utilizar um anticorpo isolado que ligue-se especificamente à proteína ácida fibrilar glial ("GFAP") (ou a fragmentos da mesma), chamado de "anticorpo da GFAP". Os anticorpos da GFAP podem ser usados para avaliar a condição da GFAP como uma medida de lesão cerebral traumática, detectar a presença de GFAP em uma amostra, quantificar a

GFAP presente em uma amostra, ou detectar a presença de GFAP em uma amostra e quantificá-la.

(1) Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

[0302]A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é uma proteína filamentosa intracitoplasmica de 50 kDa que constitui uma parte do citoesqueleto nos astrócitos e provou-se o marcador mais específico para células de origem astrocítica. A proteína GFAP é codificada pelo gene GFAP nos seres humanos. A GFAP é o principal filamento intermediário dos astrócitos maduros. No domínio bastonado central da molécula, a GFAP compartilha de considerável homologia estrutural com os demais filamentos intermediários. A GFAP está envolvida na motilidade e formato dos astrócitos ao prover-lhes estabilidade estrutural para os processos astrocíticos. A proteína ácida fibrilar glial e seus produtos de decomposição (GFAP-BDP) são proteínas específicas do cérebro liberadas no sangue como parte da resposta patofisiológica após uma lesão cerebral traumática (LCT). Após uma lesão no SNC humano causada por traumatismo, transtornos genéticos ou produtos químicos, os astrócitos proliferam-se e exibem hipertrofia extensiva do corpo celular e dos processos celulares, e a GFAP é notadamente suprarregulada. Em contrapartida, com a crescente malignidade dos astrócitos, há progressiva queda na produção de GFAP. A GFAP também pode ser detectada em células de Schwann, células da glia entérica, neoplasias das glândulas salivares, carcinomas renais metastáticos, cartilagem epiglótica, pituícitos, oligodendrócitos imaturos, meningiomas papilares, e células mioepiteliais da mama.

[0303]A GFAP humana pode ter a sequência de aminoácidos a seguir:

MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRV
 DFSLAGALNAGFKETRASERAEMMELNDRFASYIEKVRFLEQQNKALAAELNQLRA
 KEPTKLADVYQAEELRELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLATVRQKLQDETNLR
 LEAENNLAAYRQEADEATLARLDLERKIESLEEEIRFLRKIHEEEVRELQEQLARQQV

HVELDVAKPDLTAALKEIRTQYEAMASSNMHEAEEWYRSKFADLTAAARNAELLR QAKHEANDYRRQLQSLTCLESRGTNESLERQMREQEERHVREAASYQEALRL EEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLGEENRITIPVQTFSNLQIR ETSLDTKSVSEGHLKRNIVVKTVEMRDGEGVIKESKQEHKDVM (SEQ ID N^º: 2).

[0304]A GFAP humana pode ser um fragmento ou uma variante da SEQ ID N^º: 2. O fragmento da GFAP pode ter entre 5 e 400 aminoácidos, entre 10 e 400 aminoácidos, entre 50 e 400 aminoácidos, entre 60 e 400 aminoácidos, entre 65 e 400 aminoácidos, entre 100 e 400 aminoácidos, entre 150 e 400 aminoácidos, entre 100 e 300 aminoácidos, ou entre 200 e 300 aminoácidos de comprimento. O fragmento pode compreender um número contíguo de aminoácidos da SEQ ID N^º: 2. O fragmento da GFAP humana ou variante da SEQ ID N^º: 2 podem ser um produto de decomposição (BDP) da GFAP. O BDP da GFAP pode ter 38 kDa, 42 kDa (mais débil 41 kDa), 47 kDa (mais débil 45 kDa); 25 kDa (mais débil 23 kDa); 19 kDa, ou 20 kDa.

[0305]Descobriu-se que usar ao menos dois anticorpos que liguem-se a epítopos não sobrepostos dentro de produtos da decomposição (BDP) da GFAP, tais como o BDP de 38 kDa definido pelos aminoácidos 60 a 383 da sequência da proteína GFAP (SEQ ID N^º:2), pode ajudar a manter a faixa dinâmica e a sensibilidade mínima dos imunoensaios. Em um aspecto, ao menos dois anticorpos ligam-se a epítopos não sobrepostos próximos ao terminal N do BDP de 38 kDa. Em um aspecto, ao menos dois anticorpos ligam-se a epítopos não sobrepostos entre os aminoácidos 60 a 383 da SEQ ID N^º: 2. Em outro aspecto, ao menos um primeiro anticorpo (tal como um anticorpo de captura) liga-se a um epítopo próximo ao terminal N do BDP de 38 kDa e ao menos um segundo anticorpo (tal como um anticorpo de detecção) liga-se a um epítopo próximo ao centro do BDP de 38 kDa que não sobrepõe-se ao primeiro anticorpo. Em outro aspecto, ao menos um primeiro anticorpo (tal como um anticorpo de captura) liga-se a um epítopo entre os

aminoácidos 60 a 383 da SEQ ID N°: 2 e ao menos um segundo anticorpo liga-se a um epítopo entre os aminoácidos 60 a 383 da SEQ ID N°: 2 que não sobrepõem-se ao primeiro anticorpo. O epítopo ligado ao primeiro anticorpo pode ter 10 aminoácidos, 11 aminoácidos, 12 aminoácidos, 13 aminoácidos, 14 aminoácidos ou 15 aminoácidos de comprimento. O epítopo ligado ao segundo anticorpo pode ter 10 aminoácidos, 11 aminoácidos, 12 aminoácidos, 13 aminoácidos, 14 aminoácidos ou 15 aminoácidos de comprimento. Os versados na técnica podem determinar prontamente anticorpos que ligam-se a epítopos não sobrepostos dentro do BDP de 38 kDa definido pelos aminoácidos 60 a 383 da SEQ ID N°: 2 usando técnicas rotineiras conhecidas no setor.

[0306]Outrossim, é possível selecionar outros anticorpos que similarmente ajudem a manter a faixa dinâmica e sensibilidade mínima dos imunoensaios. Por exemplo, pode ser útil selecionar ao menos um primeiro anticorpo (tal como um anticorpo de captura) que ligue-se a um epítopo próximo ao terminal N do BDP de 38 kDa e ao menos um segundo anticorpo (tal como um anticorpo de detecção) que ligue-se a um epítopo próximo ao centro do BDP de 38 kDa, por exemplo, próximo ao centro do BDP de 38 kDa, e que não sobrepõe-se ao primeiro anticorpo. Outras variações são possíveis e podem ser prontamente testadas pelos versados na técnica, tal como ao confirmar que anticorpos ligam-se a diferentes epítopos examinando a ligação com peptídeos curtos, e em seguida triar pares de anticorpos usando baixa concentração de calibradores. Ademais, a seleção de anticorpos de diferentes afinidades pela GFAP também pode ajudar a manter ou aumentar a faixa dinâmica do ensaio. Anticorpos da GFAP são descritos na literatura e encontram-se disponíveis na praça.

(2) Anticorpo de reconhecimento da GFAP

[0307]O anticorpo é um anticorpo que liga-se à GFAP, a um fragmento da mesma, a um epítopo da GFAP, ou a uma variante do mesmo. O anticorpo pode ser

um fragmento do anticorpo anti-GFAP ou uma variante ou derivado do mesmo. O anticorpo pode ser um anticorpo policlonal ou monoclonal. O anticorpo pode ser um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia única, um anticorpo de afinidade maturada, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo totalmente humano ou um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fab, ou uma mistura desses. Fragmentos ou derivados de anticorpo podem compreender fragmentos F(ab')₂, Fv ou scFv. Os derivados de anticorpo podem ser produzidos por peptideomiméticos. Além disso, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única.

[0308]Os anticorpos anti-GFAP podem ser um anticorpo anti-GFAP quimérico ou anticorpo anti-GFAP humanizado. Em uma modalidade, tanto o anticorpo humanizado quanto o anticorpo quimérico são monovalentes. Em uma modalidade, tanto o anticorpo humanizado quanto o anticorpo quimérico compreendem uma única região Fab ligada a uma região Fc.

[0309]Anticorpos humanos podem ser derivados da tecnologia *Phage Display* ou de camundongos transgênicos que expressem genes da imunoglobulina humana. O anticorpo humano pode ser gerado como resultado de uma resposta imunológica humana *in vivo* e isolado. Consulte, por exemplo, Funaro *et al.*, *BMC Biotechnology*, 2008(8):85. Logo, o anticorpo pode ser um produto do repertório humano e não animal. Como é de origem humana, os riscos de reatividade contra autoantígenos pode ser minimizado. Como alternativa, bibliotecas *display* de leveduras padrão e tecnologias *display* podem ser usadas para selecionar e isolar anticorpos anti-GFAP humanos. Por exemplo, bibliotecas de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) humanos virgens podem ser usados para selecionar anticorpos anti-GFAP humanos. Animais transgênicos podem ser usados para expressar anticorpos humanos.

[0310]Anticorpos humanizados podem ser moléculas de anticorpo de um anticorpo de uma espécie não humana que liga-se ao antígeno desejado com uma ou mais regiões determinantes de complementariedade (CDRs) da espécie não humana e com regiões de *framework* de uma molécula de imunoglobulina humana.

[0311]O anticorpo é discernível dos anticorpos conhecidos porque possui funções biológicas diferentes dos anticorpos conhecidos na técnica.

i. Epítopo

[0312]O anticorpo pode ligar-se imunoespecificamente à GFAP (SEQ ID N°: 2), a um fragmento da mesma ou a uma variante da mesma. O anticorpo pode reconhecer imunoespecificamente e ligar-se a pelo menos três aminoácidos, pelo menos quatro aminoácidos, pelo menos cinco aminoácidos, pelo menos seis aminoácidos, pelo menos sete aminoácidos, pelo menos oito aminoácidos, pelo menos nove aminoácidos, ou pelo menos dez aminoácidos dentro de uma região de epítopo. O anticorpo pode reconhecer imunoespecificamente e ligar-se a um epítopo que possui pelo menos três aminoácidos contíguos, pelo menos quatro aminoácidos contíguos, pelo menos cinco aminoácidos contíguos, pelo menos seis aminoácidos contíguos, pelo menos sete aminoácidos contíguos, pelo menos oito aminoácidos contíguos, pelo menos nove aminoácidos contíguos, ou pelo menos dez aminoácidos contíguos de uma região de epítopo.

(3) Exemplos de anticorpos anti-GFAP

[0313]Anticorpos anti-GFAP podem ser gerados usando as técnicas descritas neste documento bem como usando técnicas rotineiras conhecidas no setor. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-GFAP pode ser um anticorpo da GFAP não conjugado, tal como anticorpos da GFAP disponibilizados pela Dako (Número de Catálogo: M0761), ThermoFisher Scientific (Números de Catálogo: MA5-12023, A-21282, 13-0300, MA1-19170, MA1-19395, MA5-15086, MA5-16367, MA1-35377, MA1-06701 ou MA1-20035), AbCam (Números de Catálogo: ab10062,

ab4648, ab68428, ab33922, ab207165, ab190288, ab115898 ou ab21837), EMD Millipore (Números de Catálogo: FCMAB257P, MAB360, MAB3402, 04-1031, 04-1062, MAB5628), Santa Cruz (Números de Catálogo: sc-166481, sc-166458, sc-58766, sc-56395, sc-51908, sc-135921, sc-71143, sc-65343 ou sc-33673), Sigma-Aldrich (Números de Catálogo: G3893 ou G6171) ou Sino Biological Inc. (Número de Catálogo: 100140-R012-50). O anticorpo anti-GFAP pode ser conjugado a um fluoróforo, tal como anticorpos da GFAP conjugados disponibilizados pela ThermoFisher Scientific (Números de Catálogo: A-21295 ou A-21294), EMD Millipore (Números de Catálogo: MAB3402X, MAB3402B, MAB3402B ou MAB3402C3) ou AbCam (Números de Catálogo: ab49874 ou ab194325). Outros anticorpos de GFAP que podem ser usados nos métodos descritos neste documento incluem os descritos na WO 2018/081649, cujo conteúdo incorpora-se ao presente documento por referência.

c. Preparo/Produção de Anticorpos

[0314]Anticorpos podem ser preparados por qualquer uma de uma variedade de técnicas, incluindo aquelas bem conhecidas pelos versados na técnica. Em termos gerais, anticorpos podem ser produzidos por técnicas de cultura celular, incluindo a geração de anticorpos monoclonais via técnicas convencionais, ou via transfecção de genes de anticorpo, cadeias pesadas e/ou cadeias leves em células hospedeiras bacterianas ou mamíferas adequadas, a fim de permitir a produção de anticorpos, em que os anticorpos podem ser recombinantes. Tenciona-se que as várias formas do termo "transfecção" abrangem uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procarionte ou eucarionte, por exemplo, eletroporação, precipitação de cálcio-fósforo, transfecção de DEAE-dextrano e seus semelhantes. Embora seja possível expressar os anticorpos em células hospedeiras procariontes ou eucariontes, a expressão de anticorpos em células eucariontes é preferível, e mais preferivelmente

em células hospedeiras mamíferas, porque essas células eucariontes (e em particular células mamíferas) têm mais chance do que as células procariontes de unir-se e secretar um anticorpo adequadamente dobrado e imunologicamente ativo.

[0315] Exemplos de células hospedeiras mamíferas para expressar os anticorpos recombinantes incluem células do Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980)), usadas com um marcador selecionável da DHFR, por exemplo, conforme descrito em Kaufman e Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982), células do mieloma NS0, células COS, e células SP2. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras mamíferas, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, a secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão.

[0316] Células hospedeiras também podem ser usadas para produzir fragmentos de anticorpo funcionais, tais como fragmentos Fab ou moléculas de scFv. Percebe-se-á que é possível fazer variações ao procedimento acima. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com fragmentos funcionais codificadores de DNA da cadeia leve e/ou da cadeia pesada de um anticorpo. A tecnologia de DNA recombinante também pode ser usada para remover uma parte do DNA que codifica uma ou ambas as cadeias leve e pesada que não é necessário para ligar-se aos抗ígenos de interesse, ou todo ele. As moléculas expressas a partir dessas moléculas de DNA truncadas também são abrangidas pelos anticorpos. Além disso, é possível produzir anticorpos bifuncionais em que uma cadeia pesada e uma cadeia leve são um anticorpo (isto é, ligam-se a um

analito, por exemplo, troponina I, UCH-L1 ou GFAP humana) e as outras cadeias pesada e leve são específicas para um antígeno que não o analito ao reticular um anticorpo a um segundo anticorpo por meio de métodos de reticulação química padrão.

[0317]Em um sistema preferido para a expressão recombinante de um anticorpo, ou da porção de ligação com antígeno do mesmo, um vetor de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada do anticorpo quanto a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células dhfr-CHO por meio de transfecção mediada por cálcio de fosfato. Dentro do vetor de expressão recombinante, cada um dos genes de cadeia pesada e leve do anticorpo liga-se operacionalmente a elementos reguladores do intensificador de CMV/promotor de AdMLP para mobilizar altos níveis de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também carrega um gene DHFR, que permite a seleção de células CHO que foram transferidas com o vetor usando a seleção/amplificação do metotrexato. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesada e leve do anticorpo e o anticorpo é recuperado do meio de cultura. Técnicas de biologia molecular padrão são usadas para preparar o vetor de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, selecionar transformantes, cultivar as células hospedeiras, e recuperar o anticorpo do meio de cultura. Além do mais, o método para sintetizar um anticorpo recombinante pode se dar cultivando uma célula hospedeira em um meio de cultura adequado até que um anticorpo recombinante seja sintetizado. O método pode compreender ainda isolar o anticorpo recombinante do meio de cultura.

[0318]Métodos para preparar anticorpos monoclonais envolvem o preparo de linhas celulares imortais capazes de produzir anticorpos com a especificidade desejada. Essas linhas celulares podem ser produzidas a partir de células do baço obtidas de um animal imunizado. O animal pode ser imunizado com o analito (por

exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) ou um fragmento e/ou variante do mesmo. O peptídeo usado para imunizar o animal pode compreender aminoácidos que codificam o Fc humano, por exemplo, a região cristalizável do fragmento ou região de cauda do anticorpo humano. As células do baço podem ser então imortalizadas, por exemplo, pela fusão com um parceiro de fusão celular do mieloma. Uma variedade de técnicas de fusão pode ser empregada. Por exemplo, as células do baço e células do mieloma podem ser combinadas a um detergente não iônico por alguns poucos minutos e, em seguida, plaqueadas a baixa densidade em um meio seletivo que sustenta o crescimento de células híbridas, mas não de células do mieloma. Uma técnica desse tipo utiliza a seleção de hipoxantina, aminopterina, timidina (HAT). Outra técnica inclui a eletrofusão. Após tempo suficiente, tipicamente cerca de 1 a 2 semanas, observam-se colônias de híbridos. Colônias simples são selecionadas e seus sobrenadantes de cultura testados quanto à atividade de ligação em relação ao polipeptídeo. Hibridomas com alta reatividade e especificidade podem ser usados.

[0319]Anticorpos monoclonais podem ser isolados dos sobrenadantes das colônias de hibridoma em crescimento. Além disso, várias técnicas podem ser empregadas para intensificar o rendimento, tais como injeção da linha celulares de hibridoma na cavidade peritoneal de um hospedeiro vertebrado adequado, tal como um camundongo. Anticorpos monoclonais podem ser então coletados do fluido ascítico ou do sangue. Os contaminantes podem ser removidos dos anticorpos por meio de técnicas convencionais, tais como cromatografia, filtragem em gel, precipitação e extração. A cromatografia de afinidade é um exemplo de um método que pode ser usado em um processo para purificar os anticorpos.

[0320]A enzima proteolítica papaína preferencialmente cliva as moléculas de IgG para produzir vários fragmentos, cada dois dos quais (os fragmentos F(ab)) compreendem um heterodímero covalente que inclui um sítio de ligação com

antígeno intacto. A enzima pepsina é capaz de clivar moléculas de IgG para obter vários fragmentos, incluindo o fragmento F(ab')₂, que compreende ambos os sítios de ligação com antígeno.

[0321]O fragmento Fv pode ser produzido pela clivagem proteolítica preferencial de uma IgM e, em raras ocasiões, de moléculas de imunoglobulina IgG ou IgA. O fragmento Fv pode ser derivado usando técnicas recombinantes. O fragmento Fv inclui um heterodímero VH::VL não covalente que inclui um sítio de ligação com antígeno que retém muito das capacidades de reconhecimento e ligação com antígeno da molécula de anticorpo nativa.

[0322]O anticorpo, fragmento de anticorpo ou derivado podem compreender um conjunto de regiões determinantes de complementariedade ("CDR") de cadeia pesada e cadeia leve dispostas, respectivamente, entre *frameworks* ("FR") de cadeia pesada e cadeia leve que dão suporte às CDRs e definem a relação espacial das CDRs em relação uma à outra. O conjunto de CDRs pode conter três regiões hipervariáveis de uma região V de cadeia pesada ou leve.

[0323]Outros métodos adequados para produzir ou isolar anticorpos da especificidade exigida podem ser usados, incluindo, entre outros, métodos que selecionam um anticorpo recombinante de uma biblioteca de peptídeos ou proteínas (por exemplo, entre outros, um bacteriófago, ribossomo, oligonucleotídeo, RNA, cDNA, levedura ou seus semelhantes, biblioteca *display*); por exemplo, conforme disponibilizada por vários fornecedores comerciais tais como a Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Scotland, Reino Unido) Biolnvent (Lund, Suécia), usando métodos conhecidos na técnica. Vide as Patentes dos EUA nº 4.704.692, 5.723.323, 5.763.192, 5.814.476, 5.817.483, 5.824.514, 5.976.862. Métodos alternativos contam com a imunização de animais transgênicos (por exemplo, camundongos SCID, Nguyen *et al.* (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Sandhu *et al.* (1996)

Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al. (1998) *Immunol.* 93:154-161) que são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos, como é de conhecimento no setor e/ou conforme descrito neste documento. Essas técnicas incluem, entre outras, *display* de ribossomos (Hanes et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:14130-14135); tecnologias para a produção de anticorpos de célula única (por exemplo, método de produção de anticorpos por linfócitos selecionados ("SLAM") (Patente dos EUA nº 5.627.052, Wen et al. (1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcock et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848); microgotículas de gel e citometria de fluxo (Powell et al. (1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass); Gray et al. (1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; Kenny et al. (1995) *Bio/Technol.* 13:787-790); seleção de células B (Steenbakkers et al. (1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134 (1994)).

[0324]Um anticorpo de afinidade maturada pode ser produzido por qualquer um de vários procedimentos conhecidos no setor. Por exemplo, Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992) descrevem a maturação da afinidade por embaralhamento dos domínios VH e VL. A mutagênese randômica de resíduos da CDR e/ou *framework* é descrita por Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). A mutação seletiva em posições de mutagênese selecionadas e em posições de contato ou hipermutação com um resíduo de aminoácido intensificador de atividade é descrita na Patente dos EUA nº 6.914.128 B1.

[0325]Variantes de anticorpo também podem ser preparadas distribuindo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo a um hospedeiro adequado, tal como para obter animais ou mamíferos transgênicos, como bodes, bois, cavalos, carneiros e

seus semelhantes, que produzirão esses anticorpos em seu leite. Esses métodos são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes dos EUA nº 5.827.690, 5.849.992, 4.873.316, 5.849.992, 5.994.616, 5.565.362, e 5.304.489.

[0326] Variantes de anticorpo também podem ser preparadas distribuindo um polinucleotídeo para obter vegetais transgênicos e células vegetais cultivadas (por exemplo, entre outros, tabaco, milho e lentilha-d'água) que produzirão esses anticorpos, porções especificadas ou variantes dos mesmos em partes do vegetal ou em células cultivadas a partir delas. Por exemplo, Cramer *et al.* (1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 e as referências citadas por eles descrevem a produção de folhas de tabaco transgênicas que expressam grandes quantidades de proteínas recombinantes, por exemplo, usando um promotor induzível. A milho transgênica é usada para expressar proteínas mamíferas em níveis de produção comercial, com atividades biológicas equivalentes às produzidas em outros sistemas recombinantes ou purificadas de fontes naturais. Consulte, por exemplo, Hood *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* (1999) 464:127-147 e as referências citadas por eles. Variantes de anticorpo também foram produzidas em grandes quantidades a partir de sementes vegetais transgênicas incluindo fragmentos de anticorpo, tais como anticorpos de cadeia única (scFv's), inclusive sementes de tabaco e tubérculos de batata. Consulte, por exemplo, Conrad *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 e as referências citadas por eles. Sendo assim, anticorpos também podem ser produzidos usando vegetais transgênicos, de acordo com métodos conhecidos.

[0327] Derivados de anticorpo podem ser produzidos, por exemplo, adicionando sequências exógenas para modificar a imunogenicidade ou reduzir, intensificar ou modificar a ligação, afinidade, constante associação, constante dissociação, avidez, especificidade, meia-vida ou qualquer outra característica adequada. Em termos gerais, parte das ou todas as sequências de CDR não humanas ou humanas são mantidas, ao passo que as sequência não humanas das

regiões variáveis e constantes são substituídas por aminoácidos humanos ou outros aminoácidos.

[0328]Pequenos fragmentos de anticorpo podem ser diacorpos com dois sítios de ligação com antígeno, em que os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH VL). Consulte, por exemplo, EP 404,097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448. Ao usar um ligante que é curto demais para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criam dois sítios de ligação com antígeno. Consulte também a Patente dos EUA nº 6.632.926 em nome de Chen *et al.*, a qual incorpora-se ao presente documento na íntegra e revela variantes de anticorpo que têm um ou mais aminoácidos inseridos em uma região hipervariável do anticorpo-pai e uma afinidade de ligação por um antígeno alvo que é ao menos cerca de duas vezes mais forte do que a afinidade de ligação do anticorpo-pai pelo antígeno.

[0329]O anticorpo pode ser um anticorpo linear. O procedimento para produzir um anticorpo linear é conhecido no setor e descrito em Zapata *et al.*, (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062. Em suma, esses anticorpos compreendem um par de segmentos Fd tandem (VH-CH1-VH-CH1) que formam um par de regiões de ligação com antígeno. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

[0330]Os anticorpos podem ser recuperados e purificados a partir de culturas de células recombinantes por meio de métodos conhecidos, incluindo, entre outros, purificação da proteína A, precipitação de sulfato de amônio ou etanol, extração de ácido, cromatografia por troca de ânions ou cátions, cromatografia em fosfocelulose, cromatografia de interação hidrofóbia, cromatografia de afinidade, cromatografia em hidroxiapatita e cromatografia em lectina. A cromatografia líquida de alto desempenho ("HPLC") também pode ser usada para purificação.

[0331]Ela pode ser útil para marcar detectavelmente o anticorpo. Métodos para conjugar anticorpos a esses agentes são conhecidos no setor. À guisa meramente de ilustração, os anticorpos podem ser marcados com um grupamento detectável, tal como um átomo radioativo, um cromóforo, um fluoróforo, ou algo do gênero. Esses anticorpos marcados podem ser utilizados para técnicas diagnósticas, ou *in vivo*, ou em uma amostra de teste isolada. Eles podem ser ligados a uma citocina, a um ligante, a outro anticorpo. Agentes adequados para acoplar-se a anticorpos a fim de obter um efeito antitumoral incluem citocinas, tais como interleucina 2 (IL-2) e Fator de Necrose Tumoral (TNF); fotossensibilizantes, para uso na terapia fotodinâmica, incluindo tetrassulfonato de alumínio (III) ftalocianina, hematoporfirina e ftalocianina; radionuclídeos, tais como iodo-131 (131I), ítrio-90 (90Y), bismuto-212 (212Bi), bismuto-213 (213Bi), tecnécio-99m (99mTc), rênio-186 (186Re), e rênio-188 (188Re); antibióticos, tais como doxorrubicina, adriamicina, daunorrubicina, metotrexato, daunomicina, neocarzinostatina, e carboplatina; toxinas bacterianas, vegetais e outras toxinas, tais como toxina da difteria, exotoxina A da *pseudomonas*, enterotoxina A estafilocócica, toxina abrina-A, ricina A (ricina A desglicosilada e ricina A nativa), toxina TGF-alfa, citotoxina da naja chinesa (*naja atra*), e gelonina (uma toxina vegetal); proteínas inativadoras de ribossomo de vegetais, bactérias e fungos, tais como restrictocina (uma proteína inativadora de ribossomo produzida pela *Aspergillus restrictus*), saporina (uma proteína inativadora de ribossomo da *Saponaria officinalis*), e RNase; inibidores da tirosina quinase; ly207702 (um nucleosídeo purina difluorada); lipossomos contendo agentes anticíclicos (por exemplo, oligonucleotídeos antisentido, plasmídeos que codificam toxinas, metotrexato etc.); e outros anticorpos ou fragmentos de anticorpo, tais como F(ab).

[0332]A produção de anticorpos pelo uso da tecnologia hibridoma, o método de produção de anticorpos por linfócitos selecionados (SLAM), animais transgênicos, e bibliotecas de anticorpos recombinantes são descritos em mais detalhes abaixo.

(1) Anticorpos monoclonais anti-analito usando a tecnologia hibridoma

[0333]Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas no setor incluindo o uso das tecnologias hibridoma, recombinante e *phage display*, ou uma combinação dessas. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando técnicas de hibridoma incluindo as conhecidas no setor e ensinadas, por exemplo, em Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, segunda edição, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, *et al.*, *In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, (Elsevier, N.Y., 1981). Note-se também que o termo "anticorpo monoclonal", conforme usado neste documento, não se limita a anticorpos produzidos através da tecnologia hibridoma. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que deriva de um único clone, incluindo qualquer clone eucarionte, procarionte ou fágico, e não ao método pelo qual é produzido.

[0334]Métodos para gerar anticorpos monoclonais, bem como anticorpos produzidos pelo método, podem compreender cultivar uma célula de hibridoma que secreta um anticorpo, em que, de preferência, o hibridoma é gerado ao fusionar esplenócitos isolados de um animal, por exemplo, de um rato ou camundongo, imunizado com o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) com células mieloma e, em seguida, triar os hibridomas resultantes da fusão em busca de clones de hibridoma que secretam um anticorpo capaz de ligar-se a um polipeptídeo. Em suma, os ratos podem ser imunizados com um antígeno analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Em uma modalidade preferida, o antígeno analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) é administrado junto com um adjuvante para estimular a resposta imunológica. Esses adjuvantes incluem adjuvante de Freund completo ou

incompleto, RIBI (dipeptídeos de muramila) ou ISCOM (complexos imunoestimulantes). Esses adjuvantes podem proteger o polipeptídeo contra a rápida dispersão ao sequestrá-lo em um depósito local, ou eles podem conter substâncias que estimulem o hospedeiro a secretar fatores que sejam quimiotáticos para macrófagos e outros componentes do sistema imunológico. De preferência, se um polipeptídeo estiver sendo administrado, o cronograma de imunização envolverá duas ou mais administrações do polipeptídeo, espaçadas em várias semanas; porém, uma única administração do polipeptídeo também pode ser usada.

[0335]Após a imunização de um animal com um antígeno analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), anticorpos e/ou células produtoras de anticorpo podem ser obtidos do animal. Um soro contendo anticorpo anti-analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) é obtido do animal sangrando ou sacrificando o mesmo. O soro pode ser usado à medida em que é obtido do animal, uma fração de imunoglobulina pode ser obtida do soro, ou os anticorpos anti-analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) podem ser purificados a partir do soro. O soro ou imunoglobulinas obtidos dessa maneira são policlonais, tendo assim uma gama de propriedades heterogênea.

[0336]Uma vez detectada uma resposta imunológica, por exemplo, anticorpos específicos ao antígeno analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) serem detectados no soro do rato, o baço do rato é coletado e os esplenócitos isolados. Os esplenócitos são então fusionados por técnicas bem conhecidas a células de mieloma adequadas, por exemplo, células da linha celular SP20 disponibilizadas pela American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., EUA). Os hibridomas são selecionados e clonados por diluição limitada. Os clones de hibridoma são então avaliados por métodos conhecidos na técnica quanto a células que secretam anticorpos capazes de ligar-se a um analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). O

fluido ascítico, que geralmente contém altos níveis de anticorpos, pode ser gerado imunizando ratos com clones de hibridoma positivos.

[0337]Em outra modalidade, hibridomas produtores de anticorpo imortalizados podem ser preparados a partir do animal imunizado. Após a imunização, o animal é sacrificado e as células B esplênicas são fusionadas a células de mieloma imortalizadas como é bem conhecido na técnica. Consulte, por exemplo, Harlow e Lane, *supra*. Em uma modalidade preferida, as células de mieloma não secretam polipeptídeos de imunoglobulina (uma linha celular não secretora). Após a fusão e seleção do antibiótico, os hibridomas são triados usando o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), ou parte dele, ou uma célula que expressa o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Em uma modalidade preferida, a triagem inicial é realizada usando um ensaio imunossorvente ligado por enzima (ELISA) ou um radioimunoensaio (RIA), de preferência ELISA. Um exemplo de triagem por ELISA é proposto na Publicação PCT nº WO 00/37504.

[0338]Hibridromas produtores de anticorpo anti-analito (*por exemplo*, GFAP e/ou UCH-L1) são selecionados, clonados e adicionalmente triados quanto a características desejáveis, incluindo crescimento robusto de hibridoma, alta produção de anticorpos e características de anticorpo desejáveis. Os hibridomas podem ser cultivados e expandidos *in vivo* em animais singênicos, em animais que carecem de um sistema imunológico, por exemplo, camundongos *nude*, ou em uma cultura de células *in vitro*. Métodos para selecionar, clonar e expandir hibridomas são bem conhecidos pelos versados na técnica.

[0339]Em uma modalidade preferida, os hibridomas são hibridomas de rato. Em outra modalidade, os hibridomas são produzidos em uma espécie não humana nem de rato, tal como em camundongos, carneiros, porcos, bodes, bois ou cavalos. Em ainda outra modalidade preferida, os hibridomas são hibridomas humanos, em

que um mieloma não secretor humano é fusionado a uma célula humana que expressa um anticorpo anti-analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1).

[0340]Fragments de anticorpo que reconhecem epítopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, fragmentos Fab e F(ab')₂ podem ser produzidos pela clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina usando enzimas tais como papaína (para produzir dois fragmentos Fab idênticos) ou pepsina (para produzir um fragmento F(ab')₂). Um fragmento F(ab')₂ de uma molécula de IgG retém os dois sítios de ligação com antígeno da molécula de IgG maior ("mãe"), incluindo ambas as cadeias leves (que contêm as regiões de cadeia leve variável e cadeia leve constante), os domínios CH1 das cadeias pesadas, e uma região de dobradiça formadora de dissulfeto da molécula de IgG mãe. Logo, um fragmento F(ab')₂ ainda é capaz de reticular moléculas de antígeno assim como a molécula de IgG-mãe.

(2) Anticorpos monoclonais anti-analito usando SLAM

[0341]Em outro aspecto, anticorpos recombinantes são gerados a partir de linfócitos simples e isolados usando um procedimento chamado na técnica de método de produção de anticorpos por linfócitos selecionados (SLAM), conforme descrito na Patente dos EUA nº 5.627.052; Publicação PCT nº WO 92/02551; e Babcock *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7843-7848 (1996). Nesse método, anticorpos secretores de células única de interesse, por exemplo, linfócitos derivados de qualquer um dos animais imunizados, são triados usando um ensaio em placa hemolítica de antígeno específico, em que o antígeno analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), uma subunidade do analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), ou um fragmento do mesmo, liga-se a glóbulos vermelhos de carneiro usando um ligante, tal como biotina, e é usado para identificar células simples que secretam anticorpos com especificidade pelo analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Após a identificação de células secretoras de anticorpo de interesse, os cDNAs das

regiões variáveis de cadeia pesada e leve são resgatados das células por transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) e essas regiões variáveis podem ser então expressas, no contexto de regiões de imunoglobulina constantes apropriadas (por exemplo, regiões constantes humanas), em células hospedeiras mamíferas, tais como células COS ou CHO. As células hospedeiras transfectadas com as sequências de imunoglobulina amplificadas, derivadas de linfócitos selecionados *in vivo*, podem ser então submetidas a nova análise e seleção *in vitro*, por exemplo, garimpando as células transfectadas para isolar células que expressem anticorpos contra o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). As sequências de imunoglobulina amplificadas podem ser adicionalmente manipuladas *in vitro*, tal como pelo método de maturação da afinidade *in vitro*. Consulte, por exemplo, a Publicação PCT nº WO 97/29131 e a Publicação PCT nº WO 00/56772.

(3) Anticorpos monoclonais anti-analito usando animais transgênicos

[0342]Em outra modalidade, anticorpos são produzidos imunizando um animal não humano que compreende alguns dos lócus de imunoglobulina humanos (ou todos eles) com um antígeno analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Em uma modalidade, o animal não humano é um camundongo transgênico XENOMOUSE®, uma linhagem de camundongo desenvolvida em laboratório que compreende grandes fragmentos dos lócus de imunoglobulina humanos e é deficiente na produção de anticorpos de camundongo. Consulte, por exemplo, Green *et al.*, *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994) e a Patente dos EUA nº 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, e 6.130.364. Consulte também as Publicações PCT nº WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, e WO 00/37504. O camundongo transgênico XENOMOUSE® produz um repertório humano do tipo adulto de anticorpos totalmente humanos e gera anticorpos monoclonais humanos de

antígeno específico. O camundongo transgênico XENOMOUSE® contém cerca de 80% do repertório de anticorpos humanos graças à introdução de fragmentos YAC com configuração de linha germinativa em dimensões de megabase dos lócus de cadeia pesada humanas e lócus de cadeia leve x. Consulte Mendez *et al.*, *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), Green e Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998), cujas revelações incorporam-se ao presente documento por referência.

(4) Anticorpos monoclonais anti-analito usando bibliotecas de anticorpos recombinantes

[0343]Métodos *in vitro* também podem ser usados para produzir os anticorpos, em que uma biblioteca de anticorpos é triada para identificar um anticorpo com a especificidade de ligação com o analito desejado (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Métodos para essa triagem de bibliotecas de anticorpos recombinantes são bem conhecidos na técnica e incluem métodos descritos, por exemplo, na Patente dos EUA nº 5.223.409 (Ladner *et al.*); Publicação PCT nº WO 92/18619 (Kang *et al.*); Publicação PCT nº WO 91/17271 (Dower *et al.*); Publicação PCT nº WO 92/20791 (Winter *et al.*); Publicação PCT nº WO 92/15679 (Markland *et al.*); Publicação PCT nº WO 93/01288 (Breitling *et al.*); Publicação PCT nº WO 92/01047 (McCafferty *et al.*); Publicação PCT nº WO 92/09690 (Garrard *et al.*); Fuchs *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); Publicação de Pedido de Patente dos EUA nº 2003/0186374; e Publicação

PCT nº WO 97/29131, o conteúdo de cada uma das quais incorpora-se ao presente documento por referência.

[0344]A biblioteca de anticorpos recombinantes pode ser de um paciente imunizado com o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) ou com uma porção do analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Como alternativa, a biblioteca de anticorpos recombinantes pode ser de um paciente virgem, isto é, de um paciente que não foi imunizado com o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), tal com uma biblioteca de anticorpos humanos de um paciente humano que não foi imunizado com o analito humano (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Os anticorpos são selecionados triando a biblioteca de anticorpos recombinantes com o peptídeo que compreende o analito humano (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) para assim selecionar os anticorpos que reconhecem o analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). Métodos para realizar essa triagem e seleção são bem conhecidos na técnica, tal como os descritos nas referências no parágrafo anterior. Para selecionar anticorpos com afinidades de ligação pelo analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) específicas, tal como aqueles que dissociam-se do analito humano (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) I com uma constante da taxa K_{off} específica, o método conhecido na técnica da ressonância de plásmon de superfície pode ser usado para selecionar anticorpos com a constante da taxa K_{off} desejada. Para selecionar anticorpos com uma atividade neutralizante específica ao analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), tal como aqueles com uma IC₅₀ específica, métodos padrão conhecidos na técnica para avaliar a inibição da atividade do analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) podem ser usados.

[0345]Em um aspecto, a revelação refere-se a um anticorpo isolado, ou a qualquer parte de ligação com antígeno do mesmo, que liga-se a um analito humano (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1). De preferência, o anticorpo é um anticorpo

neutralizante. Em várias modalidades, o anticorpo é um anticorpo recombinante ou um anticorpo monoclonal.

[0346]Por exemplo, anticorpos também podem ser gerados usando vários métodos *phage display* conhecidos na técnica. Nos métodos *phage display*, os domínios de anticorpo funcionais são exibidos sobre a superfície de partículas de fago que carregam as sequências de polinucleotídeo que os codificam. Esse fago pode ser utilizado para exibir domínios de ligação com antígeno expressos a partir de um repertório ou biblioteca de anticorpos combinacionais (por exemplo, humanos ou murinos). Um fago que expressa um domínio de ligação com antígeno que liga-se ao antígeno de interesse pode ser selecionado ou identificado com um antígeno, por exemplo, usando um antígeno marcado ou antígeno ligado ou capturado por uma superfície sólida ou conta. O fago usado nesses métodos é tipicamente um fago filamentoso incluindo os domínios de ligação fd e M13 expressos a partir do fago com domínios de anticorpos Fab, Fv ou Fv estabilizado com dissulfeto fusionados de maneira recombinante com a proteína do gene III ou gene VIII do fago. Exemplos de métodos *phage display* que podem ser usados para produzir os anticorpos incluem os revelados em Brinkmann *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene*, 187: 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994); Publicação PCT nº WO 92/01047; Publicações PCT nº WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401; e Patentes dos EUA nº 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743, e 5.969.108.

[0347]Conforme descrito nas referências acima, após a seleção do fago, as regiões de codificação de anticorpo do fago podem ser isoladas e usadas para gerar anticorpos inteiros, inclusive anticorpos humanos ou qualquer outro fragmento de

ligação com antígeno desejado, e expressas em qualquer hospedeiro desejado, inclusive células mamíferas, células de inseto, células vegetais, células de levedura e células de bactéria, por exemplo, conforme descrito em detalhes abaixo. Por exemplo, técnicas para produzir de maneira recombinante os fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ também podem ser empregadas usando métodos conhecidos na técnica tais como os revelados na publicação PCT nº WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques*, 12(6): 864-869 (1992); Sawai *et al.*, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34 (1995); e Better *et al.*, *Science*, 240: 1041-1043 (1988). Exemplos de técnicas que podem ser usadas para produzir Fvs de cadeia única e anticorpos incluem os descritos na Patente dos EUA nº 4.946.778 e 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991); Shu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993); e Skerra *et al.*, *Science*, 240: 1038-1041 (1988).

[0348]Como alternativa à triagem de bibliotecas de anticorpos recombinantes por *phage display*, outras metodologias conhecidas na técnica para triar grandes bibliotecas combinacionais podem ser aplicadas na identificação de anticorpos. Um tipo de sistema de expressão alternativo é um tal em que a biblioteca de anticorpos recombinantes é expressa por fusões RNA-proteína, conforme descrito na Publicação PCT nº WO 98/31700 (Szostak e Roberts), e em Roberts e Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302 (1997). Nesse sistema, uma fusão covalente é criada entre um mRNA e o peptídeo ou proteína que ele codifica pela tradução *in vitro* de mRNAs sintéticos que carregam a puromicina, um antibiótico aceitador da peptidila, em sua extremidade 3'. Sendo assim, um mRNA específico pode ser enriquecido com uma mistura complexa de mRNAs (por exemplo, uma biblioteca combinacional) com base nas propriedades da proteína ou peptídeo codificado, por exemplo, anticorpo, ou parte do mesmo, tal como ligação do anticorpo, ou de parte do mesmo, com o antígeno de especificidade dupla. Sequências de ácido nucleico codificadoras de anticorpo, ou partes das mesmas,

recuperadas da triagem dessas bibliotecas podem ser expressas por meios recombinantes conforme descritos acima (por exemplo, em células hospedeiras mamíferas) e, além disso, podem ser submetidas a nova maturação de afinidade ou por rodadas adicionais de triagem de fusões mRNA-peptídeo em que mutações foram introduzidas na(s) uma ou mais sequências originalmente selecionada(s), ou por outros métodos para maturação de afinidade *in vitro* de anticorpos recombinantes, conforme descrito neste documento. Um exemplo preferido dessa metodologia é a tecnologia *PROfusion display*.

[0349]Em outra abordagem, os anticorpos também podem ser gerados usando métodos de *display* de levedura conhecidos na técnica. Nesses métodos de *display* de levedura, métodos genéticos são usados para ligar domínios de anticorpos à parede de células de levedura e exibi-los sobre a superfície da levedura. Em particular, essa levedura pode ser utilizada para exibir domínios de ligação com antígeno expressos a partir de um repertório ou biblioteca de anticorpos combinacionais (por exemplo, humanos ou murinos). Exemplos de métodos de *display* de levedura que podem ser usados para produzir os anticorpos incluem os revelados na Patente dos EUA nº 6.699.658 (Wittrup *et al.*), incorporada a este documento por referência.

d. Produção de anticorpos de analito recombinantes

[0350]Anticorpos podem ser produzidos por qualquer uma de várias técnicas conhecidas no setor. Por exemplo, a expressão de células hospedeiras, em que um ou mais vetores de expressão que codificam as cadeias pesadas e leves são transfetados em uma célula hospedeira por técnicas padrão. Tenciona-se que as várias formas do termo "transfecção" abranjam uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procarionte ou eucarionte, por exemplo, eletroporação, precipitação de cálcio-fósforo, transfecção de DEAE-dextrano, e seus semelhantes. Embora seja possível

expressar os anticorpos em células hospedeiras procariontes ou eucariontes, a expressão de anticorpos em células eucariontes é preferível, e a mais preferivelmente em células hospedeiras mamíferas, porque essas células eucariontes (e em particular células mamíferas) têm mais chance do que as células procariontes de unir-se e secretar um anticorpo apropriadamente dobrado e imunologicamente ativo.

[0351] Exemplos de células hospedeiras mamíferas para expressar os anticorpos recombinantes incluem células do Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980)), usadas com um marcador selecionável de DHFR, por exemplo, conforme descrito em Kaufman e Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS, e células SP2. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras mamíferas, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, a secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão.

[0352] Células hospedeiras também podem ser usadas para produzir fragmentos de anticorpo funcionais, tais como fragmentos Fab ou moléculas de scFv. Perceber-se-á que é possível fazer variações ao procedimento acima. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com fragmentos funcionais codificadores de DNA da cadeia leve e/ou da cadeia pesada de um anticorpo. A tecnologia de DNA recombinante também pode ser usada para remover uma parte do DNA que codifica uma ou ambas as cadeias leve e pesada que não é necessário para ligar-se aos抗ígenos de interesse, ou todo ele. As moléculas

expressas a partir dessas moléculas de DNA truncadas também são abrangidas pelos anticorpos. Além disso, é possível produzir anticorpos bifuncionais em que uma cadeia pesada e uma cadeia leve são um anticorpo (isto é, ligam-se a um analito humano (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1)) e as outras cadeias pesada e leve são específicas para um antígeno que não o analito humano (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) ao reticular um anticorpo a um segundo anticorpo por meio de métodos de reticulação química padrão.

[0353]Em um sistema preferido para a expressão recombinante de um anticorpo, ou da porção de ligação com antígeno do mesmo, um vetor de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada do anticorpo quanto a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células dhfr-CHO por meio de transfecção mediada por cálcio de fosfato. Dentro do vetor de expressão recombinante, cada um dos genes de cadeia pesada e leve do anticorpo liga-se operacionalmente a elementos reguladores do intensificador de CMV/promotor de AdMLP para mobilizar altos níveis de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também carrega um gene DHFR, que permite a seleção de células CHO que foram transferidas com o vetor usando a seleção/amplificação do metotrexato. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesada e leve do anticorpo e o anticorpo é recuperado do meio de cultura. Técnicas de biologia molecular padrão são usadas para preparar o vetor de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, selecionar transformantes, cultivar as células hospedeiras, e recuperar o anticorpo do meio de cultura. Além do mais, a revelação propõe um método para sintetizar um anticorpo recombinante cultivando uma célula hospedeira em um meio de cultura adequado até que um anticorpo recombinante seja sintetizado. O método pode compreender ainda isolar o anticorpo recombinante do meio de cultura.

(1) Anticorpo Humanizado

[0354]O anticorpo humanizado pode ser um anticorpo ou uma variante, derivado, análogo ou porção do mesmo que liga-se imunoespecificamente a um antígeno de interesse e que possui uma região de *framework* (FR) contendo substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo humano e uma região determinante de complementaridade (CDR) contendo substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo não humano. O anticorpo humanizado pode ser de uma espécie não humana que liga-se ao antígeno desejado com uma ou mais regiões determinantes de complementariedade (CDRs) da espécie não humana e a regiões de *framework* de uma molécula de imunoglobulina humana.

[0355]Conforme usado neste documento, o termo "substancialmente" no contexto de uma CDR refere-se a uma CDR com uma sequência de aminoácidos ao menos 90%, ao menos 95%, ao menos 98% ou ao menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de uma CDR de anticorpo não humano. Um anticorpo humanizado compreende substancialmente todos de ao menos um domínio variável (Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv), tipicamente dois, em que todas ou praticamente todas as regiões de CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana (isto é, anticorpo doador) e todas ou praticamente todas as regiões de *framework* são de uma sequência consenso da imunoglobulina humana. De acordo com um aspecto, um anticorpo humanizado também compreende ao menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente de uma imunoglobulina humana. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém tanto a cadeia leve quanto ao menos o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, dobradiça, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado só contém uma região leve humanizada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado só contém uma região pesada humanizada. Em modalidades específicas, um anticorpo humanizado só contém um domínio variável humanizado de uma cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada.

[0356]O anticorpo humanizado pode ser selecionado dentre qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isótipo, incluindo, entre outros, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. O anticorpo humanizado pode compreender sequências de mais de uma classe ou isótipo, e domínios constantes específicos podem ser selecionados para otimizar funções efetoras desejadas usando técnicas bem conhecidas no setor.

[0357]As regiões de *framework* e CDR de um anticorpo humanizado não precisam corresponder exatamente às sequências-mãe, por exemplo, a CDR do anticorpo doador ou o *framework* consenso podem ser mutageneizados pela substituição, introdução e/ou deleção de ao menos um resíduo de aminoácido de tal modo que a CDR ou resíduo de *framework* nesse sítio não corresponda nem ao anticorpo doador nem ao *framework* consenso. Em uma modalidade, essas mutações, contudo, não serão extensivas. Usualmente, ao menos 90%, ao menos 95%, ao menos 98% ou ao menos 99% dos resíduos de anticorpo humanizado corresponderão aos das sequências de FR e CDR mãe. Conforme usado neste documento, o termo "*framework* consenso" refere-se à região de *framework* na sequência de imunoglobulina consenso. Conforme usado neste documento, o termo "sequência de imunoglobulina consenso" refere-se à sequência formada pelos aminoácidos (ou nucleotídeos) que ocorrem mais frequentemente em uma família de sequências de imunoglobulina relacionadas (vide, por exemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha 1987)). Em uma família de imunoglobulinas, cada posição na sequência consenso é ocupada pelo aminoácido que ocorre com mais frequência nessa posição na família. Se dois aminoácidos ocorrerem com a mesma frequência, qualquer um deles pode ser incluído na sequência consenso.

[0358]O anticorpo humanizado pode ser concebido para minimizar uma resposta imunológica indesejada a anticorpos anti-humanos de roedores, que, do

contrário, limitaria a duração e eficácia das aplicações terapêuticas desses grupamentos em beneficiários humanos. O anticorpo humanizado pode ter um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos nele a partir de uma fonte não humana. Esses resíduos não humanos são muitas vezes chamados de resíduos "importados", que tipicamente advêm de um domínio variável. A humanização pode ser realizada substituindo sequências de região hipervariável pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Logo, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos químéricos, em que significativamente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Por exemplo, vide a Patente dos EUA nº 4.816.567, cujo conteúdo incorpora-se ao presente documento por referência. O anticorpo humanizado pode ser um anticorpo humano em que alguns resíduos de região hipervariáveis, e possivelmente alguns resíduos de FR, são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores. A humanização ou engenharia genética de anticorpos da presente revelação podem ser realizadas usando qualquer método conhecido, tal como, entre outros, os descritos nas Patentes dos EUA nº 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539, e 4.816.567.

[0359]O anticorpo humanizado pode reter alta afinidade pelo analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1) e outras propriedades biológicas favoráveis. O anticorpo humanizado pode ser preparado por um processo de análise das sequências-mãe e de vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências-mãe e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponibilizados. São disponibilizados programas de computador que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção dessas exibições permite na análise da provável função dos resíduos no

funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, na análise de resíduos que influenciam a capacidade de a imunoglobulina candidata ligar-se a seu antígeno. Dessa forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados dentre as sequências recipientes e importadas de tal modo que as características de anticorpo desejadas, tais como maior afinidade pelo analito (por exemplo, GFAP e/ou UCH-L1), sejam obtidas. Em geral, os resíduos de região hipervariável podem estar direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação com antígeno.

[0360]Como alternativa à humanização, anticorpos humanos (também chamados neste documento de "anticorpos totalmente humanos") podem ser gerados. Por exemplo, é possível isolar anticorpos humanos a partir de bibliotecas via *PROfusion* e/ou tecnologias relacionadas a levedura. Também é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos capazes, quando da imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulinas). Por exemplo, a deleção homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada do anticorpo (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linha germinativa resulta na inibição total da produção de anticorpos endógenos. A transferência da matriz de genes da imunoglobulina de linha germinativa humana nesses camundongos mutantes de linha germinativa resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio antigênico. Os anticorpos humanizados ou totalmente humanos podem ser preparados de acordo com os métodos descritos nas Patentes dos EUA nº 5.770.429, 5.833.985, 5.837.243, 5.922.845, 6.017.517, 6.096.311, 6.111.166, 6.270.765, 6.303.755, 6.365.116, 6.410.690, 6.682.928, e 6.984.720, cujos conteúdos de cada uma incorporam-se ao presente documento por referência.

10. Variações nos Métodos

[0361]Os métodos revelados para determinar a presença ou quantidade de um analito de interesse (UCH-L1 e/ou GFAP) em uma amostra podem ser conforme descritos neste documento. Os métodos também podem ser adaptados em vista a outros métodos para analisar analitos. Exemplos de variações bem conhecidas incluem, entre outros, imunoensaios, tais como imunoensaio em sanduíche (por exemplo, imunoensaios em sanduíche monoclonal-monoclonal, imunoensaios em sanduíche monoclonal-policlonal, incluindo detecção de enzimas (imunoensaio enzimático (IEE) ou ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), imunoensaio de inibição competitiva (por exemplo, direta e reversa), técnica de imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT), ensaio de ligação competitiva, transferência de energia bioluminescente por ressonância (BRET), ensaio de detecção de anticorpos em etapa única, ensaio homogêneo, ensaio heterogêneo, ensaio de captura dinâmica etc.

a. Imunoensaio

[0362]O analito de interesse, e/ou peptídeos de fragmentos do mesmo (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP, e/ou peptídeos ou fragmentos das mesmas, isto é, fragmentos de UCH-L1 e/ou GFAP), pode ser analisado usando anticorpos da UCH-L1 e/ou GFAP em um imunoensaio. A presença ou quantidade de um analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) pode ser determinada usando anticorpos e detectando a ligação específica com o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Por exemplo, o anticorpo, ou fragmento de anticorpo do mesmo, pode ligar-se especificamente ao analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Se desejado, um ou mais dos anticorpos podem ser usados em combinação a um ou mais anticorpos monoclonais/policlonais disponíveis na praça. Esses anticorpos são disponibilizados por empresas tais como a R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) e a Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA).

[0363]A presença ou quantidade de um analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) em uma amostra corporal podem ser prontamente determinadas usando um imunoensaio, tal como imunoensaio em sanduíche (por exemplo, imunoensaios em sanduíche monoclonal-monoclonal, imunoensaios em sanduíche monoclonal-policlonal, incluindo detecção de radioisótopos (radioimunoensaio (RIA)) e detecção de enzimas (imunoensaio enzimático (IEE) ou ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (por exemplo, ensaios Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN)). Um exemplo de dispositivo *point-of-care* que pode ser usado é o i-STAT® (Abbott, Laboratories, Abbott Park, IL). Outros métodos que podem ser usados incluem um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência, em especial um que faça uso do analisador automatizado ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), por exemplo. Outros métodos incluem, por exemplo, espectrometria de massas e imunohistoquímica (por exemplo, com seções de biópsias de tecido), usando anticorpos (monoclonais, policlonais, quiméricos, humanizados, humanos etc.) anti-analito (por exemplo, anti-UCH-L1 e/ou anti-GFAP) ou fragmentos de anticorpo dos mesmos contra o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Outros métodos de detecção incluem os descritos, por exemplo, nas Patentes dos EUA nº 6.143.576, 6.113.855, 6.019.944, 5.985.579, 5.947.124, 5.939.272, 5.922.615, 5.885.527, 5.851.776, 5.824.799, 5.679.526, 5.525.524 e 5.480.792, cada uma das quais incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. A ligação imunológica específica do anticorpo com o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) pode ser detectada via marcadores diretos, tais como etiquetas fluorescentes ou luminescentes, metais e radionuclídeos ligados ao anticorpo, ou via marcadores indiretos, tais como fosfatase alcalina ou peroxidase de raiz-forte.

[0364]O uso de anticorpos imobilizados , ou fragmentos de anticorpo desses, pode ser incorporado ao imunoensaio. Os anticorpos podem ser imobilizados em

uma variedade de suportes, tais como partículas de matriz magnética ou cromatográfica, a superfície de uma placa de ensaio (tal como poços de microtitulação), pedaços de um material de substrato sólido, e seus semelhantes. Uma tira de ensaio pode ser preparada revestindo o anticorpo ou uma pluralidade de anticorpos em uma matriz sobre um suporte sólido. Essa tira pode ser então gotejada na amostra de teste e processada rapidamente através de etapas de lavagem e detecção para gerar um sinal mensurável, tal como um ponto colorido.

[0365]Um formato homogêneo pode ser usado. Por exemplo, após obter a amostra de teste de um paciente, uma mistura é preparada. A mistura contém a amostra de teste sendo avaliada quanto ao analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP), um primeiro parceiro de ligação específica e um segundo parceiro de ligação específica. A ordem em que a amostra de teste, o primeiro parceiro de ligação específica e o segundo parceiro de ligação específica são adicionados para formar a mistura não é essencial. A amostra de teste é colocada em contato com o primeiro parceiro de ligação específica e o segundo parceiro de ligação específica simultaneamente. Em algumas modalidades, o primeiro parceiro de ligação específica e qualquer UCH-L1 e/ou GFAP contida na amostra de teste podem formar um complexo primeiro parceiro de ligação específica-antígeno analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP), e o segundo parceiro de ligação específica pode formar um complexo primeiro parceiro de ligação específica-analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo parceiro de ligação específica. Em algumas modalidades, o segundo parceiro de ligação específica e qualquer UCH-L1 e/ou GFAP contida na amostra de teste podem formar um complexo segundo parceiro de ligação específica-antígeno analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP), e o primeiro parceiro de ligação específica pode formar um complexo primeiro parceiro de ligação específica-analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo parceiro de ligação específica. O primeiro parceiro de ligação específica pode ser um

anticorpo anti-analito (por exemplo, um anticorpo anti-UCH-L1 que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 1 ou um anticorpo anti-GFAP que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 2). O segundo parceiro de ligação específica pode ser um anticorpo anti-analito (por exemplo, um anticorpo anti-UCH-L1 que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 1 ou um anticorpo anti-GFAP que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 2). Além disso, o segundo parceiro de ligação específica contém ou é marcado com um marcador detectável conforme descrito acima.

[0366]Um formato heterogêneo pode ser usado. Por exemplo, após obter a amostra de teste de um paciente, uma primeira mistura é preparada. A mistura contém a amostra de teste sendo avaliada quanto ao analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) e um primeiro parceiro de ligação específica, em que o primeiro parceiro de ligação específica e qualquer UCH-L1 e/ou GFAP contida na amostra de teste formam um complexo primeiro parceiro de ligação específica-antígeno analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). O primeiro parceiro de ligação específica pode ser um anticorpo anti-analito (por exemplo, um anticorpo anti-UCH-L1 que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 1 ou um anticorpo anti-GFAP que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 2). A ordem em que a amostra de teste e o primeiro parceiro de ligação específica são adicionados para formar a mistura não é essencial.

[0367]O primeiro parceiro de ligação específica pode ser imobilizado em uma fase sólida. A fase sólida usada no imunoensaio (para o primeiro parceiro de ligação específica e, como opção, para o segundo parceiro de ligação específica) pode ser qualquer fase sólida conhecida na técnica, tal como, entre outras, uma partícula magnética, uma conta, um tubo de ensaio, uma placa de microtitulação, uma cubeta, uma membrana, uma molécula de arcabouço, um filme, um papel-filtro, um disco ou um *chip*. Nas modalidades em que a fase sólida é uma conta, a conta pode ser uma conta magnética ou uma partícula magnética. Contas/partículas magnéticas podem ser ferromagnéticas, ferrimagnéticas, paramagnéticas, superparamagnéticas ou ferrofluídicas. Exemplos de materiais ferromagnéticos incluem Fe, Co, Ni, Gd, Dy, CrO₂, MnAs, MnBi, EuO e NiO/Fe. Exemplos de materiais ferrimagnéticos incluem NiFe₂O₄, CoFe₂O₄, Fe₃O₄ (ou FeO·Fe₂O₃). As contas podem ter uma parte de núcleo sólida que é magnética e circundada por uma ou mais camadas não magnéticas. Como alternativa, a parte magnética pode ser uma camada em torno de um núcleo não magnético. O suporte sólido no qual o primeiro parceiro de ligação específica é imobilizado pode ser armazenado em forma seca ou em um líquido. As contas magnéticas podem ser submetidas a um campo magnético antes ou depois de colocar a amostra em contato com uma conta magnética na qual o primeiro parceiro de ligação específica é imobilizado.

[0368]Depois de formar a mistura contendo o complexo primeiro parceiro de ligação específica-antígeno analito (por exemplo, UCH-L1 ou GFAP), qualquer analito não ligado (por exemplo, UCH-L1 ou GFAP) é removido do complexo usando qualquer técnica conhecida no setor. Por exemplo, o analito não ligado (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) pode ser removido por lavagem. Desejavelmente, contudo, o primeiro parceiro de ligação específica se faz presente em maior quantidade do que qualquer analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) presente na amostra de teste, de tal modo que todo analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)

que se faça presente na amostra de teste ligue-se ao primeiro parceiro de ligação específica.

[0369]Depois de remover todo analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) não ligado, um segundo parceiro de ligação específica é adicionado à mistura para formar um complexo primeiro parceiro de ligação específica-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo parceiro de ligação específica. O segundo parceiro de ligação específica pode ser um anticorpo anti-analito (por exemplo, um anticorpo anti-UCH-L1 que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 1 ou um anticorpo anti-GFAP que liga-se a um epítopo com uma sequência de aminoácidos que compreende ao menos três (3) aminoácidos contíguos da SEQ ID Nº: 2). Além disso, o segundo parceiro de ligação específica contém ou é marcado com um marcador detectável conforme descrito acima.

[0370]O uso de anticorpos imobilizados ou fragmentos de anticorpo desses pode ser incorporado ao imunoensaio. Os anticorpos podem ser imobilizados em uma variedade de suportes, tais como partículas de matriz magnética ou cromatográfica (tal como uma conta magnética), partículas de látex ou partículas de látex de superfície modificada, polímero ou filme polimérico, plástico ou filme plástico, substrato plano, a superfície de uma placa de ensaio (tal como poços de microtitulação), pedaços de um material de substrato sólido, e seus semelhantes. Uma tira de ensaio pode ser preparada revestindo o anticorpo ou uma pluralidade de anticorpos em uma matriz sobre um suporte sólido. Essa tira pode ser então gotejada na amostra de teste e processada rapidamente através de etapas de lavagem e detecção para gerar um sinal mensurável, tal como um ponto colorido.

(1) Imunoensaio em sanduíche

[0371]Um imunoensaio em sanduíche mede a quantidade de antígeno entre duas camadas de anticorpos (isto é, ao menos um anticorpo de captura) e um

anticorpo de detecção (isto é, ao menos um anticorpo de detecção). O anticorpo de captura e o anticorpo de detecção ligam-se a diferentes epítopos no antígeno, por exemplo, analito de interesse, tal como UCH-L1 e/ou GFAP. Desejavelmente, a ligação do anticorpo de captura a um epítopo não interfere na ligação do anticorpo de detecção com outro epítopo. Anticorpos monoclonais ou policlonais podem ser usados como os anticorpos de captura e detecção no imunoensaio em sanduíche.

[0372]Em geral, ao menos dois anticorpos são empregados para separar e quantificar um analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) em uma amostra de teste. Mais especificamente, os ao menos dois anticorpos ligam-se a certos epítopos do analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP), formando assim um complexo imunológico chamado de "sanduíche". Um ou mais anticorpos podem ser usados para capturar o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) na amostra de teste (esses anticorpos são frequentemente chamados de anticorpo "de captura" ou anticorpos "de detecção") e um ou mais anticorpos são usados para ligar um marcador detectável (a saber, quantificável) ao sanduíche (esses anticorpos são frequentemente chamados de anticorpo "de detecção" ou anticorpos "de detecção"). Em um ensaio em sanduíche, a ligação de um anticorpo com seu epítopo desejavelmente não é diminuída pela ligação de nenhum outro anticorpo no ensaio com seu respectivo epítopo. Os anticorpos são selecionados de tal modo que os um ou mais primeiros anticorpos colocados em contato com uma amostra de teste suspeita de conter o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) não liguem-se a todo um epítopo, ou parte dele, reconhecido pelos segundos anticorpos ou anticorpos subsequentes, o que interferiria na capacidade de os um ou mais segundos anticorpos de detecção ligarem-se ao analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP).

[0373]Os anticorpos podem ser usados como um primeiro anticorpo no referido imunoensaio. O anticorpo liga-se imunoespecificamente a epítopos no analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Além dos anticorpos da presente

revelação, o referido imunoensaio pode compreender um segundo anticorpo que liga-se imunoespecificamente a epítopos que não são reconhecidos ou ligados pelo primeiro anticorpo.

[0374]Uma amostra de teste suspeita de conter um analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) pode ser colocada em contato com ao menos um primeiro anticorpo (ou anticorpos) de captura e ao menos um segundo anticorpo de detecção ou ao simultaneamente ou em sequência. No formato de ensaio em sanduíche, uma amostra de teste suspeita de conter o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) é primeiramente colocada em contato com o ao menos um primeiro anticorpo de captura que liga-se especificamente a um epítopo específico em condições que permitam a formação de um primeiro complexo anticorpo-antígeno analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Se mais de um anticorpo de captura for usado, um complexo vários primeiros anticorpos de captura-antígeno UCH-L1 e/ou GFAP é formado. Em um ensaio em sanduíche, os anticorpos, de preferência o ao menos um anticorpo de captura, são usados em quantidades molares superiores à quantidade máxima do analito de interesse ou fragmento de analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) cuja presença na amostra de teste é esperada. Por exemplo, de cerca de 5 µg/mL a cerca de 1 mg/mL de anticorpo por ml de tampão de revestimento de micropartículas podem ser usados.

i. Anticorpos de captura anti-UCH-L1 e/ou anti-GFAP

[0375]Como opção, antes de colocar a amostra de teste em contato com o ao menos um primeiro anticorpo de captura, o ao menos um primeiro anticorpo de captura pode ser ligado a um suporte sólido que facilite a separação do complexo primeiro anticorpo-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) da amostra de teste. Qualquer suporte sólido conhecido na técnica pode ser usado, incluindo, entre outros, suportes sólidos feitos de materiais poliméricos na forma de poços, tubos ou contas (tal como uma micropartícula). O anticorpo (ou anticorpos) pode ser ligado ao

suporte sólido por adsorção, por ligação covalente usando um agente de ligação química ou por outros meios conhecidos na técnica, contanto que tal ligação não interfira na capacidade do anticorpo ligar-se ao analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Além disso, se necessário, o suporte sólido pode ser derivatizado para permitir a reatividade com vários grupos funcionais no anticorpo. Essa derivatização requer o uso de certos agentes de acoplamento, tais como, entre outros, anidrido maleico, N-hidroxissuccinimida e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

[0376]Depois de incubar a amostra de teste suspeita de conter o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) para permitir a formação de um complexo primeiro anticorpo (ou vários anticorpos) de captura-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). A incubação pode ser realizada a um pH de cerca de 4,5 a cerca de 10,0, a uma temperatura de cerca de 2° C a cerca de 45° C e por um período de ao menos cerca de um (1) minuto a cerca de dezoito (18) horas, de cerca de 2 a 6 minutos, de cerca de 7 a 12 minutos, de cerca de 5 a 15 minutos, ou de cerca de 3 a 4 minutos.

ii. Anticorpo de detecção

[0377]Após a formação do complexo primeiro/vários anticorpos de captura-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP), o complexo é então colocado em contato com ao menos um segundo anticorpo de detecção (em condições que permitam a formação de um complexo primeiro/vários anticorpos-antígeno analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo anticorpo). Em algumas modalidades, a amostra de teste é colocada em contato com o anticorpo de detecção simultaneamente com o anticorpo de captura. Se o complexo primeiro anticorpo-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) for colocado em contato com mais de um anticorpo de detecção, forma-se um complexo primeiro/vários anticorpos de captura-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-vários anticorpos de detecção. Quanto ao primeiro anticorpo, quando o ao menos segundo (e subsequente) anticorpo é colocado em contato com o complexo primeiro anticorpo-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP), um

período de incubação em condições semelhantes aos descritos é necessário para a formação do complexo primeiro/vários anticorpos-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo/vários anticorpos. De preferência, ao menos um segundo anticorpo contém um marcador detectável. O marcador detectável pode ser ligado ao ao menos um segundo anticorpo antes, simultaneamente ou depois da formação do complexo primeiro/vários anticorpos (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo/vários anticorpos. Qualquer marcador detectável conhecido na técnica pode ser usado.

[0378]Ensaios quimioluminescentes podem ser realizados de acordo com os métodos descritos em Adamczyk *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 579(1): 61-67 (2006). Embora qualquer formato de ensaio adequado possa ser usado, um quimioluminômetro de microplacas (Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN) permite o ensaio de várias amostras de volumes pequenos rapidamente. O quimioluminômetro pode ser munido de vários injetores de reagentes usando microplacas negras de poliestireno com 96 poços (Costar #3792). Cada amostra pode ser adicionada a um poço diferente, seguida pela adição simultânea/sequencial de outros reagentes conforme determinado pelo tipo de ensaio empregado. Desejavelmente, evita-se a formação de pseudobases em soluções neutras ou básicas fazendo uso de aril éster de acridínio, tal como por acidificação. A resposta quimioluminescente é então registrada de poço em poço. Sob esse aspecto, o tempo para registrar a resposta quimioluminescente dependerá, em parte, do retardo entre a adição dos reagentes e do acridínio específico empregado.

[0379]A ordem em que a amostra de teste e os um ou mais parceiros de ligação específica são adicionados para formar a mistura para o ensaio quimioluminescente não é essencial. Se o primeiro parceiro de ligação específica for marcado detectavelmente com um composto de acridínio, formam-se complexos

primeiro parceiro de ligação específica-antígeno (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) marcados detectavelmente. Como alternativa, se um segundo parceiro de ligação específica for usado e o segundo parceiro de ligação específica for marcado detectavelmente com um composto de acridínio, formam-se complexos primeiro parceiro de ligação específica-analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP)-segundo parceiro de ligação específica marcados detectavelmente. Todo membro de ligação específica não ligado, seja ele marcado ou não marcado, pode ser removido da mistura usando qualquer técnica conhecida no setor, tal como lavagem.

[0380]Peróxido de hidrogênio pode ser gerado *in situ* na mistura ou provido ou fornecido à mistura antes, simultaneamente ou depois da adição de um composto de acridínio descrito acima. Peróxido de hidrogênio pode ser gerado *in situ* de várias maneiras tais como transparecerão aos versados na técnica.

[0381]Como alternativa, uma fonte de peróxido de hidrogênio pode ser simplesmente adicionada à mistura. Por exemplo, a fonte de peróxido de hidrogênio pode ser um ou mais tampões ou outras soluções que são conhecidas por conter peróxido de hidrogênio. Sob esse aspecto, uma solução de peróxido de hidrogênio pode simplesmente ser adicionada.

[0382]Quando da adição simultânea ou subsequente de ao menos uma solução básica à amostra, gera-se um sinal detectável, a saber, um sinal quimioluminescente, indicativo da presença do analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). A solução básica contém ao menos uma base e tem um pH superior ou igual a 10, de preferência superior ou igual a 12. Exemplos de soluções básicas incluem, entre outros, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, hidróxido de amônio, hidróxido de magnésio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, e bicarbonato de cálcio. A quantidade de solução básica adicionada à amostra depende da concentração da solução básica. Com base na concentração da solução básica usada, os versados na técnica podem

facilmente determinar a quantidade de solução básica que será adicionada à amostra. Outros marcadores que não marcadores quimioluminescentes podem ser empregados. Por exemplo, marcadores enzimáticos (incluindo, entre outros, fosfatase alcalina) podem ser empregados.

[0383]O sinal quimioluminescente, ou outro sinal, que é gerado pode ser detectado usando técnicas rotineiras conhecidas pelos versados na técnica. Com base na intensidade do sinal gerado, a quantidade do analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) na amostra pode ser quantificada. Mais especificamente, a quantidade do analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) na amostra é proporcional à intensidade do sinal gerado. A quantidade do analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) presente pode ser quantificada comparando a quantidade de luz gerada a uma curva padrão para o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) ou por comparação com um padrão de referência. A curva padrão pode ser gerada usando diluições em série ou soluções de concentrações conhecidas do analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) por espectroscopia de massas, métodos gravimétricos e outras técnicas conhecidas no setor. A quantificação para ensaios de painel, e para ensaios multiplex, à semelhança foi descrita na literatura científica e é de conhecimento dos versados na técnica.

(2) Ensaio de Inibição Competitiva Direta

[0384]Em um formato competitivo direto, uma alíquota do analito de interesse marcado (por exemplo, analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) com um marcador fluorescente, uma etiqueta ligada a um ligante clivável etc.) de concentração conhecida é usada para competir com o analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) em uma amostra de teste para ligar-se ao anticorpo do analito de interesse (por exemplo, anticorpo da UCH-L1 e/ou GFAP).

[0385]Em um ensaio de competição direta, um membro de ligação específica imobilizado (tal como um anticorpo) pode ser colocado em contato em sequência ou

simultaneamente com a amostra de teste e um analito de interesse marcado, fragmento do analito de interesse marcado ou variante do analito de interesse marcada. O peptídeo do analito de interesse, fragmento do analito de interesse ou variante do analito de interesse pode ser marcado com qualquer marcador detectável, incluindo um marcador detectável composto por uma etiqueta ligada a um ligante clivável. Neste ensaio, o anticorpo pode ser imobilizado em um suporte sólido. Como alternativa, o anticorpo pode ser acoplado a um anticorpo, tal como um anticorpo antiespécie, que foi imobilizado em um suporte sólido, tal como uma micropartícula ou substrato plano.

[0386]O analito de interesse marcado, a amostra de teste e o anticorpo são incubados em condições semelhantes às descritas acima com relação ao formato de ensaio em sanduíche. Duas ou mais espécies diferentes de complexos anticorpo-analito de interesse podem ser então geradas. Mais especificamente, um dos complexos anticorpo-analito de interesse contém um marcador detectável (por exemplo, um marcador fluorescente etc.), ao passo que o outro complexo anticorpo-analito de interesse não contém um marcador detectável. O complexo anticorpo-analito de interesse pode ser, mas não precisa ser, separado do restante da amostra de teste antes da quantificação do marcador detectável. Independentemente de se o complexo anticorpo-analito de interesse é separado do restante da amostra de teste, a quantidade do marcador detectável no complexo anticorpo-analito de interesse é então quantificada. A concentração do analito de interesse (tal como analito de interesse associado a membrana, analito de interesse solúvel, fragmentos de analito de interesse solúvel, variantes do analito de interesse (analito de interesse associado a membrana ou solúvel) ou quaisquer combinações desses) na amostra de teste pode ser então determinada, por exemplo, conforme descrito acima.

(3) Ensaio de Inibição Competitiva Reversa

[0387]Em um ensaio de competição reversa, um analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) imobilizado pode ser colocado em contato simultaneamente ou em sequência com uma amostra de teste e ao menos um anticorpo marcado.

[0388]O analito de interesse pode ser ligado a um suporte sólido, tal como os suportes sólidos discutidos acima com relação ao formato de ensaio em sanduíche.

[0389]O analito de interesse imobilizado, a amostra de teste e ao menos anticorpo marcado são incubados em condições semelhantes às descritas acima com relação ao formato de ensaio em sanduíche. Duas espécies diferentes de complexos analito de interesse-anticorpo são então geradas. Mais especificamente, um dos complexos analito de interesse-anticorpo gerados é imobilizado e contém um marcador detectável (por exemplo, um marcador fluorescente etc.), ao passo que o outro complexo analito de interesse-anticorpo não é imobilizado e contém um marcador detectável. O complexo analito de interesse-anticorpo não imobilizado e o restante da amostra de teste são removidos da presença do complexo analito de interesse-anticorpo imobilizado por meio de técnicas conhecidas no setor, tais como lavagem. Uma vez removido o complexo analito de interesse-anticorpo não imobilizado, a quantidade de marcador detectável no complexo analito de interesse-anticorpo imobilizado é então quantificada após a clivagem da etiqueta. A concentração do analito de interesse na amostra de teste pode ser então determinada comparando a quantidade de marcador detectável conforme descrito acima.

(4) Imunoensaio em etapa única ou ensaio de "captura dinâmica"

[0390]Em um imunoensaio de captura dinâmica, um substrato sólido é pré-revestido com um agente de imobilização. O agente de captura, o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) e o agente de detecção são adicionados ao substrato

sólido juntos, seguidos por uma etapa de lavagem antes da detecção. O agente de captura pode ligar-se ao analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) e compreende um ligante para o agente de imobilização. O agente de captura e os agentes de detecção podem ser anticorpos ou qualquer outro grupamento capaz de captura ou detecção conforme descrito neste documento ou de conhecimento na técnica. O ligante pode compreender uma etiqueta peptídica, e o agente de imobilização pode compreender um anticorpo anti-etiqueta peptídica. Como alternativa, o ligante e o agente de imobilização podem ser qualquer par de agentes capazes de ligar-se um ao outro para uso em um ensaio de captura dinâmica (por exemplo, par de ligação específica e outros como são de conhecimento na técnica). Mais de um analito pode ser medido. Em algumas modalidades, o substrato sólido pode ser revestido com um antígeno e o analito a ser analisado é um anticorpo.

[0391]Em certas outras modalidades, em um imunoensaio em etapa única ou de "captura dinâmica", utilizam-se um suporte sólido (tal como uma micropartícula) pré-revestido com um agente de imobilização (tal como biotina, estreptavidina etc.) e ao menos um primeiro membro de ligação específica e um segundo membro de ligação específica (que atuam como reagentes de captura e detecção, respectivamente). O primeiro membro de ligação específica compreende um ligante para o agente de imobilização (por exemplo, se o agente de imobilização no suporte sólido for estreptavidina, o ligante no primeiro membro de ligação específica pode ser biotina) e também liga-se ao analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). O segundo membro de ligação específica compreende um marcador detectável e liga-se ao analito de interesse (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). O suporte sólido e os membros de ligação específica primeiro e segundo podem ser adicionados a uma amostra de teste (em sequência ou simultaneamente). O ligante no primeiro membro de ligação específica liga-se ao agente de imobilização no suporte sólido para formar um complexo suporte sólido-

primeiro membro de ligação específica. Qualquer analito de interesse presente na amostra liga-se ao complexo suporte sólido-primeiro membro de ligação específica para formar um complexo suporte sólido-primeiro membro de ligação específica-analito. O segundo membro de ligação específica liga-se ao complexo suporte sólido-primeiro membro de ligação específica-analito e o marcador detectável é detectado. Uma etapa opcional de lavagem pode ser adotada antes da detecção. Em certas modalidades, em um ensaio em etapa única mais de um analito pode ser medido. Em certas outras modalidades, mais de dois membros de ligação específica podem ser empregados. Em certas outras modalidades, vários marcadores detectáveis podem ser adicionados. Em certas outras modalidades, muitos analitos de interesse podem ser detectados, ou suas quantidades, níveis ou concentrações medidas, determinadas ou avaliadas.

[0392]O uso de um ensaio de captura dinâmica pode ser realizado em uma variedade de formatos conforme descritos neste documento e de conhecimento na técnica. Por exemplo, o formato pode ser um ensaio em sanduíche, tal como descrito acima, mas, como alternativa, pode ser um ensaio de competição, pode fazer uso de um único membro de ligação específica ou usar outras variações, como são de conhecimento.

(5) Ensaio de detecção de molécula única

[0393]Ensaios e métodos para detecção de molécula única, tais como o uso de um dispositivo de nanoporos ou dispositivo de nanopoços, também podem ser usados. Exemplos de dispositivos de nanoporos são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161402, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Exemplos de dispositivos de nanopoços são descritos na Publicação de Patente Internacional nº WO 2016/161400, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra. Outros dispositivos e

métodos apropriados para a detecção de molécula única também podem ser empregados.

11. Outros Fatores

[0394]Os métodos para diagnosticar, prognosticar e/ou avaliar, conforme descrito acima, podem incluir ainda usar outros fatores para diagnóstico, prognóstico e avaliação. Em algumas modalidades, outros fatores podem incluir medir e/ou determinar os níveis de nitrogênio ureico no sangue (BUN) e/ou as razões sódio/creatinina. Em algumas modalidades, os métodos podem incluir ainda medir e/ou determinar outros biomarcadores, tais como Proteína Básica da Mielina (MBP), Proteína Leve de Neurofilamento (NFL), e receptor do ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPAR).

[0395]Em algumas modalidades, a lesão cerebral traumática pode ser diagnosticada usando a Escala de Coma de Glasgow ou o resultado da lesão cerebral traumática pode ser previsto usando a Escala de Resultados de Glasgow Ampliada (GOSE). Outros testes, escalas ou índices também podem ser usados ou sozinhos ou em combinação à Escala de Coma de Glasgow. Um exemplo é a Escala Rancho Los Amigos. A Escala Ranchos Los Amigos mede os níveis de consciência, cognição, comportamento e interação com o ambiente. A Escala Ranchos Los Amigos inclui: Nível I: Não há resposta; Nível II: Resposta generalizada; Nível III: Resposta localizada; Nível IV: Confuso-agitado; Nível V: Confuso-inapropriado; Nível VI: Confuso-apropriado; Nível VII: Automático-apropriado; e Nível VIII: Intencional-apropriado.

[0396]Outros sistemas de classificação com base nos resultados de uma varredura por TC podem ser usados para prever resultados em pacientes, tais como quaisquer sistemas de classificação conhecidos na técnica. Um exemplo é a classificação de Marshall da lesão cerebral traumática, que coloca o paciente em uma de seis categorias (I a VI) de gravidade crescente com base nas descobertas

em uma varredura por TC do cérebro sem contraste. As categorias mais altas têm um prognóstico e sobrevivência piores. A classificação de Marshall preocupa-se essencialmente com dois atributos: 1) grau de inchaço, conforme determinado por deslocamento da linha média e/ou compressão das cisternas basais, e 3) presença e tamanho de contusões/hemorragias chamadas de "lesões de alta densidade" ou "lesões de densidade mista". Outro exemplo é o escore de Rotterdam, que incorpora variáveis adicionais (por exemplo, hemorragia subaracnoidea) e procura abranger algumas das limitações reconhecidas do sistema de Marshall, tais como dificuldade em classificar pacientes com lesões de vários tipos. A classificação de Rotterdam também inclui quatro elementos pontuados independentemente. À semelhança do sistema de Marshall, a classificação de Rotterdam inclui 1) o grau de compressão das cisternas basais e 2) o grau de deslocamento da linha média. A classificação de Rotterdam, todavia, não inclui contusões, mas, em vez disso, restringe as lesões de massa a (3) hematomas epidurais e acrescenta 4) hemorragia intraventricular e/ou subaracnoidea. A cada um desses é dada uma pontuação, e essas pontuações são computadas, com a adição de 1 ao total. Pontuações mais altas têm um prognóstico e sobrevivência piores.

12. Amostras

[0397]Em algumas modalidades, a amostra é obtida após o paciente humano sofrer uma lesão na cabeça causada por tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa que resulte em um traumatismo de cabeça fechado ou aberto, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente. Em algumas modalidades, a amostra é obtida após o paciente humano ingerir ou ser exposto a um produto químico, toxina ou uma combinação de produto químico e toxina. Exemplos desses produtos químicos e/ou toxinas incluem incêndios, bolores, amianto, pesticidas e inseticidas, solventes orgânicos, tintas, colas, gases (tais como

monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, e cianeto), metais orgânicos (tais como mercúrio metílico, chumbo tetraetila e estanho orgânico) e/ou uma ou mais drogas. Em algumas modalidades, a amostra é obtida de um paciente humano que sofre de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, hipoxia, um ou mais vírus, meningite, hidrocefalia ou combinações desses.

[0398]Em ainda outra modalidade, os métodos descritos neste documento utilizam amostras que também podem ser usadas para determinar se um paciente corre ou não risco de desenvolver uma lesão cerebral traumática leve ao determinar os níveis de GFAP e/ou UCH-L1 no paciente usando os anticorpos anti-GFAP e anticorpos anti-UCH-L1 descritos acima, ou fragmentos de anticorpo dos mesmos. Sendo assim, em modalidades específicas, a revelação também propõe um método para determinar se um paciente que tem ou corre o risco de contrair lesões cerebrais traumáticas, discutidas neste documento e conhecidas na técnica, é um candidato a terapia ou tratamento. Em termos gerais, o paciente é ao menos um paciente que: (i) sofreu uma lesão na cabeça; (ii) ingeriu e/ou foi exposto a um ou mais produtos químicos e/ou toxinas; (iii) sofre de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, hipoxia, um ou mais vírus, meningite, hidrocefalia ou de quaisquer combinações desses; ou (iv) quaisquer combinações de (i) a (iii). ou que foi realmente diagnosticado como tendo ou com risco de contrair uma LCT (tal como, por exemplo, pacientes que sofrem de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, hipoxia, um ou mais vírus, meningite, hidrocefalia ou combinações desses), e/ou que demonstra uma concentração ou quantidade desfavorável (isto é, clinicamente indesejável) de GFAP, UCH-L1, fragmento de GFAP e/ou fragmento de UCH-L1, conforme descrito neste documento.

a. Teste ou Amostra Biológica

[0399]Conforme usados neste documento, "amostra", "amostra de teste" e "amostra biológica" referem-se a uma amostra de fluido contendo ou suspeita de

conter GFAP e/ou UCH-L1. A amostra pode ser derivada de qualquer fonte adequada. Em alguns casos, a amostra pode compreender um líquido, sólido particulado fluente ou suspensão fluida de partículas sólidas. Em alguns casos, a amostra pode ser processada antes da análise descrita neste documento. Por exemplo, a amostra pode ser separada ou purificada de sua fonte antes da análise; porém, em algumas modalidades, uma amostra não processada contendo GFAP e/ou UCH-L1 pode ser examinada diretamente. Em um exemplo específico, a fonte contendo GFAP e/ou UCH-L1 é uma substância do corpo humano (por exemplo, fluido corporal, sangue tal como sangue total, soro, plasma, urina, saliva, suor, cuspe, sêmen, muco, fluido lacrimal, fluido linfático, fluido amniótico, fluido intersticial, lavagem pulmonar, fluido cerebroespinhal, fezes, tecidos, órgãos ou seus semelhantes). Tecidos podem incluir, entre outros, tecido muscular esquelético, tecido hepático, tecido pulmonar, tecido renal, tecido miocárdico, tecido cerebral, medula óssea, tecido do colo do útero, pele etc. A amostra pode ser uma amostra líquida ou um extrato líquido de uma amostra sólida. Em certos casos, a fonte da amostra pode ser um órgão ou tecido, tal como uma amostra de biópsia, que pode ser solubilizada por desintegração tecidual/lise celular.

[0400]Uma ampla variedade de volumes da amostra de fluido pode ser analisada. Em algumas modalidades exemplificativas, o volume da amostra pode ser de cerca de 0,5 nL, cerca de 1 nL, cerca de 3 nL, cerca de 0,01 µL, cerca de 0,1 µL, cerca de 1 µL, cerca de 5 µL, cerca de 10 µL, cerca de 100 µL, cerca de 1 mL, cerca de 5 mL, cerca de 10 mL, ou seus semelhantes. Em alguns casos, o volume da amostra de fluido é entre cerca de 0,01 µL e cerca de 10 mL, entre cerca de 0,01 µL e cerca de 1 mL, entre cerca de 0,01 µL e cerca de 100 µL, ou entre cerca de 0,1 µL e cerca de 10 µL.

[0401]Em alguns casos, a amostra de fluido pode ser diluída antes do uso em um ensaio. Por exemplo, em modalidades nas quais a fonte contendo GFAP

e/ou UCH-L1 é um fluido do corpo humano (por exemplo, sangue, soro), o fluido pode ser diluído com um solvente apropriado (por exemplo, um tampão tal como tampão PBS). Uma amostra de fluido pode ser diluída cerca de 1 vez, cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 6 vezes, cerca de 10 vezes, cerca de 100 vezes ou mais antes do uso. Em outros casos, a amostra de fluido é diluída antes do uso em um ensaio.

[0402]Em alguns casos, a amostra pode ser submetida a processamento pré-analítico. O processamento pré-analítico pode oferecer funcionalidade adicional, tal como remoção de proteínas não específicas e/ou funcionalidade de mistura implementável de maneira efetiva porém débil. Métodos gerais de processamento pré-analítico podem incluir o uso de aprisionamento eletrocinético, eletrocinética de CA, ondas acústicas superficiais, isotacoforese, dieletroforese, eletroforese, ou outras técnicas de pré-concentração conhecidas no setor. Em alguns casos, a amostra de fluido pode ser concentrada antes do uso em um ensaio. Por exemplo, em modalidades nas quais a fonte contendo GFAP e/ou UCH-L1 é um fluido do corpo humano (por exemplo, sangue, soro), o fluido pode ser concentrado por precipitação, evaporação, filtragem, centrifugação ou uma combinação dessas. Uma amostra de fluido pode ser concentrada cerca de 1 vez, cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 6 vezes, cerca de 10 vezes, cerca de 100 vezes ou mais antes do uso.

b. Controles

[0403]Pode ser desejável incluir um controle (tal como um controle positivo e/ou negativo, que são bem conhecidos na técnica). O controle pode ser analisado concomitantemente à amostra do paciente conforme descrito acima. Os resultados obtidos da amostra do paciente podem ser comparados aos resultados ou informações obtidos do controle. Curvas padrão podem ser obtidas, às quais os resultados de ensaio para a amostra podem ser comparados. Essas curvas padrão

exibem os níveis do marcador em função das unidades do ensaio, isto é, intensidade do sinal fluorescente, se um marcador fluorescente for usado. Usando amostras coletadas de vários doadores, curvas padrão podem ser obtidas para os níveis de referência de GFAP e/ou UCH-L1 em pacientes saudáveis normais, bem como para níveis "em risco" de GFAP e/ou UCH-L1 em tecidos coletados de doadores, que podem ter uma ou mais das características definidas acima. Em alguns casos, os controles podem referir-se a (por exemplo, basear-se em) amostras ou informações obtidas de um paciente que sofreu uma lesão ortopédica mas sem LCT aparente ("controles ortopédicos"), ou a amostras ou informações obtidas de pacientes saudáveis que não têm lesão aparente ("controles saudáveis"). Em algumas modalidades, o método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, valores de laboratório do paciente, classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave e tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão ortopédica.

[0404]Sendo assim, à vista do disposto acima, é proposto um método para determinar a presença, quantidade ou concentração de GFAP e/ou UCH-L1 em uma amostra de teste. O método compreende avaliar a amostra de teste quanto à GFAP e/ou UCH-L1 por meio de um imunoensaio, por exemplo, empregando ao menos um anticorpo de captura que liga-se a um epítopo na GFAP e/ou UCH-L1 e ao menos um anticorpo de detecção que liga-se a um epítopo na GFAP e/ou UCH-L1 que difere do epítopo para o anticorpo de captura e que opcionalmente inclui um marcador detectável, e comparando um sinal gerado pelo marcador detectável como uma indicação direta ou indireta da presença, quantidade ou concentração de GFAP e/ou UCH-L1 na amostra de teste a um sinal gerado como uma indicação direta ou indireta da presença, quantidade ou concentração de GFAP e/ou UCH-L1 em um calibrador. O calibrador é opcionalmente, e de preferência, parte de uma série de

calibradores, em que cada um dos calibradores difere dos demais calibradores na série no que se refere à concentração de GFAP e/ou UCH-L1.

13. Calibrador e composições controle

[0405]A presente revelação também se refere a um calibrador e a composições controle para uso nos métodos descritos acima que medem ou detectam a GFAP, UCH-L1, ou uma combinação dessas. O calibrador ou as composições controle incluem quantidades de GFAP ou fragmento de GFAP, UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1, ou combinações desses, que sejam apropriadas para medir os níveis na faixa dinâmica do ensaio (isto é, a faixa total de valores que o ensaio pode medir, em outras palavras, a faixa na qual a leitura do ensaio é proporcional à quantidade de molécula na amostra sendo analisada). A faixa dinâmica do ensaio deve necessariamente abranger as quantidades de referência de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação dessas, conforme descrito neste documento.

[0406]A quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP é selecionada dentre o grupo composto por i) de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 50 pg/mL; ii) de ao menos cerca de 15 pg/mL a cerca de 50 pg/mL; iii) de ao menos cerca de 60 pg/mL a cerca de 200 pg/mL; e iv) de ao menos cerca de 175 pg/mL a cerca de 250 pg/mL. A quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 é selecionada dentre o grupo composto por: v) de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 100 pg/mL; vi) de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 100 pg/mL; vii) de ao menos cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL; viii) de ao menos cerca de 300 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, e ix) de ao menos cerca de 340 pg/mL a cerca de 500 pg/mL.

[0407]Em algumas modalidades, a quantidade de referência corresponde a:
i) um nível de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medido em um paciente controle ortopédico (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram

uma lesão na cabeça); ii) uma média dos níveis de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medidos em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); iii) um nível máximo de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medido em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); iv) um nível mínimo de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medido em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); v) um nível de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); ou vi) um nível de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça).

[0408]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP é de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 40 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 30 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 20 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 15 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 10 pg/mL, de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 5 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 40 pg/mL, de ao

menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 30 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 20 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 15 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 10 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 15 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 40 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 30 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 20 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 15 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 40 pg/mL, de ao menos cerca de 20 pg/mL a cerca de 30 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 175 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, ou de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 300 pg/mL.

[0409]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 é de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 150 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 5 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 150 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 10 pg/mL a cerca de 50 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos

cerca de 50 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 150 pg/mL, de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 100 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 100 pg/mL a cerca de 150 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 150 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos

cerca de 200 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 200 pg/mL a cerca de 250 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 600 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 400 pg/mL, de ao menos cerca de 250 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de ao menos cerca de 300 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 340 pg/mL a cerca de 500 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 900 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, ou de ao menos cerca de 500 pg/mL a cerca de 600 pg/mL.

[0410]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP é de: i) entre ao menos cerca de 0,5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, correspondentemente a um nível de GFAP determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); ii) entre ao menos cerca de 15 pg/mL e

cerca de 50 pg/mL, correspondentemente a uma média dos níveis de GFAP medida em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); iii) entre ao menos cerca de 60 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, correspondentemente a um nível de GFAP determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); ou iv) entre ao menos cerca de 175 pg/mL e cerca de 250 pg/mL, correspondentemente a um nível máximo de GFAP medido em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); e a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 é de: v) entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, correspondentemente a um nível mínimo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); vi) entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, correspondentemente a um nível de UCH-L1 determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); vii) entre ao menos cerca de 140 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, correspondentemente a uma média dos níveis de UCH-L1 medida em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); viii) entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, correspondentemente a um nível de UCH-L1 determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); ou ix) entre ao menos cerca de 340 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, correspondentemente a um nível máximo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle ortopédicos (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça);

[0411]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP é: i) de ao menos cerca de 0,5 pg/mL a cerca de 50 pg/mL; ii) de ao menos cerca de 15 pg/mL a cerca de 50 pg/mL; ou iv) de ao menos cerca de 175 pg/mL a cerca de 200 pg/mL, e a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 é: v) de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 100 pg/mL; vi) de ao menos cerca de 50 pg/mL a cerca de 100 pg/mL; vii) de ao menos cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL; ou ix) de ao menos cerca de 340 pg/mL a cerca de 500 pg/mL.

[0412]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP é de ao menos cerca de 1 pg/mL, ao menos cerca de 2 pg/mL, ao menos cerca de 3 pg/mL, ao menos cerca de 4 pg/mL, ao menos cerca de 5 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 22 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ao menos cerca de 60 pg/mL, ao menos cerca de 67 pg/mL, ao menos cerca de 70 pg/mL, ao menos cerca de 80 pg/mL, ao menos cerca de 90 pg/mL, ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 115 pg/mL, ao menos cerca de 116 pg/mL, ao menos cerca de 117 pg/mL, ao menos cerca de 118 pg/mL, ao menos cerca de 119 pg/mL, ao menos cerca de 120 pg/mL, ao menos cerca de 130 pg/mL, ao menos cerca de 140 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 181 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 210 pg/mL, ao menos cerca de 215 pg/mL, ao menos cerca de 216 pg/mL, ao menos cerca de 217 pg/mL, ao menos cerca de 218 pg/mL, ao menos cerca de 219 pg/mL, ao menos cerca de 220 pg/mL, ao menos cerca de 230 pg/mL, ao menos cerca de 240 pg/mL, ou ao menos cerca de 250 pg/mL.

[0413]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 é de ao menos cerca de 5 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 31 pg/mL, ao menos cerca de 32 pg/mL, ao menos cerca de 33 pg/mL, ao menos cerca de 34 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ao menos cerca de 62 pg/mL, ao menos cerca de 68 pg/mL, ao menos cerca de 75 pg/mL, ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 149 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 250 pg/mL, ao menos cerca de 300 pg/mL, ao menos cerca de 304 pg/mL, ao menos cerca de 345 pg/mL, ao menos cerca de 350 pg/mL, ao menos cerca de 400 pg/mL, ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos cerca de 510 pg/mL, ao menos cerca de 520 pg/mL, ao menos cerca de 521 pg/mL, ao menos cerca de 522 pg/mL, ao menos cerca de 523 pg/mL, ao menos cerca de 524 pg/mL, ao menos cerca de 525 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ao menos cerca de 650 pg/mL, ao menos cerca de 700 pg/mL, ao menos cerca de 750 pg/mL, ao menos cerca de 800 pg/mL, ao menos cerca de 850 pg/mL, ao menos cerca de 900 pg/mL, ao menos cerca de 950 pg/mL, ao menos cerca de 1.000 pg/mL, ao menos cerca de 1.100 pg/mL, ao menos cerca de 1.200 pg/mL, ao menos cerca de 1.300 pg/mL, ao menos cerca de 1.400 pg/mL, ao menos cerca de 1.500 pg/mL, ao menos cerca de 1.600 pg/mL, ao menos cerca de 1.700 pg/mL, ao menos cerca de 1.701 pg/mL, ao menos cerca de 1.702 pg/mL, ao menos cerca de 1.703 pg/mL, ao menos cerca de 1.704 pg/mL, ao menos cerca de 1.705 pg/mL, ao menos cerca de 1.710 pg/mL, ao menos cerca de 1.800 pg/mL, ao menos cerca de 1.900 pg/mL, ou ao menos cerca de 2.000 pg/mL

[0414]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP é de: i) ao menos cerca de 2 pg/mL; ii) ao menos cerca de 22

pg/mL; iii) ao menos cerca de 67 pg/mL; ou iv) ao menos cerca de 181 pg/mL; e a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 é de: v) ao menos cerca de 62 pg/mL; vi) ao menos cerca de 68 pg/mL; vii) ao menos cerca de 149 pg/mL; viii) ao menos cerca de 304 pg/mL; ou ix) ao menos cerca de 345 pg/mL.

[0415]Em algumas modalidades, a GFAP ou fragmento de GFAP podem incluir uma sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID Nº: 2, ou a um fragmento da mesma; ou uma sequência de polipeptídeo variante com ao menos cerca de 90% de identidade com a sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID Nº: 2, ou a um fragmento da mesma; e a UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 podem incluir uma sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID Nº: 1, ou a um fragmento da mesma; ou uma sequência de polipeptídeo variante com ao menos cerca de 90% de identidade com a sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID Nº: 1, ou a um fragmento da mesma.

[0416]Em algumas modalidades, o fragmento de GFAP pode ter ao menos cerca de 50%, ao menos cerca de 60%, ao menos cerca de 70%, ao menos cerca de 80%, ao menos cerca de 90%, ao menos cerca de 91%, ao menos cerca de 92%, ao menos cerca de 93%, ao menos cerca de 94%, ao menos cerca de 95%, ao menos cerca de 96%, ao menos cerca de 97%, ao menos cerca de 98%, ao menos cerca de 99%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,9% ou ao menos cerca de 100% o comprimento da sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID Nº: 2. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo variante de GFAP pode ter ao menos cerca de 90%, ao menos cerca de 91%, ao menos cerca de 92%, ao menos cerca de 93%, ao menos cerca de 94%, ao menos cerca de 95%, ao menos cerca de 96%, ao menos cerca de 97%, ao menos cerca de 98%, ao menos cerca de 99%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,9% ou ao menos cerca de 100% de identidade com a sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID Nº: 2.

[0417]Em algumas modalidades, o fragmento de UCH-L1 pode ter ao menos cerca de 50%, ao menos cerca de 60%, ao menos cerca de 70%, ao menos cerca de 80%, ao menos cerca de 90%, ao menos cerca de 91%, ao menos cerca de 92%, ao menos cerca de 93%, ao menos cerca de 94%, ao menos cerca de 95%, ao menos cerca de 96%, ao menos cerca de 97%, ao menos cerca de 98%, ao menos cerca de 99%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,9%, ou ao menos cerca de 100% o comprimento da sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID N^º: 1. Em algumas modalidades, a sequência de polipeptídeo variante de UCH-L1 pode ter ao menos cerca de 90%, ao menos cerca de 91%, ao menos cerca de 92%, ao menos cerca de 93%, ao menos cerca de 94%, ao menos cerca de 95%, ao menos cerca de 96%, ao menos cerca de 97%, ao menos cerca de 98%, ao menos cerca de 99%, ao menos cerca de 99,5%, ao menos cerca de 99,9% ou ao menos cerca de 100% de identidade com a sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID N^º: 1.

[0418]Em algumas modalidades, a GFAP ou fragmento de GFAP podem incluir uma sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID N^º: 2, ou a um fragmento da mesma; e a UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 compreendem uma sequência de polipeptídeo correspondente à SEQ ID N^º: 1, ou a um fragmento da mesma.

[0419]Em algumas modalidades, a quantidade de referência corresponde a:

- i) um nível de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medido em um paciente controle saudável (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); ii) uma média dos níveis de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medidos em uma população de pacientes controle saudáveis;
- iii) um nível máximo de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, medido em uma população de pacientes controle saudáveis (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); iv) um nível mínimo de GFAP, UCH-L1, ou

de uma combinação dessas, medido em uma população de pacientes controle saudáveis (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); v) um nível de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle saudáveis (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça); vi) um nível de GFAP, UCH-L1, ou de uma combinação dessas, determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle saudáveis (isto é, um paciente ou pacientes que não sofreram uma lesão na cabeça).

[0420]Logo, o calibrador ou composição controle são adequados para uso em um ensaio para medir a GFAP, UCH-L1, ou uma combinação dessas, em uma amostra obtida de um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça.

c. GFAP

[0421]Em algumas modalidades, o calibrador ou composição controle inclui uma quantidade de GFAP ou fragmento de GFAP adequada para uso na medição sobre a faixa dinâmica do ensaio, que abrange a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP. Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a: i) um nível de GFAP medido em um paciente controle ortopédico que não sofreu uma lesão na cabeça; ii) uma média dos níveis de GFAP medidos em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; iii) um nível máximo de GFAP medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; ou iv) um nível mínimo de GFAP medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; v) um nível de GFAP determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; ou vi) um nível de GFAP determinado no

percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça.

[0422]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a uma média dos níveis de GFAP medidos em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 35 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 35 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ou ao menos cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 25 pg/mL.

[0423]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a um nível máximo de GFAP medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 175 pg/mL e cerca de 250 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 350 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 350 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de

250 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 225 pg/mL, ao menos cerca de 230 pg/mL, ao menos cerca de 235 pg/mL, ao menos cerca de 240 pg/mL, ao menos cerca de 245 pg/mL, ou ao menos cerca de 250 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 217 pg/mL.

[0424]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a um nível de GFAP determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 0,5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 40 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 10 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 0,5 pg/mL, ao menos cerca de 1 pg/mL, ao menos cerca de 1,5 pg/mL, ao menos cerca de 2 pg/mL, ao menos cerca de 2,5 pg/mL, ao menos cerca de 3 pg/mL, ao menos cerca de 5 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ou ao menos cerca de 15 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 2 pg/mL.

[0425]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a um nível de GFAP determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 60 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL,

entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 200 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 105 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 115 pg/mL, ao menos cerca de 125 pg/mL, ao menos cerca de 150 pg/mL, ou ao menos cerca de 200 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 117 pg/mL.

[0426]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a: i) um nível de GFAP medido em um paciente controle saudável que não sofreu uma lesão na cabeça; ii) uma média dos níveis de GFAP medidos em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; iii) um nível máximo de GFAP medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; iv) um nível mínimo de GFAP medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; v) um nível de GFAP determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; ou vi) um nível de GFAP determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça.

[0427]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a uma média dos níveis de GFAP medidos em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 0,5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 1 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 11 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 11 pg/mL e cerca de 25 pg/mL, entre ao menos

cerca de 11 pg/mL e cerca de 20 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 5 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 11 pg/mL, ao menos cerca de 12 pg/mL, ao menos cerca de 13 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ou ao menos cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 11 pg/mL.

[0428]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a um nível máximo de GFAP medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 35 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 35 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ou ao menos cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 27 pg/mL.

[0429]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de GFAP ou fragmento de GFAP corresponde a um nível de GFAP determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos

cerca de 35 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 35 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ou ao menos cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 27 pg/mL.

d. UCH-L1

[0430]Em algumas modalidades, o calibrador ou composição controle inclui uma quantidade de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 adequada para uso na medição sobre a faixa dinâmica do ensaio, que abrange a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1. Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a: i) um nível de UCH-L1 medido em um paciente controle ortopédico que não sofreu uma lesão na cabeça; ii) uma média dos níveis de UCH-L1 medidos em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; iii) um nível máximo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; iv) um nível mínimo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; v) um nível de UCH-L1 determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça; ou vi) um nível de UCH-L1 determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça.

[0431]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a uma média dos níveis de UCH-L1 medidos em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na

cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 140 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 175 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre ao menos cerca de 150 pg/mL e cerca de 250 pg/mL, entre ao menos cerca de 175 pg/mL e cerca de 225 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 150 pg/mL, ao menos cerca de 175 pg/mL, ao menos cerca de 180 pg/mL, ao menos cerca de 190 pg/mL, ao menos cerca de 200 pg/mL, ao menos cerca de 210 pg/mL, ou ao menos cerca de 220 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 200 pg/mL.

[0432]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível máximo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 340 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre cerca de 1.000 pg/mL e cerca de 2.500 pg/mL, entre cerca de 1.250 pg/mL e cerca de 2.500 pg/mL, entre cerca de 1.500 pg/mL e cerca de 2.500 pg/mL, entre cerca de 1.750 pg/mL e cerca de 2.500 pg/mL, entre cerca de 1.600 pg/mL e cerca de 1.800 pg/mL, entre cerca de 1.600 pg/mL e cerca de 1.750 pg/mL, entre cerca de 1.650 pg/mL e cerca de 1.750 pg/mL, ou entre cerca de 1.675 pg/mL e cerca de 1.725 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 1.500 pg/mL, ao menos cerca de 1.550 pg/mL, ao menos cerca de 1.600 pg/mL, ao menos cerca de 1.650 pg/mL, ao menos cerca de 1.700 pg/mL, ao menos cerca de 1.750 pg/mL, ou ao menos cerca de 1.800 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 1703 pg/mL.

[0433]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível mínimo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 5 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 25 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 5 pg/mL, ao menos cerca de 10 pg/mL, ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ou ao menos cerca de 35 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 15 pg/mL.

[0434]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível de UCH-L1 determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 15 pg/mL e cerca de 45 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 40 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 35 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 15 pg/mL, ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30

pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ou ao menos cerca de 45 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 31 pg/mL.

[0435]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível de UCH-L1 determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle ortopédicos que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 350 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 400 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 450 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre ao menos cerca de 450 pg/mL e cerca de 650 pg/mL, entre ao menos cerca de 450 pg/mL e cerca de 550 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 500 pg/mL e cerca de 550 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 450 pg/mL, ao menos cerca de 475 pg/mL, ao menos cerca de 500 pg/mL, ao menos cerca de 525 pg/mL, ao menos cerca de 550 pg/mL, ao menos cerca de 600 pg/mL, ou ao menos cerca de 650 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 521 pg/mL.

[0436]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a: i) um nível de UCH-L1 medido em um paciente controle saudável que não sofreu uma lesão na cabeça; ii) uma média dos níveis de UCH-L1 medidos em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; iii) um nível máximo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; iv) um nível mínimo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça; v) um nível de UCH-L1 determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle saudáveis que

não sofreram uma lesão na cabeça; ou vi) um nível de UCH-L1 determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça.

[0437]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a uma média dos níveis de UCH-L1 medidos em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 75 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 125 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 50 pg/mL e cerca de 60 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ao menos cerca de 50 pg/mL, ao menos cerca de 55 pg/mL, ao menos cerca de 60 pg/mL, ao menos cerca de 65 pg/mL, ou ao menos cerca de 70 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 55 pg/mL.

[0438]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível máximo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao

menos cerca de 90 pg/mL, ao menos cerca de 95 pg/mL, ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 105 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 115 pg/mL, ou ao menos cerca de 125 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 106 pg/mL.

[0439]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível mínimo de UCH-L1 medido em uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 35 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 35 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ou ao menos cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 26 pg/mL.

[0440]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível de UCH-L1 determinado no percentil 5 de uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 30 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 35 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 40 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, entre ao menos cerca de 20 pg/mL e cerca de 35 pg/mL, entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 25 pg/mL e cerca de 30 pg/mL.

pg/mL e cerca de 30 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 20 pg/mL, ao menos cerca de 25 pg/mL, ao menos cerca de 30 pg/mL, ao menos cerca de 35 pg/mL, ao menos cerca de 40 pg/mL, ao menos cerca de 45 pg/mL, ou ao menos cerca de 50 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 26 pg/mL.

[0441]Em algumas modalidades, a quantidade de referência de UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 corresponde a um nível de UCH-L1 determinado no percentil 95 de uma população de pacientes controle saudáveis que não sofreram uma lesão na cabeça. Em algumas modalidades, a média pode ser entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 200 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 250 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 300 pg/mL e cerca de 500 pg/mL, entre ao menos cerca de 90 pg/mL e cerca de 200 pg/mL, entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, ou entre ao menos cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 90 pg/mL, ao menos cerca de 95 pg/mL, ao menos cerca de 100 pg/mL, ao menos cerca de 105 pg/mL, ao menos cerca de 110 pg/mL, ao menos cerca de 115 pg/mL, ou ao menos cerca de 125 pg/mL. Em algumas modalidades, a média pode ser de ao menos cerca de 106 pg/mL.

14. *Kit*

[0442]É proposto neste documento um *kit*, que pode ser usado nos métodos descritos neste documento para examinar ou avaliar uma amostra de teste quanto à UCH-L1 e/ou GFAP ou fragmento de UCH-L1 e/ou fragmento de GFAP. O *kit* compreende ao menos um componente para examinar a amostra de teste quanto à UCH-L1 e/ou GFAP e instruções para examinar a amostra de teste quanto à UCH-L1 e/ou GFAP. Por exemplo, um *kit* pode compreender instruções para examinar a amostra de teste quanto à UCH-L1 e/ou GFAP por meio de um imunoensaio, por

exemplo, imunoensaio de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência. As instruções incluídas nos *kits* podem ser afixadas no material da embalagem ou podem ser incluídas como um encarte dentro da embalagem, ou podem ser visualizadas ou baixadas de um *site* específico que é tido como parte da embalagem ou dos materiais incluídos no *kit*. Embora as instruções sejam tipicamente materiais redigidos ou impressos, elas não se limitam a tanto. Qualquer meio capaz de armazenar essas instruções e comunicá-las ao usuário final é contemplado pela presente revelação. Esses meios incluem, entre outros, meios de armazenamento eletrônicos (por exemplo, discos magnéticos, fitas, cartuchos, *chips*), meios ópticos (por exemplo, CD-ROM) e seus semelhantes. Conforme usado neste documento, o termo "instruções" pode incluir o endereço de um *site* na Internet que forneça as instruções.

[0443]O ao menos um componente pode incluir ao menos uma composição compreendendo um ou mais anticorpos isolados ou fragmentos de anticorpo dos mesmos que ligam-se especificamente à UCH-L1 e/ou à GFAP. O anticorpo pode ser um anticorpo de captura de UCH-L1 e/ou GFAP e/ou um anticorpo de detecção de UCH-L1 e/ou GFAP.

[0444]Como alternativa, ou em aditamento, o *kit* pode compreender um calibrador ou controle, conforme descrito acima, por exemplo, purificado e opcionalmente liofilizado, UCH-L1 e/ou GFAP, e/ou ao menos um recipiente (por exemplo, tubo, placas ou tiras de microtitulação, que podem ser prontamente revestidas com um anticorpo monoclonal anti-UCH-L1 e/ou anti-GFAP) para realizar o ensaio, e/ou um tampão, tal como um tampão de ensaio ou um tampão de lavagem, qualquer um dos quais pode ser fornecido como uma solução concentrada, uma solução de substrato para o marcador detectável (por exemplo, um marcador enzimático), ou uma solução de interrupção. De preferência, o *kit* comprehende todos os componentes, isto é, reagentes, padrões, tampões, diluentes etc., que são

necessários para realizar o ensaio. As instruções também podem incluir instruções para gerar uma curva padrão.

[0445]O *kit* pode compreender ainda padrões de referência para quantificar a UCH-L1 e/ou GFAP. Os padrões de referência podem ser usados para estabelecer curvas padrão para a interpolação e/ou extração das concentrações de UCH-L1 e/ou GFAP. Os padrões de referência podem incluir um nível de concentração de UCH-L1 e/ou GFAP alto, por exemplo, de cerca de 100.000 pg/mL, cerca de 125.000 pg/mL, cerca de 150.000 pg/mL, cerca de 175.000 pg/mL, cerca de 200.000 pg/mL, cerca de 225.000 pg/mL, cerca de 250.000 pg/mL, cerca de 275.000 pg/mL, ou cerca de 300.000 pg/mL; um nível de concentração de UCH-L1 e/ou GFAP médio, por exemplo, de cerca de 25.000 pg/mL, cerca de 40.000 pg/mL, cerca de 45.000 pg/mL, cerca de 50.000 pg/mL, cerca de 55.000 pg/mL, cerca de 60.000 pg/mL, cerca de 75.000 pg/mL, ou cerca de 100.000 pg/mL; e/ou um nível de concentração de UCH-L1 e/ou GFAP baixo, por exemplo, de cerca de 1 pg/mL, cerca de 5 pg/mL, cerca de 10 pg/mL, cerca de 12,5 pg/mL, cerca de 15 pg/mL, cerca de 20 pg/mL, cerca de 25 pg/mL, cerca de 30 pg/mL, cerca de 35 pg/mL, cerca de 40 pg/mL, cerca de 45 pg/mL, cerca de 50 pg/mL, cerca de 55 pg/mL, cerca de 60 pg/mL, cerca de 65 pg/mL, cerca de 70 pg/mL, cerca de 75 pg/mL, cerca de 80 pg/mL, cerca de 85 pg/mL, cerca de 90 pg/mL, cerca de 95 pg/mL, ou cerca de 100 pg/mL.

[0446]Quaisquer anticorpos, que são fornecidos no *kit*, tais como anticorpos recombinantes específicos à UCH-L1 e/ou GFAP, podem incorporar um marcador detectável, tal como um fluoróforo, grupamento radioativo, enzima, marcador biotina/avidina, cromóforo, marcador quimioluminescente, ou algo do gênero, ou o *kit* pode incluir reagentes para marcar os anticorpos ou reagentes para detectar os anticorpos (por exemplo, anticorpos de detecção) e/ou para marcar os analitos (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP) ou reagentes para detectar o analito (por exemplo, UCH-L1 e/ou GFAP). Os anticorpos, calibradores e/ou controles podem ser

fornecidos em recipientes diferentes ou pré-dispensados em um formato de ensaio apropriado, por exemplo, em placas de microtitulação.

[0447]Como opção, o *kit* inclui componentes de controle de qualidade (por exemplo, painéis de sensibilidade, calibradores e controles positivos). O preparo de reagentes de controle de qualidade é bem conhecido na técnica e é descrito em encartes instrutivos para uma variedade de produtos imunodiagnósticos. Membros do painel de sensibilidade são usados, como opção, para estabelecer características de desempenho do ensaio e, além disso, são opcionalmente indicadores úteis da integridade dos reagentes do *kit* de imunoensaio e da padronização dos ensaios.

[0448]O *kit* também pode incluir, como opção, outros reagentes necessários para realizar um ensaio diagnóstico ou facilitar avaliações de controle de qualidade, tais como tampões, sais, enzimas, cofatores enzimáticos, substratos, reagentes de detecção e seus semelhantes. Outros componentes, tais como tampões e soluções para o isolamento e/ou tratamento de uma amostra de teste (por exemplo, reagentes de pré-tratamento), também podem ser incluídos no *kit*. O *kit* pode incluir ainda um ou mais outros controles. Um ou mais dos componentes do *kit* podem ser liofilizados, caso esse em que o *kit* pode compreender ainda reagentes adequados para a reconstituição dos componentes liofilizados.

[0449]Os vários componentes do *kit* são opcionalmente fornecidos em recipientes adequados de acordo com o necessário, por exemplo, uma placa de microtitulação. O *kit* pode incluir ainda recipientes para conter ou armazenar uma amostra (por exemplo, um recipiente ou cartucho para uma amostra de urina, sangue total, plasma ou soro). Quando apropriado, o *kit* também pode conter, como opção, vasos de reação, vasos de mistura e outros componentes que facilitem o preparo de reagentes ou da amostra de teste. O *kit* também pode incluir um ou mais instrumentos para ajudar a obter uma amostra de teste, tal como uma seringa, pipeta, fórceps, colher medidora, ou algo do gênero.

[0450]Se o marcador detectável for ao menos um composto de acridínio, o *kit* pode compreender ao menos uma acridínio-9-carboxamida, ao menos um aril éster de acridínio-9-carboxilato, ou qualquer combinação desses. Se o marcador detectável for ao menos um composto de acridínio, o *kit* também pode compreender uma fonte de peróxido de hidrogênio, tal como um tampão, solução e/ou ao menos uma solução básica. Se desejado, o *kit* pode conter uma fase sólida, tal como uma partícula magnética, conta, tubo de ensaio, placa de microtitulação, cubeta, membrana, molécula de arcabouço, filme, papel-filtro, disco ou *chip*.

[0451]Se desejado, o *kit* pode compreender ainda um ou mais componentes, à parte ou em combinação adicional às instruções, para examinar a amostra de teste quanto à presença de outro analito, que pode ser um biomarcador, tal como um biomarcador de um transtorno ou lesão cerebral traumática.

a. Adaptação do *kit* e método

[0452]O *kit* (ou componentes do mesmo), bem como o método para avaliar ou determinar a concentração de UCH-L1 e/ou GFAP em uma amostra de teste por meio de um imunoensaio conforme descrito neste documento, pode ser adaptado para uso em uma variedade de sistemas automatizados e semiautomatizados (incluindo aqueles em que a fase sólida compreende uma micropartícula), conforme descrito, por exemplo, na Patente dos EUA nº 5.063.081, Publicação de Pedido de Patente dos EUA nº 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078 e 2006/0160164 e conforme comercializado, por exemplo, pela Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como Abbott Point of Care (i-STAT® ou i-STAT Alinity, Abbott Laboratories), bem como os descritos nas Patentes dos EUA nº. 5.089.424 e 5.006.309 e conforme comercializados, por exemplo, pela Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT® ou a série de dispositivos Abbott Alinity.

[0453]Algumas das diferenças entre um sistema automatizado ou semiautomatizado em comparação a um sistema não automatizado (por exemplo,

ELISA) incluem o substrato ao qual o primeiro parceiro de ligação específica (por exemplo, anticorpo do analito ou anticorpo de captura) se liga (o que pode afetar a formação do sanduíche e a reatividade do analito) e a duração e temporização das etapas de captura, detecção e/ou qualquer etapa opcional de lavagem. Ao passo que um formato não automatizado, tal como ELISA, pode exigir um tempo de incubação relativamente mais longo para a amostra e reagente de captura (por exemplo, de cerca de 2 horas), um formato automatizado ou semiautomatizado (por exemplo, ARCHITECT® e qualquer plataforma sucessora, Abbott Laboratories) pode ter um tempo de incubação relativamente mais curto (por exemplo, de cerca de 18 minutos para o ARCHITECT®). À semelhança, ao passo que um formato não automatizado, tal como ELISA, pode incubar um anticorpo de detecção, tal como o reagente conjugado, por um tempo de incubação relativamente mais longo (por exemplo, de cerca de 2 horas), um formato automatizado ou semiautomatizado (por exemplo, ARCHITECT® e qualquer plataforma sucessora) pode ter um tempo de incubação relativamente mais curto (por exemplo, de cerca de 4 minutos para o ARCHITECT® e qualquer plataforma sucessora).

[0454]Outras plataformas disponibilizadas pela Abbott Laboratories incluem, entre outras, a AxSYM®, IMx® (vide, por exemplo, a Patente dos EUA nº 5.294.404, a qual incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra), PRISM®, IEE (conta) e Quantum™ II, além de outras plataformas. Além disso, os ensaios, *kits* e componentes do *kit* podem ser empregados em outros formatos, por exemplo, em sistemas de ensaio eletroquímico ou outros sistemas de ensaio portáteis ou *point-of-care*. Conforme mencionado previamente, a presente revelação aplica-se, por exemplo, ao sistema de imunoensaio eletroquímico comercial Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) que desempenha imunoensaios em sanduíche. Imunossensores e seus métodos de fabricação e operação em dispositivos de teste de uso único são descritos, por exemplo, na Patente dos EUA nº 5.063.081,

Publicações de Pedido de Patente dos EUA 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078 e 2006/0160164, as quais incorporam-se ao presente documento na íntegra por referência por seus ensinamentos com relação aos mesmos.

[0455]Em particular, no que se refere à adaptação de um ensaio para o sistema i-STAT®, a configuração a seguir é preferível. Um *chip* de silício microfabricado é produzido com um par de elétrodos de trabalho amperométricos de ouro e um elétodo de referência de prata-cloreto de prata. Em um dos elétrodos de trabalho, contas de poliestireno (de 0,2 mm de diâmetro) com um anticorpo de captura imobilizado são aderidas a um revestimento polimérico de álcool polivinílico padronizado sobre o elétodo. Esse *chip* é montado em um cartucho i-STAT® com um formato fluídico adequado para o imunoensaio. Em uma parte do *chip* de silício, há um parceiro de ligação específica para a UCH-L1 e/ou GFAP, tal como um ou mais anticorpos da UCH-L1 e/ou GFAP (um ou mais anticorpos monoclonais/policlonais ou um fragmento desses, uma variante desses, ou um fragmento de uma variante desses capaz de ligar-se à UCH-L1 e/ou GFAP) ou uma ou mais DVD-Igs anti-UCH-L1 e/ou anti-GFAP (ou um fragmento dessas, uma variante dessas ou um fragmento de uma variante dessas capaz de ligar-se à UCH-L1 e/ou GFAP), qualquer um dos quais pode ser marcado detectavelmente. Dentro da bolsa de fluido do cartucho encontra-se um reagente aquoso que inclui fosfato de p-aminofenol.

[0456]Em operação, uma amostra de um paciente suspeito de sofrer de LCT é adicionada à câmara de retenção do cartucho de teste, e o cartucho é inserido no leitor i-STAT®. Um elemento de bomba dentro do cartucho impele a amostra para dentro de um conduíte contendo o *chip*. A amostra é colocada em contato com os sensores, permitindo que a enzima conjugue-se para dissolver-se na amostra. A amostra é oscilada através dos sensores para promover a formação do sanduíche em cerca de 2 a 12 minutos. Na penúltima etapa do ensaio, a amostra é impelida

para dentro de uma câmara de rejeitos, e um fluido de lavagem, contendo um substrato para a enzima fosfatase alcalina, é usado para lavar o excesso de conjugado enzimático e tirar uma amostra do *chip* sensorial. Na etapa final do ensaio, o marcador fosfatase alcalina reage com o fosfato de p-aminofenol para clivar o grupo fosfato e permitir que o p-aminofenol liberado seja oxidado eletroquimicamente no elétrodo de trabalho. Com base na corrente medida, o leitor é capaz de calcular a quantidade de GFAP e/ou UCH-L1 na amostra por meio de um algoritmo embutido e curva de calibragem determinada de fábrica. A adaptação de um cartucho para uso multíplex, tal como usado para i-Stat, foi descrita na literatura de patente, tal como, por exemplo, na Patente dos EUA nº 6.438.498, cujo conteúdo incorpora-se ao presente documento por referência.

[0457]Os métodos e *kits* conforme descritos neste documento abrangem necessariamente outros reagentes e métodos para realizar o imunoensaio. Por exemplo, abrangem-se vários tampões tal como são conhecidos no setor e/ou que podem ser prontamente preparados ou otimizados para ser empregados, por exemplo, na lavagem, como um diluente conjugado, e/ou como um diluente calibrador. Um exemplo de diluente conjugado é o diluente conjugado ARCHITECT® empregado em certos *kits* (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) e contendo ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES), um sal, um bloqueador de proteína, um agente antimicrobiano, e um detergente. Um exemplo de diluente calibrador é o diluente conjugado humano ARCHITECT® empregado em certos *kits* (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que compreende um tampão contendo MES, outro sal, um bloqueador de proteína, e um agente antimicrobiano. Além disso, conforme descrito no Pedido de Patente EUA nº 61/142.048 depositado no dia 31 de dezembro de 2008, é possível obter uma geração de sinais aprimorada, por exemplo, em um formato de cartucho i-STAT®, usando uma sequência de ácido nucleico ligada ao anticorpo de sinal como um amplificador de sinais.

[0458]Embora certas modalidades neste documento sejam vantajosas quando empregadas para avaliar a doença, tal como uma lesão cerebral traumática, os ensaios e *kits* também podem ser opcionalmente empregados para avaliar a UCH-L1 e/ou GFAP em outras doenças, transtornos e condições, conforme apropriado.

[0459]O método de ensaio também pode ser usado para identificar um composto que atenua uma doença, tal como uma lesão cerebral traumática. Por exemplo, uma célula que expressa a UCH-L1 e/ou GFAP pode ser colocada em contato com um composto candidato. O nível de expressão de UCH-L1 e/ou GFAP na célula colocada em contato com o composto pode ser comparado ao nível de expressão em uma célula controle usando o método de ensaio descrito neste documento. Este pedido faz referência ao Pedido dos EUA nº 62/596.805 depositado no dia 9 de dezembro de 2017, ao Pedido dos EUA nº 62/611.707 depositado no dia 29 de dezembro de 2017 e ao Pedido dos EUA nº 62/652.734 depositado no dia 4 de abril de 2018, cada um deles com o título "METHODS FOR AIDING IN THE DIAGNOSIS AND EVALUATION OF A HUMAN SUBJECT WHO HAS SUSTAINED AN ORTHOPEDIC INJURY AND THAT HAS OR MAY HAVE SUSTAINED AN INJURY TO THE HEAD, SUCH AS MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY (LCT), USING GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP) AND/OR UBIQUITIN CARBOXY-TERMINAL HYDROLASE L1 (UCH-L1)".

[0460]A presente revelação possui vários aspectos, ilustrados pelos exemplos não exaustivos a seguir.

15. Exemplos

[0461]Os versados na técnica perceberão prontamente que outras modificações e adaptações adequadas dos métodos da presente revelação descritos neste documento são prontamente aplicáveis e apreciáveis e podem ser realizadas usando equivalentes adequados sem, com isso, divergir do âmbito da

presente revelação ou dos aspectos e modalidades reveladas neste documento. Tendo agora descrito a presente revelação em detalhes, a mesma será entendida com mais clareza por referência aos exemplos a seguir, que visam meramente a tão somente ilustrar alguns aspectos e modalidades da revelação, e não devem ser interpretados de modo a limitar o âmbito da revelação. As revelações de todas as referências como revistas, patentes dos EUA e publicações citadas neste documento incorporam-se ao presente documento por referência na íntegra.

[0462]A presente revelação possui vários aspectos, ilustrados pelos exemplos não exaustivos a seguir.

Exemplo 1

Ensaios usados nos exemplos

[0463]Ensaio de UCH-L1 i-STAT®. Pares de anticorpos monoclonais, tais como Anticorpo A como um anticorpo monoclonal de captura e Anticorpos B e C como um anticorpo monoclonal de detecção, foram testados. O Anticorpo A é um exemplo de anticorpo anti-UCH-L1 que foi desenvolvido internamente na Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). Os Anticorpos B e C reconhecem diferentes epítopos da UCH-L1 e aprimoram a detecção de抗ígenos na amostra, tendo sido desenvolvidos pela Banyan Biomarkers (Alachua, Flórida). A combinação dos anticorpos proporciona um efeito sinérgico quando usados em conjunto e emite um sinal mais evidente em comparação ao uso dos anticorpos de forma não combinada. Outros anticorpos que foram desenvolvidos internamente na Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) também exibem ou espera-se que exibam um aprimoramento semelhante dos sinais quando usados em conjunto como anticorpos de captura ou anticorpos de detecção em várias combinações. O conceito do ensaio de UCH-L1 foi avaliado em relação a atributos de desempenho chave. A configuração do cartucho foi Configuração dos Anticorpos: Anticorpo A (Anticorpo de Captura)/Anticorpo B+C (Anticorpo de Detecção); Condições do Reagente: 0,8% de sólidos, 125 µg /mL de

um conjugado de clúster de Fab-Fosfatase Alcalina; e Impressão de Entrada da Amostra: padrão UCH-L1. O tempo de ensaio foi de 10 a 15 min (com um tempo de captura de amostra de 7 a 12 min). O ensaio de UCH-L1 i-STAT foi usado em um estudo de uma população de pacientes com LCT.

[0464]Ensaio de GFAP i-STAT®. Utilizou-se o ensaio de GFAP i-STAT® em um estudo de uma população de pacientes com LCT. Pares de anticorpos monoclonais, tais como Anticorpo A como um anticorpo monoclonal de captura e Anticorpos B como um anticorpo monoclonal de detecção, foram usados. O Anticorpo A e o Anticorpo B são exemplos de anticorpos anti-GFAP que foram desenvolvidos internamente na Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). Ambos o Anticorpo A e o Anticorpo B ligam-se a epítopos dentro do mesmo produto de decomposição (BDP) da GFAP. A combinação dos anticorpos proporcionou um efeito sinérgico quando usados em conjunto e emitiu um sinal mais evidente em comparação ao uso dos anticorpos de maneira não combinada. O conceito do ensaio de GFAP foi avaliado em relação a atributos de desempenho chave. A configuração do cartucho foi Configuração dos Anticorpos: Anticorpo A (Anticorpo de Captura)/Anticorpo B (Anticorpo de Detecção); Condições do Reagente: 0,8% de sólidos, 250 µg /mL de um conjugado de clúster de Fab-Fosfatase Alcalina; e Impressão de Entrada de Amostra: específica para GFAP. O tempo de ensaio foi de 10 a 15 min (com um tempo de captura de amostra de 7 a 12 min).

Exemplo 2

Estudo de uma população com LCT (TRACK-LCT)

[0465]O estudo *Transforming Research and Clinical Knowledge in Traumatic Brain Injury* (TRACK-LCT, "Transformando a Pesquisa e o Conhecimento Clínico em Lesão Cerebral Traumática") é um projeto grande e complexo. Sua parceria institucional e público-privada é composta por mais de 11 clínicas, 7 núcleos, com um total de aproximadamente 50 instituições, corporações e iniciativas filantrópicas

colaborando. Um estudo TRACK-LCT piloto precoce, baseado nos dados clínicos de três clínicas, ajudou a refinar os Elementos de Dado Comuns da LCT e gerou um protótipo das Informações Comuns da LCT para o estudo TRACK-LCT.

[0466]Grupos de Pacientes: Um total de 2.700 a 3.000 pacientes com LCT foram inscritos uniformemente em 3 grupos clínicos, diferenciados pela via de atendimento clínico: 1. Pacientes avaliados no Pronto-Socorro e dispensados (PS); 2. Pacientes admitidos no hospital, mas não na UTI (ADM); e 3. Pacientes admitidos na UTI (UTI). Mais 100 pacientes por grupo clínico ($n = 300$) com traumatismo extracraniano mas sem LCT foram inscritos como controle, resultando em um cadastro total de 3.000 pacientes. Esse plano de estratificação facilitou a análise por pesquisa por eficácia comparativa (CER) e não limitou-se à diferenciação tradicional em LCT "Leve/Moderada/Grave". A coleta de dados dependeu da via de atendimento clínico (PS, ADM, UTI) e dos requisitos de cada meta. Os pacientes em cada grupo foram estratificados em 3 coortes que definiriam a extensão dos dados a coletar.

[0467]Os controles foram pacientes adultos com traumatismo ortopédico que satisfizeram os critérios a seguir: 1. Um Escore de Lesão Abreviado de ≤ 4 (sem risco de morte) para lesão nas extremidades e/ou pelve e/ou fratura de costela; 2. Satisfação dos mesmos critérios de inclusão e exclusão que os pacientes com LCT, sendo que os critérios de submissão a TC ou IRM na PS por suspeita de lesão na cabeça não se aplicam. Uma LCT foi descartada para a lesão presente ao entrevistar os controles em potencial acerca de perda da consciência (PDC), distúrbios de consciência e amnésia pós-traumática (APT); 3. Cada local recebeu um plano para o número de controles alvo de acordo com as distribuições de idade e sexo derivadas do Coorte com LCT. e 4. Os controles foram inscritos no coorte CA-IRM para acompanhamento e rebaixados para avaliação abrangente (CA) em 2 semanas se incapazes de concluir a visita para IRM.

[0468]Elegibilidade dos pacientes: Foram inscritos pacientes adultos de todas as idades que se apresentaram ao Pronto-Socorro (PS) com um histórico de LCT aguda de acordo com os Critérios do Congresso Americano de Medicina de Reabilitação (ACRM), em que o paciente sofrera um rompimento psicológico da função cerebral induzido traumticamente, conforme manifesto por \geq um dos seguintes critérios: qualquer período de perda da consciência (PDC); qualquer perda de memória (por exemplo, amnésia) para eventos imediatamente antes ou depois do acidente; qualquer alteração de estado mental quando do acidente (torpor, desorientação e/ou confusão); e/ou déficits neurológicos que podem ou não ser permanentes. "Traumaticamente induzido" inclui golpe contra a cabeça, pancada da cabeça contra um objeto, ou o cérebro ser submetido a um movimento de aceleração/desaceleração (por exemplo, chicote) sem traumatismo externo direto na cabeça.

[0469]Os Critérios de Inclusão/Exclusão usados são dados na Tabela 2.

Tabela 2

Critérios	Fonte dos Dados	Comentários
Critérios de Inclusão		
1. Idade 0 a 89	Formulário	
2. LCT documentada/verificada (Critérios do ACRM)	Formulário, Entrevista	
3. Lesão ocorrida há $<$ 24 horas	Formulário, Entrevista	
4. TC cerebral aguda para atendimento clínico	Formulário	O paciente deve fazer uma varredura por TC
5. Acuidade visual/audição adequada nos testes	Formulário, Entrevista	
6. Fluência em Inglês ou Espanhol	Formulário, Entrevista	Bateria de testes ou disponibilidade de pessoal

Critérios	Fonte dos Dados	Comentários
7. Capacidade de dar seu consentimento informado	Entrevista	
Critérios de Exclusão		
1. Politraumatismo significativo que interferiria no acompanhamento e na avaliação dos resultados	Formulário	O traumatismo corporal significativo pode confundir os resultados dos testes de LCT.
2. Presidiários ou pacientes sob custódia	Formulário, Entrevista	
3. Gravidez em pacientes do sexo feminino	Formulário, Entrevista	
4. Pacientes em reclusão psiquiátrica (por exemplo, 5150, 5250)	Formulário	
5. Transtornos de saúde mental de base debilitante relevantes (por exemplo, esquizofrenia ou transtorno bipolar) que interfeririam no acompanhamento e na validade da avaliação dos resultados	Formulário, Entrevista	Os transtornos psiquiátricos debilitantes podem prejudicar significativamente a confiabilidade do acompanhamento e/ou impor dificuldades em atribuir um índice de LCT.
6. Doença neurológica debilitante relevante (por exemplo, derrame, AVC, demência, tumor), prejudicando a cognição consciente padrão ou a validade do acompanhamento e da avaliação dos resultados	Formulário, Entrevista	O prejuízo cognitivo padrão debilitado documentado confundirá a avaliação dos resultados além de não haver consentimento pleno.

Critérios	Fonte dos Dados	Comentários
7. Histórico significativo de condições pré-existentes que interfeririam no acompanhamento e na avaliação dos resultados (por exemplo, abuso de substâncias, alcoolismo, HIV/AIDS, doenças transmissíveis importantes que poderiam inferir no consentimento, cânceres em estágio terminal, déficits de aprendizado, transtornos de desenvolvimento)	Formulário, Entrevista	
8. Contraindicações à IRM (para o coorte CA+IRM)	Triagem por IRM	
9. Baixa probabilidade de acompanhamento (por exemplo, participante ou família indicando falta de interesse, residência em outro estado ou país, situação de rua ou falta de contatos confiáveis)	Entrevista	
10. Participante atualmente em um teste interventivo (por exemplo, fármaco, dispositivo, comportamental)	Formulário, Entrevista	Uma exceção à exclusão por inscrição conjunta se dá para locais participando do estudo sobre o Ácido Tranexâmico Pré-Hospital para a LCT do Consórcio de Resultados de Reanimação (ROC).
11. LCT Penetrante	Formulário	
12. Lesão na coluna vertebral com escore ASIA de C ou menos	Formulário	

[0470]Para cada um dos 3 grupos clínicos (isto é, PS, ADM e UTI), os pacientes foram adicionalmente inscritos em um de três coortes de avaliação diferentes: Coorte de Avaliação Breve (Coorte AB), Coorte de Avaliação Abrangente (AA) ou Coorte de Avaliação Abrangente + IRM (AA+IRM). A Tabela 3 traz o plano de metas com uma taxa de acompanhamento de 80%.

Tabela 3

Grupo	Ano 1			Ano 2			Ano 3			Ano 4	Total
	AA+IRM	AA	N	AA+IRM	AA	N	AA	AB	N	AB	N
PS	150	87	237	50	58	108	155	100	255	300	900
ADM	150	87	237	50	58	108	155	100	255	300	900
UTI	150	87	237	50	58	108	155	100	255	300	900
Controles	0	99	99	0	66	66	135	0	135	0	300
Total	450	360	810	150	240	390	600	300	900	900	3000

[0471]O Coorte de Avaliação Breve (AB) incluiu 1.200 pacientes ao todo, sendo 400 pacientes para cada Grupo PS, ADM e UTI. Os dados a seguir foram reunidos para o Coorte AB: dados demográficos e dados de evolução clínica completos; extração de sangue para o soro, plasma, DNA e RNA no Dia 1 (<24 horas de lesão); nova extração de sangue para o soro dentro de 3 a 6 horas da coleta de referência no Dia 1 (a inclusão deste componente é opcional para os locais); varredura por TC clínica do cérebro a partir do Dia 1 obtida como parte do curso hospitalar; e dados de resultado coletados via entrevista estruturada por telefone a 2 semanas, 3, 6 e 12 meses usando as medidas de resultado Principais NIH LCT-CDEs v.2.0 conforme publicadas no site da NINDS CDE.

[0472]O Coorte de Avaliação Abrangente (AA) incluiu 1.200 pacientes ao todo, sendo 300 pacientes + 100 controles para cada Grupo PS, ADM e UTI. Os dados a seguir foram reunidos para o Coorte AA: dados demográficos e dados de evolução clínica completos; dados clínicos diários de alta densidade para os Grupos ADM e UTI; extração de sangue para o soro, plasma, RNA e DNA no Dia 1 (<24 horas de lesão); nova extração de sangue para o soro dentro de 3 a 6 horas da coleta de referência no Dia 1 (a inclusão deste componente é opcional para os locais); extração de sangue para o soro, plasma e RNA nos Dias 3 (48 a 72 horas) e 5 (96 a 120 horas) para ADM e UTI; coleta do fluido cerebroespinhal nos dias 1 a 5 (a inclusão deste componente é opcional para os locais); todas as varreduras por TC clínica do cérebro obtidas como parte do curso hospitalar; extração de sangue para o soro, plasma e RNA a 2 semanas e 6 meses; e dados de resultado coletados via entrevista estruturada pessoalmente a 2 semanas, 6 e 12 meses e a 3 meses via entrevista estruturada por telefone usando as medidas de resultado Principais, Básicas e Complementares NIH LCT-CDEs v.2.0.

[0473]O Coorte Avaliação Abrangente + IRM (AA+IRM) incluiu 600 pacientes ao todo, sendo 200 pacientes para cada Grupo PS, ADM e UTI. Os dados a seguir

foram reunidos para o Coorte AA+IRM: dados demográficos e dados de evolução clínica completos; dados clínicos diários de alta densidade para os Grupos ADM e UTI; extração de sangue para o soro, plasma, RNA e DNA no Dia 1 (<24 horas de lesão); nova extração de sangue para o soro dentro de 3 a 6 horas da coleta de referência no Dia 1 (a inclusão deste componente é opcional para os locais); extração de sangue para o soro, plasma e RNA nos Dias 3 (48 a 72 horas) e 5 (96 a 120 horas) para ADM e UTI; coleta do fluido cerebroespinhal nos dias 1 a 5 (a inclusão deste componente é opcional para os locais); todas as varreduras por TC clínica da cabeça obtidas como parte do curso hospitalar; extração de sangue para o soro, plasma e RNA a 2 semanas e 6 meses; IRM de pesquisa 3T obtida a 2 semanas e 6 meses; e dados de resultado coletados via entrevista estruturada pessoalmente a 2 semanas, 6 e 12 meses e a 3 meses via entrevista estruturada por telefone usando as medidas de resultado Principais, Básicas e Complementares NIH LCT-CDEs v.2.0.

[0474] Mediante a inscrição, a coleta de dados começou no hospital. Para pacientes AA+IRM, a IRM de 2 semanas foi concluída a 14 dias \pm 4 dias a contar da data da lesão. Os resultados correspondentes de 2 semanas foram concluídos a \pm 3 dias da IRM de 2 semanas. Para pacientes AA e AB, os resultados de 2 semanas foram concluídos a \pm 4 dias de 14 dias a contar da data da lesão. Os resultados em 3 meses foram concluídos a \pm 7 dias de 90 dias a contar da data da lesão. Para pacientes AA+IRM, as IRMs de 6 meses foram realizadas a \pm 14 dias de 180 dias a contar da data da lesão, com os resultados correspondentes de 6 meses a \pm 14 dias da IRM de 6 meses. Para pacientes AA e AB, os resultados de 6 meses foram concluídos em \pm 14 dias de 180 dias a contar da data da lesão. A BTACT deve ser concluída com \pm 7 dias de Resultados (mas não no mesmo dia e em não mais de 201 dias a contar da lesão). Os resultados em 12 meses foram concluídos a \pm 30 dias de 360 dias a contar da data da lesão.

[0475]Além da extração de sangue dentro de 24 horas da lesão cerebral, cada paciente recebeu uma avaliação médica extensiva incluindo TC da cabeça, testes neuropsiquiátricos, Escore de Coma de Glasgow (GCS), e muitos pacientes também passaram por uma IRM de acompanhamento dentro de 2 semanas da lesão. Após um protocolo de extração de sangue padronizado meticuloso e processamento, as amostras de plasma foram divididas em alíquotas para armazenamento a -80° C, em seguida congeladas e testadas. Cada amostra foi testada em duplicata, sendo os resultados listados uma média dos dois testes.

[0476]A Tabela 4 traz os possíveis resultados de pacientes com LCT usando um nível de referência confirmado por varredura por TC.

Tabela 4

	Afecção de LCT (TC da cabeça positiva)	Não afecção de LCT (TC da cabeça negativa)	
> nível de referência	Verdadeiro Positivo (TP)	Falsos Positivos (FP)	Total de Positivos (T _{POSITIVOS})
< nível de referência	Falsos Negativos (FN)	Verdadeiros Negativos (VN)	Total de Negativos (T _{NEGATIVOS})
	Total de Afecções de LCT (T _{LCT})	Total Não LCT (T _{NÃO LCT})	

[0477]A sensibilidade foi determinada pelo teste: VP/T_{LCT}, e a especificidade foi determinada pelo teste: VN/T_{NÃO LCT}. A VPP foi determinada por VP/T_{POSITIVOS}. O VPN foi determinado por VN/T_{NEGATIVOS}. A precisão foi determinada por (VP + VN)/T_{TODOS OS PACIENTES}.

Exemplo 3

Uso de calibradores e controles

[0478]A UCH-L1 e a GFAP foram medidas com uma amostragem pequena de 59 pacientes TRACK-LCT no formato de ensaio i-STAT (Tabela 5).

Tabela 5: Características dos pacientes por varredura de TC e resultados da IRM

Características dos Pacientes	Total (n = 59)	TC ou IRM Positiva ^a (n = 46, 77-97%)	TC e IRM Negativa ^a (n = 13, 22,03%)	Valor P
Idade	46,0 [24,0 a 60,0]	45,5 [23,0 a 60,0]	50,0 [39,0 a 57,0]	0,7419
Sexo				
Masculino	50 / 59 (85%)	39 / 46 (85%)	11 / 13 (85%)	1,0000
Feminino	9 / 59 (15%)	7 / 46(15%)	2 / 113 (15%)	
Raça/Etnia				
Afro-americana ou africana	6 / 58 (10%)	4 / 45 (9%)	2 /13 (15%)	0,2398
Caucasiana	48 / 58 (83%)	39 / 45 (87%)	9 / 13 (69%)	
Hispânica	4 / 58 (7%)	2 / 45 (4%)	2 /13 (15%)	
Histórico de LCT				
Sim, sem PDC	9 / 56 (16%)	3 / 43 (7%)	6 / 13 (46%)	0,0037
Sim, com PDC	8 / 56 (14%)	6 / 43 (14%)	2 /13 (15%)	
Sem LCT anterior	39 / 56 (70%)	34 / 43 (79%)	5 / 13 (38%)	
Apresentação no PS				
Perda de Consciência				
Não	6 / 58 (10%)	2 / 45 (4%)	4 / 13 (31%)	0,0227
Sim	47 / 58 (81%)	38 / 45 (84%)	9 / 13 (69%)	
Desconhecido	5 / 58 (9%)	5 / 45 (11%)		
Escala de Coma de Glasgow	15,0 [3,0 a 15,0]	14,0 [3,0 a 15,0]	15,0 [15,0 a 15,0]	0,0162
Classificação na Escala de Coma de Glasgow				
Grave (3-8)	16 / 59 (27%)	16 / 46 (35%)		0,0177
Moderada (9-12)	3 / 59 (5%)	3 / 46 (7%)		
Leve (13-15)	40 / 59 (68%)	27 / 46 (59%)	13 / 13 (100%)	
Mecanismo de Lesão				
Veículo motorizado (motorista/passageiro)	10 / 59 (17%)	9 / 46 (20%)	1 / 13 (3%)	0,2975
Motocicleta/ATV/Carro de Golf (motorista/passageiro)	5 / 59 (8%)	3 / 46 (7%)	2 /13 (15%)	

Indivíduo atingido por qualquer tipo de veículo	3 / 59 (5%)	2 / 46 (4%)	1 / 13 (8%)	
Queda de objeto em movimento (bicicleta/skate/cavalo/etc.)	3 / 59 (5%)	3 / 46 (7%)		
Queda de ambiente parado (telhado/ escada/etc.)	27 / 59 (46%)	20 / 46 (43%)	7 / 13 (54%)	
Ataque	10 / 59 (17%)	9 / 46 (20%)	1 / 13 (3%)	
Golpe na cabeça por objeto, mas não ataque (árvore/etc.)	1 / 59 (2%)		1 / 13 (3%)	
Nível de álcool (g/dL)	0,1 [0,0 a 0,2]	0,1 [0,0 a 0,2]	0,0 [0,0 a 0,0]	0,1588
Triagem de Drogas				
Negativa	51 / 59 (86%)	41 / 46 (89%)	10 / 13 (77%)	0,3567
Positiva	8 / 59 (14%)	5 / 46 (11%)	3 / 13 (23%)	
Resultados do Biomarcador				
Horário da coleta desde a lesão (minutos)	771,0 (\pm 339,8)	779,4 (\pm 296,8)	743,0 (\pm 468,7)	0,7383
GJFAP (pg/mL)	643,8 [188,6 a 2138,6]	876,6 [519,7 a 2409,5]	31,3 [26,3 a 166,2]	<0,0001
UCH-Li (pg/mL)	342,5 [102,8 a 718,3]	514,0 [167,2 a 859,8]	62,4 [44,5 a 136,8]	<0,0001
Escores Prognósticos				
Escala de Resultados de Glasgow (3 meses)	6,0 [5,0 a 7,0]	5,5 [4,0 a 7,0]	7,0 [7,0 a 7,0]	0,0130
Escala de Resultados de Glasgow (6 meses)	6,0 [5,0 a 7,0]	6,0 [4,0 a 7,0]	7,0 [5,5 a 7,5]	0,1941
Escala de Resultados de Glasgow (12 meses)	7,0 [5,0 a 8,0]	6,5 [5,0 a 8,0]	7,0 [6,0 a 8,0]	0,4412
Primeiros 3 Itens no Questionário Rivermead (6 meses)	0,0 [0,0 a 2,0]	0,0 [0,0 a 2,5]	0,0 [0,0 a 2,0]	0,8378
Últimos 13 Itens no Questionário Rivermead (6 meses)	9,0 [4,0 a 15,0]	8,5 [4,0 a 15,0]	13,0 [0,0 a 27,0]	0,5449

Índice de Velocidade de Processamento WAIS-III (6 meses)	30,0 [5,0 a 55,0]	30,0 [5,0 a 50,0]	43,0 [18,0 a 77,0]	0,3235
Escala de Satisfação com a Vida (6 meses)	21,5 (\pm 6,2)	217 (\pm 5,7)	20,4 (\pm 8,5)	0,6205
Medida de Independência Funcional (6 meses)	126,0 [125,0 a 126,0]	126,0 [124,0 a 126,0]	126,0 [126,0 a 126,0]	0,2958

^a 24 pacientes foram submetidos a IRM.

As variáveis contínuas são dadas pela mediana [Faixa Interquartílica 25-75%] e comparadas usando o teste de soma dos postos de Wilcoxon ou Média (\pm Desvio Padrão) e comparadas usando um teste t baseado na distribuição dos dados.

[0479]As variáveis categóricas são dadas por número/total (porcentagem) e comparadas usando o teste Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher.

[0480]Em um estudo maior, os níveis de GFAP e os níveis de UCH-L1 foram medidos em amostras obtidas de pacientes dentro de 24 a 48 horas após sofrer uma lesão na cabeça, bem como de pacientes controle ortopédicos e pacientes controle saudáveis. Os pacientes que sofreram uma lesão na cabeça foram identificados com uma LCT leve ou LCT moderada a grave com base na Escala de Coma de Glasgow (GCS). A Tabela 6 traz os níveis de GFAP e níveis de UCH-L1 médios, mínimos, máximos, percentílicos 5 e percentílicos 95 em amostras controle saudáveis ("Controle"), amostras controle ortopédicas ("Controle Orto"), amostras de LCT leve ("LCT leve"), ou amostras de LCT leve ou moderada a grave (LCT Leve ou Moderada/Grave), e amostras de LCT moderada a grave (LCT Moderada/Grave).

Tabela 6: Características dos pacientes

Biomarcador	Condição	N	Mediana	Média	Desvio Padrão	Min.	Max.	Percentil 5	Percentil 95
GFAP	Controle	17	11	11	6,5	0	27	0	27
	Controle Orto	38	14	22	29,7	2	181	2	67
	LCT Leve*	1123	244	803	2191,0	0	35085	9	3160
	LCT Leve ou Moderada/Grave	1378	335	1828	6529,4	0	130418	9	6459
	LCT Moderada/Grave**	201	3095	7116	14607,8	5	130418	123	26717
UCH-L1	Controle	17	53	55	23,9	26	106	26	106
	Controle Orto	38	120	149	73,0	62	345	68	305
	LCT Leve*	1123	175	292	416,0	1	6399	39	870
	LCT Leve ou Moderada/Grave	1378	200	441	863,9	1	11020	42	1575
	LCT Moderada/Grave**	201	684	1157	1636,3	42	10390	92	3385

*Escala de Coma de Glasgow ≥ 13

**Escala de Coma de Glasgow ≤ 12

[0481]Análise de todas as LCT vs. todos os controles: A FIG. 1A ilustra uma análise característica operacional do receptor (ROC) dos níveis de GFAP em todas as amostras com LCT em comparação aos níveis de GFAP em todas as amostras controle (AUC = 0,906). A FIG. 1B ilustra uma análise ROC dos níveis de UCH-L1 em todas as amostras com LCT em comparação aos níveis de UCH-L1 em todas as amostras controle (AUC = 0,727). Esse dados demonstram o valor diagnóstico preditivo do uso de valores de referência da GFAP e UCH-L1 para ajudar a distinguir pacientes que têm uma LCT de pacientes sem uma LCT. Por exemplo, conforme demonstram a FIG. 1A e a Tabela 7 concomitante, os níveis de referência de GFAP podem ser usados para determinar se um paciente sofreu uma LCT. Os cortes de GFAP de cerca de 10 pg/mL a cerca de 94 pg/mL exibiram sensibilidades na faixa de 70,03% a cerca de 94,78% e especificidades na faixa de cerca de 30,91% a cerca de 98,18%.

Tabela 7: Todas as LCT vs. Todos os Controles: GFAP

Obs.	Corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	YJ*	Neg.	Pos.	Falso Neg.	Falso Pos.
392	94	70,03%	98,18%	0,99896	0,11563	0,68211	54	965	413	1
393	93	70,17%	98,18%	0,99897	0,11613	0,68356	54	967	411	1
438	45	78,88%	94,55%	0,99725	0,15160	0,73428	52	1087	291	3
439	44	79,10%	94,55%	0,99726	0,15294	0,73646	52	1090	288	3
472	11	93,54%	40,00%	0,97504	0,19820	0,33541	22	1289	89	33
473	10	94,78%	30,91%	0,97173	0,19101	0,25684	17	1306	72	38

**"YJ" indica estatística J de Youden (também chamada de índice de Youden).

[0482]Análise de LCT Leve vs. Controle Orto: A FIG. 2A ilustra uma análise característica operacional do receptor (ROC) dos níveis de GFAP em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de GFAP em amostras controle ortopédicas ($AUC = 0,878$). A FIG. 2B ilustra uma análise ROC dos níveis de UCH-L1 em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de UCH-L1 em amostras controle ortopédicas ($AUC = 0,606$). Esses dados demonstram o valor diagnóstico preditivo do uso de valores de referência da GFAP e/ou UCH-L1 para ajudar a distinguir pacientes que sofreram uma lesão ortopédica e uma LCT leve de pacientes que sofreram uma lesão ortopédica mas sem uma LCT. Por exemplo, conforme demonstram a FIG. 2A e a Tabela 8 concomitante, os níveis de referência de GFAP, ou à parte ou em combinação aos níveis de referência de UCH-L1, podem ser usados para determinar se um paciente sofreu uma LCT. Outrossim, conforme demonstram a FIG. 2B e a Tabela 9 concomitante, os níveis de referência de UCH-L1, à parte ou em combinação aos níveis de referência de GFAP, podem ser usados para determinar se um paciente sofreu uma LCT. Os cortes de GFAP de cerca de 11 pg/mL a cerca de 72 pg/mL exibiram sensibilidades na faixa de 70,17% a cerca de 92,34% e especificidades na faixa de cerca de 36,84% a cerca de 97,37%.

Tabela 8: LCT Leve vs. Controles Orto: GFAP

Obs.	Corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	YJ	Neg.	Pos.	Falso Neg.	Falso Pos.
419	72	70,17%	97,37%	0,99873	0,09946	0,67538	37	788	335	1
420	70	70,35%	97,37%	0,99874	0,10000	0,67716	37	790	333	1
443	46	75,60%	92,11%	0,99648	0,11327	0,67706	35	849	274	3
444	45	75,69%	92,11%	0,99648	0,11364	0,67795	35	850	273	3
477	12	90,83%	42,11%	0,97889	0,13445	0,32933	16	1020	103	22
478	11	92,34%	36,84%	0,97738	0,14000	0,29184	14	1037	86	24

Tabela 9: LCT Leve vs. Controles Orto: UCH-L1

Obs.	Corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	YJ	Neg.	Pos.	Falso Neg.	Falso Pos.
256	289	30,01%	92,11%	0,99118	0,042631	0,22114	35	337	786	3
257	288	30,45%	92,11%	0,99130	0,042892	0,22559	35	342	781	3
270	271	32,68%	92,11%	0,99189	0,044248	0,24786	35	367	756	3
271	269	32,77%	92,11%	0,99191	0,044304	0,24875	35	368	755	3
286	248	35,53%	92,11%	0,99254	0,046113	0,27635	35	399	724	3
287	247	35,80%	92,11%	0,99259	0,046296	0,27902	35	402	721	3

[0483]Suspeita de LCT vs. Controle Orto por Segmentos de Tempo:
Realizou-se uma análise para determinar se os níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras obtidas de pacientes em vários segmentos de tempo ao longo de 24 a 48 horas após a lesão (ou suspeita de lesão) na cabeça poderiam ser usados para diferenciar pacientes que exibiram uma suspeita de LCT de pacientes que exibiram uma lesão ortopédica mas sem LCT (controles orto). Os níveis de GFAP e UCH-L1 em amostras obtidas dentro de 0 a 4 horas, dentro de 4 a 8 horas, dentro de 8 a 12 horas, dentro de 12 a 16 horas, dentro de 16 a 20 horas, dentro de 20 a 24 horas, e dentro de 24 a 48 horas da suspeita de lesão na cabeça foram usados na análise. A Tabela 10 traz os valores AUC para as curvas ROC que foram geradas, bem como as faixas dos níveis de referência (corte) com valores de sensibilidade, especificidade, VPN e VPP.

Tabela 10

Análise		Faixa de GFAP (pg/mL)	Faixa de Sensibilidade (%)	Faixa de Especificidade (%)	Faixa de VPN (%)	Faixa de VPP (%)	AUC	Faixa de UCH-L1 (pg/mL)	Faixa de Sensibilidade (%) * abaixo de 70%	Faixa de Especificidade (%)	Faixa de VPN (%)	Faixa de VPP (%)	AUC
Suspeita de LCT vs. Orto	0 a 4 h	11-12	81-83	37-42	47-47	76-77	0,757	106-116	82-87	32-50	48-53	75-80	0,758
	4 a 8 h	11-60	70-93	37-95	36-50	89-99	0,868	105-125	80-85	32-50	26-35	87-90	0,76
	8 a 12 h	11-128	70-95	37-97	41-68	88-99	0,930	226-520	NA*	82-100	24-28	93-100	0,691
	12 a 16 h	11-143	71-92	37-97	34-49	90-99	0,900	226-363	NA*	82-100	18-20	94-100	0,644
	16 a 20 h	11-133	70-94	37-97	33-52	91-99	0,910	226-315	NA*	82-97	17-18	93-99	0,62
	20 a 24 h	11-119	70-96	37-97	27-52	93-100	0,913	225-278	NA*	82-92	13-13	94-97	0,567
	24 a 48 h	11-255	71-95	37-100	78-90	60-100	0,907	225	NA*	82	54	63	0,588

[0484]Análise de LCT Leve vs. Controle Saudável: A FIG. 3A ilustra uma análise característica operacional do receptor (ROC) dos níveis de GFAP em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de GFAP em amostras controle saudáveis (AUC = 0,921). A FIG. 3B ilustra uma análise ROC dos níveis de UCH-L1 em amostras com LCT leve em comparação aos níveis de UCH-L1 em amostras controle saudáveis (AUC = 0,888). Esses dados demonstram o valor diagnóstico preditivo do uso de valores de referência da GFAP e UCH-L1 para ajudar a distinguir pacientes que sofreram uma LCT leve de pacientes saudáveis (isto é, sem uma lesão na cabeça). Por exemplo, conforme demonstram a FIG. 3A e a Tabela 11 concomitante, os níveis de referência de GFAP, à parte ou em combinação aos níveis de referência de UCH-L1, podem ser usados para determinar se um paciente sofreu uma LCT. Outrossim, conforme demonstram a FIG. 3B e a Tabela 12 concomitante, os níveis de referência de UCH-L1, ou à parte ou em combinação a níveis de referência de GFAP, podem ser usados para determinar se um paciente sofreu uma LCT. Os cortes de GFAP de cerca de 9 pg/mL a cerca de 72 pg/mL exibiram sensibilidades na faixa de 70,17% a cerca de 95,01% e especificidades na faixa de cerca de 35,29% a cerca de 100%. Os cortes de UCH-L1 de cerca de 40 pg/mL a cerca de 108 pg/mL exibiram sensibilidades na faixa de 70,26% a cerca de 94,92% e especificidades na faixa de cerca de 35,29% a cerca de 100%.

Tabela 11: LCT Leve vs. Controles Saudáveis: GFAP

Obs.	Corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	YJ	Neg.	Pos.	Falso Neg.	Falso Pos.
207	72	70,17%	100,0%	1,00000	0,04830	0,70169	17	788	335	0
208	70	70,35%	100,0%	1,00000	0,04857	0,70347	17	790	333	0
241	35	79,16%	100,0%	1,00000	0,06773	0,79163	17	889	234	0
242	34	79,34%	100,0%	1,00000	0,06827	0,79341	17	891	232	0
266	10	93,77%	47,06%	0,99153	0,10256	0,40826	8	1053	70	9
267	9	95,01%	35,29%	0,98980	0,09677	0,30307	6	1067	56	11

Tabela 12: LCT Leve vs. Controles Saudáveis: UCH-L1

Obs.	Corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	YJ	Neg.	Pos.	Falso Neg.	Falso Pos.
393	108	70,26%	100,0%	1,00000	0,048433	0,70258	17	789	334	0
394	107	70,35%	100,0%	1,00000	0,048571	0,70347	17	790	333	0
447	51	91,01%	47,06%	0,99127	0,073394	0,38065	8	1022	101	9
448	50	91,27%	47,06%	0,99130	0,075472	0,38332	8	1025	98	9
457	41	94,57%	35,29%	0,98975	0,089552	0,29862	6	1062	61	11
458	40	94,92%	35,29%	0,98979	0,095238	0,30218	6	1066	57	11

[0485]Suspeita de LCT vs. Controle Saudável por Segmentos de Tempo:
Realizou-se uma análise para determinar se os níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras obtidas de pacientes em vários segmentos de tempo ao longo de 24 a 48 horas após a lesão (ou suspeita de lesão) na cabeça poderiam ser usados para diferenciar pacientes que exibiram uma suspeita de LCT de pacientes que não exibiram nenhuma lesão (controles saudáveis). Os níveis de GFAP e UCH-L1 em amostras obtidas dentro de 0 a 4 horas, dentro de 4 a 8 horas, dentro de 8 a 12 horas, dentro de 12 a 16 horas, dentro de 16 a 20 horas, dentro de 20 a 24 horas, e dentro de 24 a 48 horas da suspeita de lesão na cabeça foram usados na análise. A Tabela 13 traz os valores AUC para cada uma das curvas ROC, bem como as faixas dos níveis de referência (corte) com valores de sensibilidade, especificidade, VPN e VPP.

Tabela 13

Análise		Faixa de GFAP (pg/mL)	Faixa de Sensibilidade (%)	Faixa de Especificidade (%)	Faixa de VPN (%)	Faixa de VPP (%)	AUC	Faixa de UCH-L1 (pg/mL)	Faixa de Sensibilidade (%) * abaixo de 70%	Faixa de Especificidade (%)	Faixa de VPN (%)	Faixa de VPP (%)	AUC
Suspeita de LCT vs. Saudável	0 a 4 h	9-20	72-84	35-94	29-40	88-99	0,820	42-160	71-99	35-100	39-88	89-100	0,964
	4 a 8 h	9-60	70-97	35-100	21-50	95-100	0,920	42-166	70-98	35-100	21-58	95-100	0,945
	8 a 12 h	9-128	70-97	35-100	24-62	94-100	0,959	42-136	70-98	35-100	24-64	94-100	0,929
	12 a 16 h	9-143	71-95	35-100	19-36	95-100	0,929	41-114	70-96	35-100	19-38	95-100	0,902
	16 a 20 h	9-133	70-96	35-100	18-39	96-100	0,941	40-118	71-94	35-100	19-32	96-100	0,884
	20 a 24 h	9-119	70-98	35-100	15-46	97-100	0,951	40-97	71-95	35-94	14-25	97-100	0,875
	24 a 48 h	9-255	71-95	35-100	61-85	77-100	0,935	42-118	71-95	35-100	59-78	77-100	0,884

Exemplo 4

Análise Combinada de GFAP e UCH-L1

[0486]Análise de Suspeita de LCT vs. Controle Orto: A FIG. 4 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes com uma lesão ortopédica e em pacientes com suspeita de ter uma LCT. Cada ponto de dados reflete valores de referência de GFAP e UCH-L1 para dada sensibilidade e especificidade. Esses dados demonstram o valor diagnóstico preditivo de usar valores de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 em combinação. Por exemplo, conforme demonstram a FIG. 4 e a Tabela 14 concomitante, níveis de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 podem ser usados em combinação para determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também pode ter sofrido uma lesão cerebral traumática.

Tabela 14: Cortes do biomarcador (níveis de referência) da combinação GFAP/UCH-L1 para distinguir pacientes que podem ter sofrido uma LCT de pacientes que só

sofreram uma lesão ortopédica

Sensibilidade	Especificidade	GFAP (pg/mL)	UCH-L1 (pg/mL)	VPN	VPP
70,03%	92,11%	175	250	7,81%	99,69%
70,25%	92,11%	170	250	7,87%	99,69%
70,46%	97,37%	90	2000	8,33%	99,90%
78,88%	92,11%	45	2000	10,74%	99,72%
80,04%	84,21%	70	230	10,42%	99,46%
84,40%	81,58%	35	250	12,60%	99,40%
90,06%	50,00%	25	130	12,18%	98,49%
91,29%	31,58%	25	110	9,09%	97,98%
91,51%	36,84%	20	120	10,69%	98,13%
92,89%	31,58%	15	120	10,91%	98,01%
93,54%	36,84%	10	2000	13,59%	98,17%
94,78%	31,58%	10	180	14,29%	98,05%

[0487]Análise de Suspeita de LCT vs. Controle Saudável. A FIG. 5 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes com uma suspeita de lesão e em

pacientes sem uma lesão (saudáveis). Cada ponto de dados reflete valores de referência de GFAP e UCH-L1 para dada sensibilidade e especificidade. Esses dados demonstram o valor diagnóstico preditivo de usar valores de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 em combinação. Por exemplo, conforme demonstram a FIG. 5 e a Tabela 15 concomitante, os níveis de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 podem ser usados em combinação para determinar se um paciente sofreu uma lesão LCT.

Tabela 15: Cortes do biomarcador (níveis de referência) de uma combinação

GFAP/UCH-L1 para pacientes com suspeita de ter uma lesão de cabeça

Sensibilidade	Especificidade	GFAP (pg/mL)	UCH-L1 (pg/mL)	VNP	VPP
70,46%	100,00%	90	2000	4,01%	100,00%
93,54%	47,06%	10	2000	8,25%	99,31%
95,57%	35,29%	510	40	8,96%	99,17%
95,57%	35,29%	1000	40	8,96%	99,17%
95,94%	35,29%	305	40	9,68%	99,17%
96,59%	35,29%	105	40	11,32%	99,18%
96,59%	35,29%	110	40	11,32%	99,18%
97,39%	35,29%	30	40	14,29%	99,19%
97,97%	35,29%	10	60	17,65%	99,19%

Exemplo 5

Suspeita de LCT vs. Controles Orto por Segmentos de Tempo

[0488] Além de avaliar os níveis totais de GFAP e UCH-L1 ao longo de 24 a 48 horas após a lesão (ou suspeita de lesão) na cabeça, a análise também foi realizada em vários segmentos de tempo durante essas 48 horas pós-lesão. A Tabela 16 traz os níveis de GFAP médios, mínimos, máximos, percentílicos 5 e percentílicos 95 em amostras obtidas de pacientes após 0 a 4 horas, 4 a 8 horas, 8 a 12 horas, 12 a 16 horas, 16 a 20 horas, 20 a 24 horas e 24 a 48 horas da lesão na cabeça. A Tabela 17 traz os níveis de UCH-L1 médios, mínimos, máximos, percentílicos 5 e percentílicos 95 em amostras obtidas de pacientes após 0 a 4

horas, 4 a 8 horas, 8 a 12 horas, 12 a 16 horas, 16 a 20 horas, 20 a 24 horas e 24 a 48 horas da lesão na cabeça.

Tabela 16: Níveis de GFAP por Segmento de Tempo

Janela de tempo	Tipo	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Percentil 5	Percentil 95
0 a 4 horas	LCT Leve*	86	162	243,8	3	1108	4	754
	LCT Leve ou Moderada/Grave	93	1726	13566,3	3	130418	4	931
	LCT Moderada/Grave**	3	44204	74671,2	28	130418	28	130418
4 a 8 horas	LCT Leve*	182	427	707,1	0	5251	10	1503
	LCT Leve ou Moderada/Grave	212	845	1744,9	0	11933	10	4192
	LCT Moderada/Grave**	20	4230	3205,9	753	11933	802	10371
8 a 12 horas	LCT Leve*	143	1030	3190,6	2	35085	12	3662
	LCT Leve ou Moderada/Grave	177	1677	4474,2	2	35085	12	6356
	LCT Moderada/Grave**	30	4969	7617,8	10	33907	202	24659
12 a 16 horas	LCT Leve*	192	951	1859,9	0	16445	8	4359
	LCT Leve ou Moderada/Grave	242	2129	5759,3	0	53244	9	7894
	LCT Moderada/Grave**	42	6296	10701,7	73	53244	109	19745
16 a 20 horas	LCT Leve*	208	869	1936,0	2	22515	9	3401
	LCT Leve ou Moderada/Grave	252	1619	3533,2	2	31671	9	6222
	LCT Moderada/Grave**	38	5775	6529,9	5	31671	358	16294
20 a 24 horas	LCT Leve*	264	1030	2938,8	1	35004	11	3757
	LCT Leve ou Moderada/Grave	335	2265	7829,2	1	101104	12	8374
	LCT Moderada/Grave**	55	8731	16907,3	13	101104	83	31220

Janela de tempo	Tipo	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Percentil 5	Percentil 95
24 a 48 horas	LCT Leve*	24	736	1270,5	5	6131	7	1634
	LCT Leve ou Moderada/Grave	38	2966	7248,2	5	41781	7	17388
	LCT Moderada/Grave**	8	2789	2708,1	14	7179	14	7179

*Escala de Coma de Glasgow ≥ 13

**Escala de Coma de Glasgow ≤ 12

Tabela 17: Níveis de UCH-L1 por Segmento de Tempo

Janela de tempo	Condição	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Percentil 5	Percentil 95
0 a 4 horas	LCT Leve*	86	350	325,0	22	2235	77	870
	LCT Leve ou Moderada/Grave	93	555	1321,9	22	10390	77	1183
	LCT Moderada/Grave**	3	6036	5312,9	116	10390	116	10390
4 a 8 horas	LCT Leve*	182	398	476,1	6	3134	56	1207
	LCT Leve ou Moderada/Grave	212	593	1054,3	6	9187	56	2124
	LCT Moderada/Grave**	20	2258	2537,5	48	9187	129	9182
8 a 12 horas	LCT Leve*	143	387	570,2	4	3666	50	1160
	LCT Leve ou Moderada/Grave	177	546	958,3	4	8542	51	2447
	LCT Moderada/Grave**	30	1363	1771,2	100	8542	173	5816
12 a 16 horas	LCT Leve*	192	312	581,4	6	6399	39	900
	LCT Leve ou Moderada/Grave	242	503	945,0	6	8235	43	2216

Janela de tempo	Condição	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Percentil 5	Percentil 95
16 a 20 horas	LCT Moderada/Grave**	42	1262	1605,9	62	8235	72	4348
	LCT Leve*	208	224	227,2	1	1424	34	686
	LCT Leve ou Moderada/Grave	252	343	474,6	1	3488	38	1256
	LCT Moderada/Grave**	38	920	735,5	90	2901	154	2532
20 a 24 horas	LCT Leve*	264	203	215,1	9	1882	36	549
	LCT Leve ou Moderada/Grave	335	272	327,9	9	2062	38	996
	LCT Moderada/Grave**	55	632	525,8	42	2062	74	1634
24 a 48 horas	LCT Leve*	24	164	152,0	20	717	27	444
	LCT Leve ou Moderada/Grave	38	679	1895,3	20	11020	27	4481
	LCT Moderada/Grave**	8	370	299,3	161	890	161	890

*Escala de Coma de Glasgow ≥ 13

**Escala de Coma de Glasgow ≤ 12

[0489]A Tabela 18 traz as faixas das sensibilidades, especificidades, VPN e VPP para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em vários pontos no tempo.

Tabela 18: Análise da Combinação GFAP/UCH-L1

Análise		Faixa de Sensibilidade	Faixa de Especificidade	Faixa de GFAP	Faixa de UCH-L1	Faixa de VPN	Faixa de VPP
Suspeita de LCT vs. Orto	Todas	70,03-94,78	31,58-97,37	10-175	110-2000	7,81-14,29	97,96-99,9
	0 a 4 h	73,12-80,65	82,35-94,12	15-20	230-2000	39,02-43,75	96,15-98,55
	4 a 8 h	70,28-94,81	31,58-94,74	10-195	120-2000	35,71-52,17	88,29-98,68
	8 a 12 h	70,06-96,05	31,58-97,37	10-275	110-2000	39,77-66,67	86,17-99,32
	12 a 16 h	70,25-92,98	33,33-97,37	10-165	110-2000	32,71-47,95	89,34-99,49
	16 a 20 h	70,24-94,44	31,58-97,37	10-170	110-2000	31,82-50,00	89,72-99,48
	20 a 24 h	70,15-97,31	31,58-97,37	10-200	110-1230	25,93-57,14	92,17-99,61
	24 a 48 h	71,05-94,74	31,58-100	10-315	110-2000	76,09-87,50	57,38-100

284/366

[0490]A Tabela 19 traz as faixas das sensibilidades, especificidades, VPN e VPP para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em vários pontos no tempo.

Tabela 19: Análise da Combinação GFAP/UCH-L1

Análise		Faixa de Sensibilidade	Faixa de Especificidade	Faixa de GFAP	Faixa de UCH-L1	Faixa de VPN	Faixa de VPP
Suspeita de LCT vs. Saudável	Todas	70,46-97,97	35,29-100	10-1000	40-2000	4,01-17,65	99,17-100
	0 a 4 h	90,32	31,58	25-35	110	57,14	76,36
	4 a 8 h	70,75-98,58	35,29-100	10-1000	40-2000	21,52-66,67	94,98-100
	8 a 12 h	70,06-99,44	35,29-100	10-1000	40-2000	24,29-87,5	94,02-100
	12 a 16 h	70,66-97,11	35,29-100	10-1000	40-2000	19,32-46,15	95,47-100
	16 a 20 h	70,24-98,41	35,29-100	10-1000	40-2000	18,48-60,00	95,56-100
	20 a 24 h	70,45-98,51	35,29-100	10-1000	40-2000	14,66-54,55	96,63-100
	24 a 48 h	71,05-97,37	35,29-100	10-1000	40-2000	60,71-85,71	76,60-100

Exemplo 6

Níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com uma LCT vs. controles ortopédicos

[0491]Além de avaliar as correlações entre os níveis de GFAP e UCH-L1 individualmente com vários indicadores clínicos de LCT usando controles saudáveis, os dados da presente revelação também tratam do valor diagnóstico preditivo de uma combinação dos níveis de referência de GFAP e UCH-L1 para determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma LCT. As análises basearam-se no uso de valores de referência, ou cortes, simultâneos para ambas a GFAP e a UCH-L1.

[0492]A FIG. 6 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com LCT com base em um resultado de varredura por TC (TC positiva) e pacientes controle ortopédicos (TC negativa). Cada ponto de dados (representado por um sinal de "+") representa a sensibilidade e especificidade associadas a um nível de GFAP e a um nível de UCH-L1 de um paciente diagnosticado como tendo uma LCT com base em uma varredura por TC, ou de um paciente ortopédico (TC negativa). Conforme ilustra a FIG. 6, por exemplo, combinações de níveis de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 podem ser correlacionadas a um ou mais resultados clínicos, tais como um resultado de varredura por TC, para determinar se um paciente sofreu uma LCT.

[0493]A Tabela 20 abaixo é um resumo dos dados correlacionando os níveis de referência de GFAP e UCH-L1 a faixas de sensibilidade e especificidade do ensaio em vários pontos no tempo ao longo de 48 horas pós-lesão.

Tabela 20: Cortes do biomarcador (níveis de referência) para a combinação GFAP/UCH-L1 com base no resultado de TC,

Escore GCS e IRM (Controles Orto)							
Suspeita de LCT vs. Orto	Faixa de Sensibilidade	Faixa de Especificidade	Faixa de GFAP	Faixa de UCH-L1	Faixa de VPN	Faixa de VPP	
CT	Todas	90,09-96,64	30-53,01	40-480	110-2000	84,04-93,98	42,54-52,55
	0 a 4 h	<70%	90,40-97,60	370-1000	700-2000	96,8-98,32	25,00-42,86
	4 a 8 h	91,53-98,31	30,37-65,97	20-1000	130-2000	95,10-98,98	30,00-45,45
	8 a 12 h	91,30-98,55	30,14-56,85	25-350	120-2000	89,09-97,92	39,29-50,00
	12 a 16 h	90,52-99,14	30,07-58,74	20-1000	70-2000	85,90-97,87	52,61-64,02
	16 a 20 h	90,65-99,07	30,05-56,83	25-1000	100-2000	87,14-98,28	43,61-55,11
	20 a 24 h	90,32-96,13	30,28-59,63	25-305	100-2000	82,14-93,33	48,29-61,74
	24 a 48 h	70,00-100	32,14-91,07	25-1000	110-2000	89,47-100	32,73-75,00
GCS	Todas	90,05-97,51	30,06-66,22	65-1000	120-2000	96,17-98,7	17,54-29,77
	0 a 4 h	<70%	90,63-97,66	395-1000	710-2000	99,15-99,21	14,29-40,00
	4 a 8 h	90,00-100,00	43,91-86,96	200-1000	210-2000	99,00-100	12,84-37,50
	8 a 12 h	83,33-96,67	30,27-81,62	40-1000	110-2000	96,79-99,06	18,35-43,33
	12 a 16 h	90,48-97,62	30,25-67,65	75-1000	110-2000	95,12-98,99	19,02-33,04
	16 a 20 h	81,58-97,37	30,16-80,16	45-1000	120-2000	96,65-99,31	17,37-38,27
	20 a 24 h	80,00-98,18	30,19-81,13	45-1000	100-2000	95,05-98,99	18,38-42,31
	24 a 48 h	100	60,29	320-1000	180-220	100	22,86
GOSE	Todas	82,61-95,65	30-93,33	80-2000	130-2000	96,92-99,05	12,50-57,58

IRM	Todas	80,60-97,01	31,08-89,19	15-1000	80-2000	82,43-96,36	55,26-87,69
-----	-------	-------------	-------------	---------	---------	-------------	-------------

[0494]Em aditamento, a Tabela 20 traz um resumo dos dados correlacionando os níveis de referência de GFAP e UCH-L1 a faixas de sensibilidade e especificidade do ensaio em vários pontos no tempo ao longo de 48 horas pós-lesão com base no escore GCS. Conforme ilustra a FIG. 7, por exemplo, combinações de níveis de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 podem ser correlacionadas a um ou mais resultados clínicos, tais como escore GCS, para determinar se um paciente sofreu uma LCT.

[0495]A FIG. 8 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com LCT com base em um resultado de IRM (IRM positiva) e pacientes controle ortopédicos (IRM negativa). Cada ponto de dados (representado por um sinal de "+") representa a sensibilidade e especificidade associadas a um nível de GFAP e a um nível de UCH-L1 de um paciente diagnosticado como tendo uma LCT com base em uma varredura por IRM. Conforme ilustra a FIG. 8, combinações de níveis de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 podem ser correlacionadas a um ou mais resultados clínicos, tais como um resultado de varredura por IRM, para determinar se um paciente sofreu uma LCT.

[0496]A FIG. 9 é um gráfico representativo que compara a sensibilidade e especificidade do ensaio para vários níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes diagnosticados com LCT com base no escore GOSE (1 = LCT/óbito) e pacientes controle ortopédicos (8 = saudável/recuperado). Cada ponto de dados (representado por um sinal de "+") representa a sensibilidade e especificidade associadas a um nível de GFAP e a um nível de UCH-L1 de um paciente diagnosticado como tendo uma LCT com base em um escore GOSE igual a 8. Conforme ilustra a FIG. 9, combinações de níveis de referência para ambas a GFAP e a UCH-L1 podem ser correlacionadas a um ou mais resultados clínicos, tais como escores GOSE, para prever a recuperação em um paciente que sofreu uma LCT.

Exemplo 7

Razões de Chances calculadas com base nos níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes com suspeita de ter uma LCT vs. todos os controles

[0497]Realizou-se uma análise para calcular as razões de chances de que um paciente tenha uma LCT com base nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras obtidas de pacientes cerca de 25 horas após a lesão (ou suspeita de lesão) em comparação a pacientes controle ortopédicos e pacientes controle saudáveis com base no estudo TRACK-LCT descrito no Exemplo 2. A Tabela 21 traz um resumo da razão de chances para vários níveis de corte ou referência de GFAP junto com a sensibilidade e especificidade do ensaio. A Tabela 22 traz um resumo da razão de chances para vários níveis de corte ou referência de UCH-L1 junto com a sensibilidade e especificidade do ensaio.

Tabela 21

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
181	61,10%	98,18%	84,8
177	61,18%	98,18%	85,1
176	61,39%	98,18%	85,9
175	61,47%	98,18%	86,1
173	61,61%	98,18%	86,7
172	61,76%	98,18%	87,2
170	61,83%	98,18%	87,5
169	61,90%	98,18%	87,7
167	61,97%	98,18%	88,0
166	62,05%	98,18%	88,3
165	62,12%	98,18%	88,6
164	62,34%	98,18%	89,4
163	62,41%	98,18%	89,7
160	62,55%	98,18%	90,2
159	62,63%	98,18%	90,5
158	62,70%	98,18%	90,8

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
157	62,77%	98,18%	91,1
156	62,92%	98,18%	91,6
154	62,99%	98,18%	91,9
153	63,13%	98,18%	92,5
150	63,21%	98,18%	92,8
149	63,35%	98,18%	93,4
148	63,43%	98,18%	93,6
145	63,64%	98,18%	94,5
144	63,72%	98,18%	94,8
143	64,08%	98,18%	96,3
142	64,30%	98,18%	97,2
141	64,37%	98,18%	97,6
140	64,44%	98,18%	97,9
139	64,66%	98,18%	98,8
137	64,73%	98,18%	99,1
136	64,80%	98,18%	99,4
135	65,02%	98,18%	100,4
134	65,09%	98,18%	100,7
133	65,38%	98,18%	102,0
130	65,67%	98,18%	103,3
128	65,75%	98,18%	103,7
126	65,89%	98,18%	104,3
125	65,97%	98,18%	104,7
123	66,11%	98,18%	105,3
122	66,47%	98,18%	107,1
121	66,62%	98,18%	107,8
119	66,69%	98,18%	108,1
118	66,76%	98,18%	108,5
117	66,84%	98,18%	108,8
116	67,05%	98,18%	109,9
115	67,20%	98,18%	110,6

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
114	67,42%	98,18%	111,7
111	67,71%	98,18%	113,2
109	67,85%	98,18%	114,0
108	67,92%	98,18%	114,4
107	68,00%	98,18%	114,7
106	68,14%	98,18%	115,5
105	68,29%	98,18%	116,3
104	68,43%	98,18%	117,1
102	68,51%	98,18%	117,5
101	68,65%	98,18%	118,2
100	68,94%	98,18%	119,9
99	69,23%	98,18%	121,5
98	69,45%	98,18%	122,8
97	69,59%	98,18%	123,6
96	69,74%	98,18%	124,4
95	69,96%	98,18%	125,7
94	70,03%	98,18%	126,2
93	70,17%	98,18%	127,1
92	70,25%	98,18%	127,5
91	70,32%	98,18%	127,9
90	70,46%	98,18%	128,8
88	71,04%	98,18%	132,5
87	71,48%	98,18%	135,3
86	71,55%	98,18%	135,8
85	71,63%	98,18%	136,3
84	71,77%	98,18%	137,3
83	71,99%	98,18%	138,8
82	72,28%	98,18%	140,8
81	72,42%	98,18%	141,8
80	72,57%	98,18%	142,9
79	72,86%	98,18%	145,0

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
78	72,93%	98,18%	145,5
77	73,15%	98,18%	147,1
76	73,22%	98,18%	147,7
75	73,51%	98,18%	149,9
74	73,73%	98,18%	151,6
73	73,88%	98,18%	152,7
72	74,24%	98,18%	155,6
70	74,38%	98,18%	156,8
69	74,67%	98,18%	159,2
68	74,75%	98,18%	159,8
67	74,75%	96,36%	78,4
66	74,96%	96,36%	79,3
65	75,40%	96,36%	81,2
64	75,69%	96,36%	82,5
63	75,83%	96,36%	83,2
62	75,98%	96,36%	83,8
61	76,20%	96,36%	84,8
60	76,42%	96,36%	85,9
59	76,49%	96,36%	86,2
58	76,56%	96,36%	86,6
57	76,71%	96,36%	87,3
56	76,92%	96,36%	88,3
55	77,07%	96,36%	89,1
54	77,29%	96,36%	90,2
52	77,50%	96,36%	91,3
51	77,58%	96,36%	91,7
50	78,01%	96,36%	94,0
49	78,23%	96,36%	95,2
48	78,52%	96,36%	96,9
47	78,74%	96,36%	98,1
46	78,81%	94,55%	64,5

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
45	78,88%	94,55%	64,7
44	79,10%	94,55%	65,6
43	79,68%	94,55%	68,0
42	79,83%	94,55%	68,6
41	80,26%	90,91%	40,7
40	80,41%	90,91%	41,0
39	80,70%	90,91%	41,8
38	80,91%	90,91%	42,4
37	81,35%	90,91%	43,6
36	81,64%	90,91%	44,5
35	81,86%	90,91%	45,1
34	82,00%	90,91%	45,6
33	82,15%	90,91%	46,0
32	82,66%	90,91%	47,7
14	90,28%	52,73%	10,4
13	91,22%	50,91%	10,8
12	92,24%	45,45%	9,9
11	93,54%	40,00%	9,7
10	94,78%	30,91%	8,1

Tabela 22

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
345	30,84%	98,18%	24,1
342	30,91%	98,18%	24,2
341	31,06%	98,18%	24,3
340	31,20%	98,18%	24,5
338	31,35%	98,18%	24,7
336	31,49%	98,18%	24,8
335	31,57%	98,18%	24,9
334	31,79%	98,18%	25,2
332	31,93%	98,18%	25,3

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
331	32,08%	98,18%	25,5
330	32,22%	98,18%	25,7
328	32,37%	98,18%	25,8
327	32,44%	98,18%	25,9
326	32,51%	98,18%	26,0
322	32,66%	98,18%	26,2
321	32,80%	98,18%	26,4
319	33,02%	98,18%	26,6
318	33,16%	98,18%	26,8
315	33,53%	98,18%	27,2
314	33,74%	98,18%	27,5
313	33,82%	98,18%	27,6
312	33,96%	98,18%	27,8
309	34,11%	98,18%	28,0
308	34,25%	98,18%	28,1
307	34,40%	98,18%	28,3
305	34,69%	96,36%	14,1
304	34,76%	96,36%	14,1
302	34,98%	96,36%	14,3
301	35,05%	94,55%	9,4
300	35,27%	94,55%	9,4
299	35,41%	94,55%	9,5
298	35,56%	94,55%	9,6
297	35,63%	94,55%	9,6
295	35,78%	94,55%	9,7
294	36,14%	94,55%	9,8
293	36,21%	94,55%	9,8
292	36,28%	94,55%	9,9
291	36,50%	94,55%	10,0
290	36,72%	94,55%	10,1
289	36,94%	94,55%	10,2

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
288	37,30%	94,55%	10,3
287	37,37%	94,55%	10,3
286	37,59%	94,55%	10,4
285	37,74%	94,55%	10,5
284	37,88%	94,55%	10,6
283	37,95%	94,55%	10,6
282	38,17%	94,55%	10,7
280	38,39%	94,55%	10,8
279	38,46%	94,55%	10,8
278	38,61%	94,55%	10,9
277	38,82%	94,55%	11,0
276	39,11%	94,55%	11,1
275	39,19%	94,55%	11,2
273	39,33%	94,55%	11,2
271	39,55%	94,55%	11,3
269	39,62%	94,55%	11,4
268	39,70%	94,55%	11,4
267	39,77%	94,55%	11,4
266	40,06%	94,55%	11,6
265	40,42%	94,55%	11,8
264	40,64%	94,55%	11,9
263	40,71%	94,55%	11,9
262	40,86%	94,55%	12,0
261	41,07%	94,55%	12,1
257	41,29%	94,55%	12,2
256	41,44%	94,55%	12,3
255	41,51%	94,55%	12,3
254	41,58%	94,55%	12,3
252	41,73%	94,55%	12,4
251	41,80%	94,55%	12,4
249	41,87%	94,55%	12,5

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
248	42,09%	94,55%	12,6
247	42,31%	94,55%	12,7

Exemplo 8

Razões de Chances calculadas com base nos níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes com suspeita de ter uma LCT leve vs. controles ortopédicos

[0498]Realizou-se uma análise para calcular as razões de chances de que um paciente tenha sofrido uma LCT leve com base nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras obtidas de pacientes determinados como tendo uma LCT leve cerca de 25 horas após a lesão em comparação a pacientes controle ortopédicos com base no estudo TRACK-LCT descrito no Exemplo 2. A Tabela 23 traz um resumo da razão de chances para vários níveis de corte ou referência de GFAP junto com a sensibilidade e especificidade do ensaio. A Tabela 24 traz um resumo da razão de chances para vários níveis de corte ou referência de UCH-L1 junto com a sensibilidade e especificidade do ensaio.

Tabela 23

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
181	55,12%	97,37%	45,4
177	55,21%	97,37%	45,6
176	55,48%	97,37%	46,1
175	55,57%	97,37%	46,3
173	55,74%	97,37%	46,6
172	55,92%	97,37%	46,9
170	56,01%	97,37%	47,1
169	56,10%	97,37%	47,3
167	56,19%	97,37%	47,5
166	56,28%	97,37%	47,6
165	56,37%	97,37%	47,8
164	56,63%	97,37%	48,3
163	56,72%	97,37%	48,5

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
160	56,90%	97,37%	48,8
159	56,99%	97,37%	49,0
158	57,08%	97,37%	49,2
157	57,17%	97,37%	49,4
156	57,35%	97,37%	49,7
154	57,44%	97,37%	49,9
153	57,61%	97,37%	50,3
150	57,70%	97,37%	50,5
149	57,79%	97,37%	50,7
148	57,88%	97,37%	50,8
145	58,15%	97,37%	51,4
144	58,24%	97,37%	51,6
143	58,68%	97,37%	52,5
142	58,86%	97,37%	52,9
141	58,95%	97,37%	53,1
140	59,04%	97,37%	53,3
139	59,31%	97,37%	53,9
137	59,39%	97,37%	54,1
136	59,48%	97,37%	54,3
135	59,75%	97,37%	54,9
134	59,84%	97,37%	55,1
133	60,20%	97,37%	56,0
130	60,55%	97,37%	56,8
128	60,64%	97,37%	57,0
126	60,82%	97,37%	57,4
125	60,91%	97,37%	57,6
123	61,00%	97,37%	57,9
122	61,44%	97,37%	59,0
121	61,62%	97,37%	59,4
119	61,71%	97,37%	59,6
118	61,80%	97,37%	59,9

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
117	61,89%	97,37%	60,1
116	62,15%	97,37%	60,8
115	62,33%	97,37%	61,2
114	62,60%	97,37%	61,9
111	62,96%	97,37%	62,9
109	63,05%	97,37%	63,1
107	63,13%	97,37%	63,4
106	63,22%	97,37%	63,6
105	63,40%	97,37%	64,1
104	63,58%	97,37%	64,6
102	63,67%	97,37%	64,8
101	63,85%	97,37%	65,3
100	64,20%	97,37%	66,4
99	64,56%	97,37%	67,4
98	64,83%	97,37%	68,2
97	65,00%	97,37%	68,7
96	65,18%	97,37%	69,3
95	65,45%	97,37%	70,1
94	65,54%	97,37%	70,4
93	65,63%	97,37%	70,6
92	65,72%	97,37%	70,9
91	65,81%	97,37%	71,2
90	65,89%	97,37%	71,5
88	66,61%	97,37%	73,8
87	67,14%	97,37%	75,6
86	67,23%	97,37%	75,9
85	67,32%	97,37%	76,2
84	67,50%	97,37%	76,8
83	67,68%	97,37%	77,5
82	68,03%	97,37%	78,7
81	68,21%	97,37%	79,4

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
80	68,39%	97,37%	80,0
79	68,74%	97,37%	81,4
78	68,83%	97,37%	81,7
77	69,10%	97,37%	82,7
76	69,19%	97,37%	83,1
75	69,46%	97,37%	84,1
74	69,72%	97,37%	85,2
73	69,81%	97,37%	85,6
72	70,17%	97,37%	87,0
70	70,35%	97,37%	87,8
69	70,61%	97,37%	88,9
68	70,70%	97,37%	89,3
67	70,70%	94,74%	43,4
66	70,97%	94,74%	44,0
65	71,50%	94,74%	45,2
64	71,86%	94,74%	46,0
63	72,04%	94,74%	46,4
62	72,13%	94,74%	46,6
61	72,40%	94,74%	47,2
60	72,66%	94,74%	47,8
59	72,75%	94,74%	48,1
58	72,84%	94,74%	48,3
57	73,02%	94,74%	48,7
56	73,29%	94,74%	49,4
55	73,46%	94,74%	49,8
54	73,73%	94,74%	50,5
52	74,00%	94,74%	51,2
51	74,09%	94,74%	51,5
50	74,62%	94,74%	52,9
49	74,89%	94,74%	53,7
48	75,24%	94,74%	54,7

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
47	75,51%	94,74%	55,5
46	75,60%	92,11%	36,1
45	75,69%	92,11%	36,3
44	75,96%	92,11%	36,9
43	76,67%	92,11%	38,3
42	76,85%	92,11%	38,7
12	90,83%	42,11%	7,2
11	92,34%	36,84%	7,0

Tabela 24

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
289	30,01%	92,11%	5,0
288	30,45%	92,11%	5,1
287	30,54%	92,11%	5,1
286	30,63%	92,11%	5,2
285	30,81%	92,11%	5,2
284	30,99%	92,11%	5,2
283	31,08%	92,11%	5,3
282	31,26%	92,11%	5,3
280	31,52%	92,11%	5,4
278	31,70%	92,11%	5,4
277	31,97%	92,11%	5,5
276	32,24%	92,11%	5,5
275	32,32%	92,11%	5,6
273	32,50%	92,11%	5,6
271	32,68%	92,11%	5,7
269	32,77%	92,11%	5,7
268	32,86%	92,11%	5,7
267	32,95%	92,11%	5,7
266	33,21%	92,11%	5,8
265	33,57%	92,11%	5,9

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
264	33,84%	92,11%	6,0
262	34,02%	92,11%	6,0
261	34,28%	92,11%	6,1
257	34,55%	92,11%	6,2
256	34,73%	92,11%	6,2
255	34,82%	92,11%	6,2
254	34,91%	92,11%	6,3
252	35,08%	92,11%	6,3
251	35,17%	92,11%	6,3
249	35,26%	92,11%	6,4
248	35,53%	92,11%	6,4
247	35,80%	92,11%	6,5

Exemplo 9

Razões de Chances calculadas com base nos níveis de GFAP e UCH-L1 em pacientes com suspeita de ter uma LCT leve vs. controles saudáveis

[0499]Realizou-se uma análise para calcular as razões de chances de que um paciente tenha sofrido uma LCT leve com base nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras obtidas de pacientes determinados como tendo uma LCT leve cerca de 25 horas após a lesão em comparação a pacientes controle saudáveis com base no estudo TRACK-LCT descrito no Exemplo 2. A Tabela 25 traz um resumo da razão de chances para vários níveis de corte ou referência de GFAP junto com a sensibilidade e especificidade do ensaio. A Tabela 26 traz um resumo da razão de chances para vários níveis de corte ou referência de UCH-L1 junto com a sensibilidade e especificidade do ensaio.

Tabela 25

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
27	81,66%	94,12%	71,2
26	82,19%	94,12%	73,8
25	82,72%	94,12%	76,6

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
24	83,26%	94,12%	79,6
23	83,79%	94,12%	82,7
22	84,24%	94,12%	85,5
21	84,68%	94,12%	88,5
20	85,49%	94,12%	94,2
19	86,02%	94,12%	98,4
12	90,83%	52,94%	11,1
11	92,34%	47,06%	10,7
10	93,77%	47,06%	13,4
9	95,01%	35,29%	10,4

Tabela 26

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
106	70,79%	94,12%	38,8
105	71,15%	94,12%	39,5
104	71,33%	94,12%	39,8
103	71,59%	94,12%	40,3
102	71,95%	94,12%	41,0
101	72,22%	94,12%	41,6
100	72,66%	94,12%	42,5
99	73,02%	94,12%	43,3
98	73,46%	94,12%	44,3
97	73,73%	94,12%	44,9
96	74,18%	94,12%	46,0
95	74,35%	94,12%	46,4
94	74,98%	94,12%	47,9
53	90,12%	47,06%	8,1
52	90,38%	47,06%	8,4
51	91,01%	47,06%	9,0
50	91,27%	47,06%	9,3
49	91,54%	47,06%	9,6

Corte	Sensibilidade	Especificidade	razão de chances
48	91,81%	41,18%	7,8
47	92,16%	41,18%	8,2
46	92,43%	41,18%	8,5
45	93,05%	41,18%	9,4
44	93,50%	41,18%	10,1
43	94,03%	41,18%	11,0
42	94,30%	35,29%	9,0
41	94,57%	35,29%	9,5
40	94,92%	35,29%	10,2

[0500] Deve-se ter em mente que a descrição detalhada e exemplos concomitantes acima são meramente ilustrativos e não devem ser tidos como limitações ao âmbito da revelação, que é definido exclusivamente pelas reivindicações anexas e seus equivalentes.

[0501] Várias mudanças e modificações às modalidades reveladas transparecerão aos versados na técnica. Essas mudanças e modificações, incluindo, entre outras, as relacionadas a estruturas químicas, substituintes, derivados, intermediários, sínteses, composições, fórmulas ou métodos de uso da revelação, podem ser feitas sem divergir do âmbito nem essência da invenção.

[0502] Para fins de abrangência completa, vários aspectos da revelação são dados nas cláusulas numeradas a seguir:

[0503] Cláusula 1. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP, ou quando o nível de

UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente que não sofreu uma LCT leve quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e quando o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e uma LCT leve de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem uma LCT leve, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 200 pg/mL ou 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 90 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL ou cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0504]Cláusula 2. Método, de acordo com a cláusula 1, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0505]Cláusula 3. Método, de acordo com a cláusula 2, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0506]Cláusula 4. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 3, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0507]Cláusula 5. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 4, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 são: (a) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%; (b) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 97% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%; (c) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca

de 30% e cerca de 100%; (d) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 35%; (e) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (f) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 90%; (g) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 100%; (h) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 81% e uma especificidade de ao menos cerca de 94%; (i) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 82%; (j) determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[0508]Cláusula 6. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 5, em que a amostra é (a) coletada dentro de 0 a 4 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (b) coletada dentro de 4 a 8 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; (c) coletada entre cerca de 8 horas a 12 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; (d) coletada entre cerca de 12 horas a 16 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; (e) coletada entre cerca de 16 horas a 20 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao

menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%; ou (f) coletada entre cerca de 20 horas a 24 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 71% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%.

[0509]Cláusula 7. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 6, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 40 pg/mL, ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL.

[0510]Cláusula 8. Método, de acordo com a cláusula 7, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 5 pg/mL, de cerca de 8 pg/mL, ou de cerca de 10 pg/mL.

[0511]Cláusula 9. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 8, em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 90 pg/mL e cerca de 150 pg/mL, entre cerca de 90 pg/mL e cerca de 110 pg/mL, entre cerca de 95 pg/mL e cerca de 110 pg/mL, entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 320 pg/mL, ou entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 250 pg/mL.

[0512]Cláusula 10. Método, de acordo com a cláusula 9, em que o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 95 pg/mL, de cerca de 100 pg/mL, ou de cerca de 106 pg/mL.

[0513]Cláusula 11. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 10, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, são medidos ou detectados usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0514]Cláusula 12. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 10, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos ou detectados usando um ensaio de detecção de molécula única.

[0515]Cláusula 13. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 12, em que medir o nível de GFAP compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP.

[0516]Cláusula 14. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 13, em que medir o nível de UCH-L1 compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0517]Cláusula 15. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 14, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0518]Cláusula 16. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 15, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0519]Cláusula 17. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 16, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

[0520]Cláusula 18. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 17, em que o referido método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, valores de laboratório do paciente, classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave e tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão ortopédica.

[0521]Cláusula 19. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 14, compreendendo ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT leve com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0522]Cláusula 20. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 19, compreendendo ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT leve.

[0523]Cláusula 21. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, e em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 25 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0524]Cláusula 22. Método, de acordo com a cláusula 21, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0525]Cláusula 23. Método, de acordo com a cláusula 22, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0526]Cláusula 24. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 23, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0527]Cláusula 25. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica tem uma suspeita de lesão na cabeça e necessita de avaliação médica adicional, o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e (a) determinar que o paciente necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não necessita de avaliação médica adicional quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, e em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 25 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0528]Cláusula 26. Método, de acordo com a cláusula 25, em que a avaliação médica adicional compreende varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça, IRM e avaliação da Escala de Coma de Glasgow.

[0529]Cláusula 27. Método, de acordo com a cláusula 26, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base na varredura por TC, IRM ou avaliação da Escala de Coma de Glasgow.

[0530]Cláusula 28. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 27, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 são: (a) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca

de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%; (b) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% e ao menos 95% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e ao menos 95%; (c) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (d) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 90% e uma especificidade de ao menos cerca de 50%; ou (e) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 90% e uma especificidade de ao menos cerca de 80%.

[0531]Cláusula 29. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 28, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL; o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 380 pg/mL; o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 45 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL; o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 45 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 380 pg/mL; ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 45 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 220 pg/mL e cerca de 380 pg/mL.

[0532]Cláusula 30. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 29, em que: (a) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL;

(b) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL; (c) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL, o nível de

referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL; (d) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL; ou (e) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL.

[0533]Cláusula 31. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 30, em que a amostra é coletada dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 1 pg/mL e cerca de 400 pg/mL, e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 25 pg/mL e cerca de 700 pg/mL.

[0534]Cláusula 32. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 31, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, são medidos ou detectados usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0535]Cláusula 33. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 31, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos ou detectados usando um ensaio de detecção de molécula única.

[0536]Cláusula 34. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 33, em que medir o nível de GFAP compreende: (a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e (2) um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP se forme; e (b) medir a quantidade ou concentração de GFAP na

amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP.

[0537]Cláusula 35. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 34, em que medir o nível de UCH-L1 compreende: (a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e (2) um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e (b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0538]Cláusula 36. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 35, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0539]Cláusula 37. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 36, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0540]Cláusula 38. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 37, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

[0541]Cláusula 39. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 38, em que o referido método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, valores de laboratório do paciente, classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave e tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão ortopédica.

[0542]Cláusula 40. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 39, compreendendo ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0543]Cláusula 41. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 20 a 40, compreendendo ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT.

[0544]Cláusula 42. Método para ajudar no diagnóstico ou na avaliação de um paciente humano que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas após uma suspeita de lesão na cabeça para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra, em que a amostra é uma amostra biológica; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP, ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP, ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada e grave ou o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve, em que

o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, ou em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0545]Cláusula 43. Método, de acordo com a cláusula 42, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0546]Cláusula 44. Método, de acordo com a cláusula 43, em que suspeita-se de que o paciente tenha LCT moderada a grave com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0547]Cláusula 45. Método, de acordo com a cláusula 43, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0548]Cláusula 46. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 45, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 3 a 12.

[0549]Cláusula 47. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 45, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0550]Cláusula 48. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 47, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 são: (a) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%; ou (b) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 40%.

[0551]Cláusula 49. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 48, em que os níveis de GFAP ou UCH-L1 são medidos ou detectados usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0552]Cláusula 50. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 49, em que medir o nível de GFAP compreende: (a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e (2) um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP se forme; e (b) medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP.

[0553]Cláusula 51. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 50, em que medir o nível de UCH-L1 compreende: (a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e (2) um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e (b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0554]Cláusula 52. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 51, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra

de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0555]Cláusula 53. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 52, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão na cabeça causada por tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa que resulte em um traumatismo de cabeça fechado ou aberto, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0556]Cláusula 54. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 52, em que a amostra é obtida após o paciente ingerir ou ser exposto a um produto químico, toxina ou uma combinação de um produto químico e toxina.

[0557]Cláusula 55. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 52, em que a amostra é obtida de um paciente que sofre de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, hipoxia, vírus, meningite, hidrocefalia ou combinações desses.

[0558]Cláusula 56. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 55, em que o referido método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, pelos valores de laboratório do paciente, pela classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave, pela exibição por parte do paciente de níveis baixos ou altos de UCH-L1 e pelo tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão na cabeça.

[0559]Cláusula 57. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 56, compreendendo ainda tratar o paciente com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0560]Cláusula 58. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 42 a 56, compreendendo ainda monitorar o paciente.

[0561]Cláusula 59. Método para ajudar no diagnóstico ou na avaliação de um paciente humano que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas após a suspeita de lesão na cabeça para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP, ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT leve quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP, ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com uma LCT leve, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0562]Cláusula 60. Método, de acordo com a cláusula 59, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0563]Cláusula 61. Método, de acordo com a cláusula 60, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0564]Cláusula 62. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 61, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0565]Cláusula 63. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 62, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1

são: (a) determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%; ou (b) determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 90% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[0566]Cláusula 64. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 63, em que os níveis de GFAP ou UCH-L1 são medidos ou detectados usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0567]Cláusula 65. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 64, em que medir o nível de GFAP compreende: (a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e (2) um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP se forme; e (b) medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-anticorpo de detecção de GFAP.

[0568]Cláusula 66. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 65, em que medir o nível de UCH-L1 compreende: (a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com: (1) um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e (2) um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-anticorpo de

detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e (b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0569]Cláusula 67. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 66, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0570]Cláusula 68. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 67, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão na cabeça causada por tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa que resulte em um traumatismo de cabeça fechado ou aberto, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0571]Cláusula 69. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 67, em que a amostra é obtida após o paciente ingerir ou ser exposto a um produto químico, toxina ou uma combinação de um produto químico e toxina.

[0572]Cláusula 70. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 67, em que a amostra é obtida de um paciente que sofre de uma doença autoimune, transtorno metabólico, tumor cerebral, hipoxia, vírus, meningite, hidrocefalia ou combinações desses.

[0573]Cláusula 71. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 70, em que o referido método pode ser realizado em qualquer paciente sem considerar fatores selecionados dentre o grupo composto pela condição clínica do paciente, pelos valores de laboratório do paciente, pela classificação do paciente como sofrendo de lesão cerebral traumática leve, moderada ou grave, pela exibição

por parte do paciente de níveis baixos ou altos de UCH-L1 e pelo tempo desde qualquer evento em que o referido paciente pode ter sofrido uma lesão na cabeça.

[0574]Cláusula 72. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 71, compreendendo ainda tratar o paciente com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0575]Cláusula 73. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 59 a 71, compreendendo ainda monitorar o paciente.

[0576]Cláusula 74. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e/ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e (a) determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP, e/ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP, e/ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP e/ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT.

[0577]Cláusula 75. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, o método compreendendo: realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de

hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e (a) determinar que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou (b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP, e o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT.

[0578]Cláusula 76. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, ou quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL; ou

determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, e quando o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 550 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e uma LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT.

[0579]Cláusula 77. Método, de acordo com a cláusula 76, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0580]Cláusula 78. Método, de acordo com a cláusula 77, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0581]Cláusula 79. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 78, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0582]Cláusula 80. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 79, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 são:

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 97% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 35% e cerca de 100%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 80% e cerca de 90% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 70%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 90%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 100%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%;

determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 80% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; ou

determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[0583]Cláusula 81. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 80, em que a amostra é (a) coletada entre cerca de 0 a 4 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 85% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%; (b) coletada entre cerca de 4 a 8 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (c) coletada entre cerca de 8 horas a 12 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (d) coletada entre cerca de 12 horas a 16 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; (e) coletada entre cerca de 16 horas a 20 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%; ou (f)

coletada entre cerca de 20 horas a 24 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência é determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 35%.

[0584]Cláusula 82. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 81, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 40 pg/mL, ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL.

[0585]Cláusula 83. Método, de acordo com a cláusula 82, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 5 pg/mL, de cerca de 10 pg/mL, ou de cerca de 11 pg/mL.

[0586]Cláusula 84. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 83, em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL, entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 280 pg/mL, entre cerca de 105 pg/mL e cerca de 116 pg/mL, entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 520 pg/mL, ou entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 365 pg/mL.

[0587]Cláusula 85. Método, de acordo com a cláusula 84, em que o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 105 pg/mL, de cerca de 106 pg/mL, ou de cerca de 225 pg/mL.

[0588]Cláusula 86. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 79, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, ou o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL.

[0589]Cláusula 87. Método, de acordo com a cláusulas 86, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 são:

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 97% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 95%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 85% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

determinado por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 85% e cerca de 90% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 35%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 30% e uma especificidade de ao menos cerca de 92%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 90%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 100%;

determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 81% e uma especificidade de ao menos cerca de 94%;

determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 82%; ou

determinado por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%.

[0590]Cláusula 88. Método, de acordo com a cláusula 86 ou 87, em que o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL, ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL.

[0591]Cláusula 89. Método, de acordo com a cláusula 88, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 10 pg/mL, de cerca de 45 pg/mL, ou de cerca de 72 pg/mL.

[0592]Cláusula 90. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 86 a 89, em que o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 290 pg/mL, entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 270 pg/mL, ou entre cerca de 270 pg/mL e cerca de 290 pg/mL.

[0593]Cláusula 91. Método, de acordo com a cláusula 90, em que o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 247 pg/mL, de cerca de 269 pg/mL, ou de cerca de 289 pg/mL.

[0594]Cláusula 92. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 91, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos ou detectados usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0595]Cláusula 93. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 91, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos ou detectados usando um ensaio de detecção de molécula única.

[0596]Cláusula 94. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 93, em que medir o nível de GFAP na amostra compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

[0597]Cláusula 95. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 93, em que medir o nível de UCH-L1 na amostra compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0598]Cláusula 96. Método, de acordo com a cláusula 95, em que o método compreende ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[0599]Cláusula 97. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 96, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0600]Cláusula 98. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 97, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0601]Cláusula 99. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 98, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

[0602]Cláusula 100. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 99, compreendendo ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0603]Cláusula 101. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 100, compreendendo ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT.

[0604]Cláusula 102. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL; ou

determinar que o paciente não sofreu uma LCT quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 entre 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT e distinguem pacientes com uma lesão ortopédica e uma LCT de pacientes com uma lesão ortopédica mas sem LCT.

[0605]Cláusula 103. Método, de acordo com a cláusula 102, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0606]Cláusula 104. Método, de acordo com a cláusula 103, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0607]Cláusula 105. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 104, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0608]Cláusula 106. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 104, em que o método determina que o paciente necessita de avaliação médica adicional para a suspeita de lesão na cabeça quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior ao nível de referência de GFAP e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior ao nível de referência de UCH-L1; ou determinar que o paciente não necessita de avaliação médica adicional quando o nível de GFAP na amostra for inferior ao nível de referência de GFAP, e/ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior ao nível de referência de UCH-L1.

[0609]Cláusula 107. Método, de acordo com a cláusula 106, em que a avaliação médica adicional compreende varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça e avaliação da Escala de Coma de Glasgow.

[0610]Cláusula 108. Método, de acordo com a cláusula 107, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma lesão cerebral traumática com base na varredura por TC ou avaliação da Escala de Coma de Glasgow.

[0611]Cláusula 109. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 108, em que o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 são:

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e cerca de 100% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e cerca de 100%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade entre ao menos cerca de 70% e ao menos cerca de 95% e uma especificidade entre ao menos cerca de 30% e ao menos cerca de 98%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 70% e uma especificidade de ao menos cerca de 30%;

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 90% e uma especificidade de ao menos cerca de 50%; ou

determinados por um ensaio com uma sensibilidade de ao menos cerca de 95% e uma especificidade de ao menos cerca de 98%.

[0612]Cláusula 110. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 109, em que:

coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 20 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 230 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 195 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 275 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca

de 165 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 1.230 pg/mL; ou

coleta-se a amostra dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 315 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0613]Cláusula 111. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 110, em que:

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL;

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL;

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL;

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL; ou

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL.

[0614]Cláusula 112. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 111, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos ou detectados usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0615]Cláusula 113. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 111, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos ou detectados usando um ensaio de detecção de molécula única.

[0616]Cláusula 114. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 113, em que medir o nível de GFAP na amostra compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

[0617]Cláusula 115. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 113, em que medir o nível de UCH-L1 na amostra compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0618]Cláusula 116. Método, de acordo com a cláusula 115, em que o método compreende ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[0619]Cláusula 117. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 116, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma

amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0620]Cláusula 118. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 117, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0621]Cláusula 119. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 118, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

[0622]Cláusula 120. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 119, compreendendo ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0623]Cláusula 121. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 102 a 120, compreendendo ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT.

[0624]Cláusula 122. Método para ajudar na determinação ou a determinar se deve-se realizar uma varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça em um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e pode ter sofrido uma lesão na cabeça, o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida do paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir ou detectar o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL ou

o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL; ou

determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, não necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 40 pg/mL a cerca de 130 pg/mL ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 70 pg/mL a cerca de 145 pg/mL.

[0625]Cláusula 123. Método, de acordo com a cláusula 122, em que o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois da realização do ensaio, e pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT com base no resultado da varredura por TC.

[0626]Cláusula 124. Método, de acordo com a cláusula 123, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um resultado de varredura por TC negativo.

[0627]Cláusula 125. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 122 a 124, em que a amostra é obtida do paciente dentro de cerca de 4 horas a cerca de 16 horas após a lesão real ou suspeita de lesão.

[0628]Cláusula 126. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 122 a 125, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 255 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 95% e uma especificidade igual ou superior a 77%.

[0629]Cláusula 127. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 122 a 125, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 264 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 77%.

[0630]Cláusula 128. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 122 a 125, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 125 pg/mL e em

que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 45%.

[0631]Cláusula 129. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 122 a 125, em que o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 745 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 66% e uma especificidade igual ou superior a 95%.

[0632]Cláusula 130. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 122 a 125, em que o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 102 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 39%.

[0633]Cláusula 131. Método para ajudar a diagnosticar se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça tem uma lesão cerebral traumática (LCT) moderada a grave, o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão real ou suspeita de lesão para medir ou detectar uma combinação do nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL; ou

determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL ou o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL.

[0634]Cláusula 132. Método, de acordo com a cláusula 131, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow (GCS) antes ou depois da realização do ensaio, e pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT moderada a grave com base no escore GCS.

[0635]Cláusula 133. Método, de acordo com a cláusula 131, em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada a grave com base em um escore GCS inferior ou igual a 12.

[0636]Cláusula 134. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 131 a 133, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 850 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 95% e uma especificidade igual ou superior a 86%.

[0637]Cláusula 135. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 131 a 133, em que o nível de referência de GFAP é de cerca de 881 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 87%.

[0638]Cláusula 136. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 131 a 133, em que o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 276 pg/mL e em que o ensaio tem uma sensibilidade igual ou superior a 90% e uma especificidade igual ou superior a 66%.

[0639]Cláusula 137. Método, de acordo com a cláusula 131, em que o nível de referência para determinar se um paciente sofreu uma LCT moderada a grave é:

de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.500 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 205 pg/mL a cerca de 2.360 pg/mL para GFAP e de cerca de 215 pg/mL a cerca de 880 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 2.000 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.900 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.800 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.700 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.600 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e o nível de referência de UCH-L1 é de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.500 pg/mL;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.400 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.300 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.200 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 210 pg/mL a cerca de 1.000 pg/mL para GFAP e de cerca de 1.000 pg/mL a cerca de 1.100 pg/mL para UCH-L1.

[0640]Cláusula 138. Método, de acordo com a cláusula 131, em que o nível de referência para determinar que um paciente não sofreu uma LCT moderada a grave é:

de cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 100 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 110 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 110 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 125 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 125 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 130 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 130 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 140 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 150 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 160 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 170 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 145 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 180 pg/mL a cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 145 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 200 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 170 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 160 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 165 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 155 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 150 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 190 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 200 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 195 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 190 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1;

de cerca de 185 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1; ou

de cerca de 180 pg/mL para GFAP e/ou de cerca de 180 pg/mL para UCH-L1.

[0641]Cláusula 139. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 138, em que a amostra é uma amostra de sangue total.

[0642]Cláusula 140. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 138, em que a amostra é uma amostra de soro.

[0643]Cláusula 141. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 138, em que a amostra é uma amostra de plasma.

[0644]Cláusula 142. Método, de acordo com as cláusulas de 139 a 141, em que o ensaio é um imunoensaio.

[0645]Cláusula 143. Método, de acordo com as cláusulas de 139 a 141, em que o ensaio é um químico clínico.

[0646]Cláusula 144. Método, de acordo com as cláusulas de 139 a 141, em que o ensaio é um ensaio de detecção de molécula única.

[0647]Cláusula 145. *Kit* compreendendo ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método de acordo com qualquer uma das cláusulas de 76 a 144, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

[0648]Cláusula 146. Método para ajudar no diagnóstico ou a determinar se um paciente humano que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça possui uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo:

realizar um ensaio dentro de cerca de 24 horas após uma lesão real ou suspeita de lesão sobre uma amostra obtida do paciente para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra;

determinar que o paciente provavelmente tem uma LCT quando:

o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP (i) de cerca de 136 pg/ml a cerca de 181 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 84 a cerca de 99,5, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 64,0%; ou (ii) de cerca de 67 pg/ml a cerca de 135 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 100 a cerca de 160, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,0% e cerca de 75,0%; ou

o nível de UCH-L1 na amostra for superior a um nível de referência de UCH-L1 (i) de cerca de 307 pg/ml a cerca de 345 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 24 a cerca de 28, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 30% e cerca de 35%; ou (ii) de cerca de 247 pg/ml a cerca de 301 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT for de cerca de 9 a cerca de 13,

em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 35% e cerca de 43%.

[0649]Cláusula 147. Método, de acordo com a cláusula 146, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP:

de cerca de 170 pg/ml a cerca de 180 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 85 a cerca de 87,5, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 61,8%;

de cerca de 160 pg/ml a cerca de 169 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 87,7 a cerca de 90,2, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%;

de cerca de 150 pg/ml a cerca de 159 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 90 a cerca de 92, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%;

de cerca de 140 pg/ml a cerca de 149 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 93 a cerca de 98, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 63,3% e cerca de 64,0%; ou

de cerca de 105 pg/ml a cerca de 125 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 104 a cerca de 115, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,9% e cerca de 68,2%.

[0650]Cláusula 148. Método, de acordo com a cláusula 146 ou cláusula 147, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1:

de cerca de 326 pg/ml a cerca de 345 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 24 a cerca de 26, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 31,0% e cerca de 32,5%;

de cerca de 290 pg/ml a cerca de 300 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 9,4 a cerca de 10,1, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 35,2% e cerca de 36,7%; ou

de cerca de 248 pg/ml a cerca de 262 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT é de cerca de 12,0 a cerca de 12,6, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 41,0% e cerca de 42,0%.

[0651]Cláusula 149. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 24 horas após a lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve quando:

o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP
(i) de cerca de 68 pg/ml a cerca de 181 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 45 a cerca de 90, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 50% e cerca de 71%; ou (ii) de cerca de 47 pg/ml a cerca de 67 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 43 a cerca

de 56, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 71% e cerca de 76%; ou

o nível de UCH-L1 na amostra for superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/ml a cerca de 289 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 5 a cerca de 7, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade entre cerca de 30% e cerca de 36%,

em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um paciente com LCT leve.

[0652]Cláusula 150. Método, de acordo com a cláusula 149, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP:

de cerca de 160 pg/ml a cerca de 175 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 46,0 a cerca de 49,0, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 55,6% e cerca de 57,0%;

de cerca de 130 pg/ml a cerca de 150 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 50,5 a cerca de 56,8, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 57,7% e cerca de 60,5%; ou

de cerca de 50 pg/ml a cerca de 60 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 47,8 a cerca de 52,9, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 72,7% e cerca de 74,6%;

[0653]Cláusula 151. Método, de acordo com a cláusula 149 ou cláusula 150, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1:

de cerca de 265 pg/ml a cerca de 285 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 5,1 a cerca de 5,8, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade entre cerca de 30,4% e cerca de 33,2%; ou

de cerca de 249 pg/ml a cerca de 256 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 6,2 a cerca de 6,4, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade entre cerca de 34,7% e cerca de 35,2%;

[0654]Cláusula 152. Método para ajudar no diagnóstico ou a determinar se um paciente humano que sofreu uma lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, o método compreendendo:

realizar um ensaio dentro de cerca de 24 horas após uma lesão real ou suspeita de lesão sobre uma amostra obtida do paciente para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra;

determinar que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando:

o nível de GFAP na amostra for superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 19 pg/ml a cerca de 27 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 71 a cerca de 99, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 81% e cerca de 86%; ou

o nível de UCH-L1 na amostra for superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 94 pg/ml a cerca de 106 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve for de cerca de 38 a cerca de 48, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 70% e cerca de 75%.

[0655]Cláusula 153. Método, de acordo com a cláusula 152, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 20 pg/ml a cerca de 25 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 76,6 a cerca de 94,2, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 82,7% e cerca de 85,5%.

[0656]Cláusula 154. Método, de acordo com a cláusula 152 ou cláusula 153, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 95 pg/ml a cerca de 105 pg/mL e a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve é de cerca de 76,6 a cerca de 46,4, em que o ensaio tem uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 71,0% e cerca de 74,3%.

[0657]Cláusula 155. Método para ajudar no diagnóstico ou a determinar se um paciente humano que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça possui uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo:

realizar um ensaio dentro de cerca de 24 horas após uma lesão real ou suspeita de lesão sobre uma amostra obtida do paciente para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra;

determinar que o paciente provavelmente tem uma LCT quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para GFAP é (i) de cerca de 84 a cerca de 99,5 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 64,0%, em que o nível de GFAP é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 136 pg/mL a cerca de 181 pg/mL; ou (ii) de cerca de 100 a cerca de 160 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,5% e cerca

de 75,0%, em que o nível de GFAP é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 67 pg/mL a cerca de 135 pg/mL; ou

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para UCH-L1 é (i) de cerca de 24 a cerca de 28 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade de cerca de 30% a cerca de 35%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 307 pg/mL a cerca de 345 pg/mL; ou (ii) de cerca de 9 a cerca de 13 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 35% a cerca de 43%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/mL a cerca de 301 pg/mL.

[0658]Cláusula 156. Método, de acordo com a cláusula 155, em que é determinado que o paciente provavelmente tem uma LCT quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para GFAP é (i) de cerca de 85 a cerca de 87,5 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 61,8%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 170 pg/mL a cerca de 180 pg/mL;

(ii) de cerca de 87,7 a cerca de 90,2 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a cerca de 160 pg/mL a cerca de 169 pg/mL;

(iii) de cerca de 90 a cerca de 92 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 62,6% e cerca de 63,2%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a cerca de 150 pg/mL a cerca de 159 pg/mL;

(iv) de cerca de 93 a cerca de 98 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 63,3% e cerca de 64,0%, em que

o nível de GFAP na amostra é superior a cerca de 140 pg/mL a cerca de 149 pg/mL; ou

(v) de cerca de 104 a cerca de 115 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,9% e cerca de 68,2%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a cerca de 105 pg/mL a cerca de 125 pg/mL.

[0659]Cláusula 157. Método, de acordo com a cláusula 155 ou cláusula 156, em que é determinado que o paciente tem uma LCT quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para UCH-L1 é (i) de cerca de 24 a cerca de 26 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 31,0% e cerca de 32,5%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a cerca de 326 pg/mL a cerca de 345 pg/mL;

(ii) de cerca de 9,4 a cerca de 10,1 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 35,2% e cerca de 36,7%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a cerca de 290 pg/mL a cerca de 300 pg/mL; ou

(iii) de cerca de 12,0 a cerca de 12,6 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 41,0% e cerca de 42,0%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a cerca de 248 pg/mL a cerca de 262 pg/mL.

[0660]Cláusula 158. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 24 horas após a lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP é (i) de cerca de 45 a cerca de 90 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 50% e cerca de 71%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 68 pg/mL a cerca de 181 pg/mL; ou (ii) de cerca de 43 a cerca de 56 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 71% e cerca de 76%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 47 pg/mL a cerca de 67 pg/mL; ou

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 é (i) de cerca de 5 a cerca de 7 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade de cerca de 30% a cerca de 36%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/mL a cerca de 289 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP ou o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um paciente com LCT leve.

[0661]Cláusula 159. Método, de acordo com a cláusula 158, em que é determinado que o paciente tem uma LCT leve quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP é (i) de cerca de 46,0 a cerca de 49,0 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 55,6% e cerca de 57,0%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 160 pg/mL a cerca de 175 pg/mL;

ou (ii) de cerca de 50,5 a cerca de 56,8 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 97% e uma sensibilidade entre cerca de 57,7% e cerca

de 60,5%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 130 pg/mL a cerca de 150 pg/mL; ou

ou (ii) de cerca de 47,8 a cerca de 52,9 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 72,7% e cerca de 74,6%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 50 pg/mL a cerca de 60 pg/mL.

[0662]Cláusula 160. Método, de acordo com a cláusula 158 ou cláusula 159, em que é determinado que o paciente tem uma LCT leve quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 é (i) de cerca de 5,1 a cerca de 5,8 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade de cerca de 30,4% a cerca de 33,2%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 265 pg/mL a cerca de 285 pg/mL; ou

(ii) de cerca de 6,2 a cerca de 6,4 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 92% e uma sensibilidade de cerca de 34,7% a cerca de 35,2%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 249 pg/mL a cerca de 256 pg/mL.

[0663]Cláusula 161. Método para ajudar no diagnóstico ou a determinar se um paciente humano que sofreu uma lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, o método compreendendo:

realizar um ensaio dentro de cerca de 24 horas após uma lesão real ou suspeita de lesão sobre uma amostra obtida do paciente para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra;

determinar que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP é (i) de cerca de 71 a cerca de 99 em um ensaio com uma especificidade de

cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 81% e cerca de 86%, em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 19 pg/mL a cerca de 27 pg/mL; ou

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 é (i) de cerca de 38 a cerca de 48 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 70% a cerca de 75%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 94 pg/mL a cerca de 106 pg/mL.

[0664]Cláusula 162. Método, de acordo com a cláusula 161, em que é determinado que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para GFAP é de cerca de 76,6 a cerca de 94,2 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade entre cerca de 82,7% e cerca de 85,5%, e adicionalmente em que o nível de GFAP na amostra é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 20 pg/mL a cerca de 25 pg/mL.

[0665]Cláusula 163. Método, de acordo com a cláusula 161 ou cláusula 162, em que é determinado que o paciente provavelmente tem uma LCT leve quando:

a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT leve para UCH-L1 é de cerca de 39,5 a cerca de 46,4 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 71,0% a cerca de 74,3%, e adicionalmente em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 95 pg/mL a cerca de 105 pg/mL.

[0666]Cláusula 164. Método para ajudar na determinação ou a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida

fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e/ou

determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 associam-se a um paciente com uma LCT.

[0667]Cláusula 165. Método, de acordo com a cláusula 164, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

[0668]Cláusula 166. Método, de acordo com a cláusula 165, em que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

[0669]Cláusula 167. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 166, em que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

[0670]Cláusula 168. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 1 a 4, em que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP:

entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 40 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL;

entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL ou entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 45 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 60 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 300 pg/mL ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL;

entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL; ou

de cerca de 5 pg/mL, de cerca de 10 pg/mL, de cerca de 11 pg/mL; de cerca de 45 pg/mL ou de cerca de 72 pg/mL.

[0671]Cláusula 169. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 168, em que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1:

entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL;

entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL, entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 280 pg/mL, entre cerca de 105 pg/mL e cerca de 116 pg/mL, entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 520 pg/mL ou entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 365 pg/mL;

entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 950 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou entre cerca de 970 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 290 pg/mL, entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 270 pg/mL ou entre cerca de 270 pg/mL e cerca de 290 pg/mL; ou

de cerca de 105 pg/mL, de cerca de 106 pg/mL, de cerca de 225 pg/mL, de cerca de 247 pg/mL, de cerca de 269 pg/mL ou de cerca de 290 pg/mL.

[0672]Cláusula 170. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 169, em que:

o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL; ou

o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL.

[0673]Cláusula 171. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 167, em que:

coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 20 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 230 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca

de 195 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 275 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 165 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

coleta-se a amostra dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 200 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 1.230 pg/mL; ou

coleta-se a amostra dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 315 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

[0674]Cláusula 172. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 167 e 171, em que:

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL;

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL;

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL;

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL; ou

quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL.

[0675]Cláusula 173. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 172, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

[0676]Cláusula 174. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 172, em que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos usando um ensaio de detecção de molécula única.

[0677]Cláusula 175. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 172, em que medir o nível de GFAP na amostra compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um

anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

[0678]Cláusula 176. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 175, em que medir o nível de UCH-L1 na amostra compreende:

colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

[0679]Cláusula 177. Método, de acordo com a cláusula 176, em que o método compreende ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui

um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

[0680]Cláusula 178. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 177, em que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

[0681]Cláusula 179. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 177, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

[0682]Cláusula 180. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 177, em que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

[0683]Cláusula 181. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 177, compreendendo ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática.

[0684]Cláusula 182. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 177, compreendendo ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT.

[0685]Cláusula 183. Método para ajudar na determinação ou a determinar se deve-se realizar uma varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça em um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e também pode ter sofrido uma lesão na cabeça, o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para

medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e/ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL.

[0686]Cláusula 184. Método, de acordo com a cláusula 183, em que o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois da realização do ensaio, e pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT com base no resultado da varredura por TC.

[0687]Cláusula 185. Método, de acordo com a cláusula 184, em que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um resultado de varredura por TC negativo.

[0688]Cláusula 186. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 183 a 185, em que a amostra é obtida do paciente dentro de cerca de 4 horas a cerca de 16 horas após a lesão real ou suspeita de lesão.

[0689]Cláusula 187. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 183 a 186, em que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, entre cerca de 600 pg/mL e cerca de 1.000

pg/mL, entre cerca de 600 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, entre cerca de 700 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, ou entre cerca de 700 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL.

[0690]Cláusula 188. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 183 a 187, em que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 750 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de cerca de 500 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, de cerca de 500 pg/mL a cerca de 750 pg/mL, ou de cerca de 500 pg/mL a cerca de 700 pg/mL.

[0691]Cláusula 189. Método para ajudar no diagnóstico de se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) moderada a grave, o método compreendendo:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) ou uma combinação de GFAP e UCH-L1 na amostra; e

determinar que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL; ou

determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando (i) o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de cerca de 215 pg/mL.

[0692]Cláusula 190. Método, de acordo com a cláusula 189, em que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow (GCS) antes ou depois da realização do ensaio, e pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT moderada a grave com base no escore GCS.

[0693]Cláusula 191. Método, de acordo com as cláusulas 189 a 190, em que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada a grave com base em um escore GCS inferior ou igual a 12.

[0694]Cláusula 192. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 189 a 191, em que determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.300 pg/mL, ou de cerca de 1.500 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL.

[0695]Cláusula 193. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 189 a 192, em que determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de cerca de 220 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 950 pg/mL, de cerca de 970 pg/mL a cerca de 2.100 pg/mL, ou de cerca de 2.300 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL.

[0696]Cláusula 194. Método, de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 193, em que a amostra é (a) uma amostra de sangue total; (b) uma amostra de soro; ou (c) uma amostra de plasma.

[0697]Cláusula 195. Método, de acordo com as cláusulas 164 a 194, em que o ensaio é (a) um imunoensaio; (b) um ensaio químico clínico; ou (c) um ensaio de detecção de molécula única.

[0698]Cláusula 196. *Kit* compreendendo ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método de acordo com qualquer uma das cláusulas de 164 a 195, em que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para ajudar a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT), o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e/ou

determinar que o paciente também sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL,

em que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 associam-se a um paciente com uma LCT.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow antes ou depois da realização do ensaio.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT leve com base no escore na Escala de Coma de Glasgow.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de referência de GFAP, o nível de

referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e UCH-L1 correlacionam-se a um escore na Escala de Coma de Glasgow de 13 a 15.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP:

(a) entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 175 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 100 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 5 pg/mL e cerca de 40 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 60 pg/mL;

(b) entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL ou entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 45 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 60 pg/mL e cerca de 80 pg/mL, entre cerca de 30 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 50 pg/mL e cerca de 300 pg/mL ou entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL;

(c) entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 50 pg/mL ou entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 20 pg/mL; ou

(d) de cerca de 5 pg/mL, de cerca de 10 pg/mL, de cerca de 11 pg/mL; de cerca de 45 pg/mL ou de cerca de 72 pg/mL.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente sofreu uma lesão cerebral traumática quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1:

(a) entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL;

(b) entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 125 pg/mL, entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 280 pg/mL, entre cerca de 105 pg/mL e cerca de 116 pg/mL, entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 520 pg/mL ou entre cerca de 225 pg/mL e cerca de 365 pg/mL;

(b) entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 950 pg/mL, entre cerca de 400 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL, ou entre cerca de 970 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(c) entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 290 pg/mL, entre cerca de 250 pg/mL e cerca de 270 pg/mL ou entre cerca de 270 pg/mL e cerca de 290 pg/mL; ou

(d) de cerca de 105 pg/mL, de cerca de 106 pg/mL, de cerca de 225 pg/mL, de cerca de 247 pg/mL, de cerca de 269 pg/mL ou de cerca de 290 pg/mL.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que

(a) o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 300 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 100 pg/mL e cerca de 500 pg/mL; ou

(b) o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL ou o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 75 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 240 pg/mL e cerca de 300 pg/mL.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

(a) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão e o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 175 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(b) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 15 pg/mL e cerca de 20 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 230 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(c) coleta-se a amostra dentro de cerca de 0 horas a cerca de 4 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 195 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 120 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(d) coleta-se a amostra dentro de cerca de 4 horas a cerca de 8 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 275 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(e) coleta-se a amostra dentro de cerca de 8 horas a cerca de 12 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 165 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(f) coleta-se a amostra dentro de cerca de 12 horas a cerca de 16 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(g) coleta-se a amostra dentro de cerca de 16 horas a cerca de 20 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 170 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL;

(h) coleta-se a amostra dentro de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL

e cerca de 200 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 1.230 pg/mL; ou

(i) coleta-se a amostra dentro de cerca de 24 horas a cerca de 48 horas após a suspeita de lesão, o nível de referência de GFAP é entre cerca de 10 pg/mL e cerca de 315 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 é entre cerca de 110 pg/mL e cerca de 2.000 pg/mL.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4 e 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

(a) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 10 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 220 pg/mL;

(b) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 15 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 130 pg/mL;

(c) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 20 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 160 pg/mL;

(d) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 45 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 250 pg/mL; ou

(e) quando o nível de referência de GFAP é de ao menos cerca de 60 pg/mL, o nível de referência de UCH-L1 é de ao menos cerca de 270 pg/mL.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos usando um imunoensaio ou um ensaio químico clínico.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os níveis de GFAP, UCH-L1, ou uma combinação desses, na amostra são medidos usando um ensaio de detecção de molécula única.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que medir o nível de GFAP na amostra comprehende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de GFAP, que liga-se a um epítopo na GFAP ou fragmento de GFAP para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de GFAP que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na GFAP que não é ligado pelo ao menos um anticorpo de captura de GFAP para formar um complexo antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de GFAP na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de GFAP-antígeno GFAP-ao menos um anticorpo de detecção de GFAP.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que medir o nível de UCH-L1 na amostra comprehende:

(a) colocar a amostra em contato, ou simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem, com:

(1) ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1, que liga-se a um epítopo na UCH-L1 ou fragmento de UCH-L1 para formar um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1, e

(2) ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo ao menos

um anticorpo de captura de UCH-L1 para formar um complexo antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1, de tal modo que um complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1 se forme; e

(b) medir a quantidade ou concentração de UCH-L1 na amostra com base no sinal gerado pelo marcador detectável no complexo ao menos um anticorpo de captura de UCH-L1-antígeno UCH-L1-ao menos um anticorpo de detecção de UCH-L1.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** por compreender ainda ao menos um segundo anticorpo de detecção que inclui um marcador detectável e que liga-se a um epítopo na UCH-L1 que não é ligado pelo anticorpo de captura nem pelo primeiro anticorpo de detecção.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra é selecionada dentre o grupo composto por uma amostra de sangue total, uma amostra de soro, uma amostra do fluido cerebroespinhal e uma amostra de plasma.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão ortopédica causada por um acidente com veículo motorizado, tremores físicos, impacto contundente por uma força mecânica ou outra força externa, uma ou mais quedas, explosões ou detonações ou outros tipos de traumatismo por força contundente.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra é obtida após o paciente sofrer uma lesão esportiva ou uma fratura aguda.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, **CARACTERIZADO** por compreender ainda tratar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT com um tratamento para lesão cerebral traumática.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, **CARACTERIZADO** por compreender ainda monitorar o paciente determinado como tendo sofrido uma LCT.

20. Método para ajudar a determinar se deve-se realizar uma varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça em um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e também pode ter sofrido uma lesão na cabeça, o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e/ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra; e

determinar que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 140 pg/mL a cerca de 1.150 pg/mL e o nível de referência de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente recebe uma varredura por TC antes ou depois da realização do ensaio, e pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT com base no resultado da varredura por TC.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de UCH-L1 correlacionam-se a um resultado de varredura por TC negativo.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra é obtida do paciente dentro de cerca de 4 horas a cerca de 16 horas após a lesão real ou suspeita de lesão.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre cerca de 500 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, entre cerca de 600 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, entre cerca de 600 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL, entre cerca de 700 pg/mL e cerca de 1.000 pg/mL, ou entre cerca de 700 pg/mL e cerca de 1.150 pg/mL.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente, mais provavelmente do que não, necessita de uma varredura por TC quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de cerca de 400 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 800 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 750 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 700 pg/mL, de cerca de 500 pg/mL a cerca de 810 pg/mL, de cerca de 500 pg/mL a cerca de 750 pg/mL, ou de cerca de 500 pg/mL a cerca de 700 pg/mL.

26. Método para ajudar a diagnosticar se um paciente humano que sofreu uma lesão ortopédica e que também sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça sofreu uma lesão cerebral traumática (LCT) moderada a grave, o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender:

realizar um ensaio sobre uma amostra obtida de um paciente dentro de cerca de 48 horas após a lesão ortopédica real ou suspeita de lesão ortopédica para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) ou uma combinação de GFAP e UCH-L1 na amostra; e

(a) determinar que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando (i) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for igual ou superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for igual ou superior a um nível de referência de cerca de 215 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL; ou

(b) determinar que o paciente não sofreu uma LCT moderada a grave quando (i) o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL, (ii) o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 215 pg/mL, ou (iii) o nível de GFAP na amostra for inferior a um nível de referência de GFAP de cerca de 205 pg/mL e o nível de UCH-L1 na amostra for inferior a um nível de referência de cerca de 215 pg/mL.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente recebe um escore na Escala de Coma de Glasgow (GCS) antes ou depois da realização do ensaio, e pelo fato de que suspeita-se de que o paciente tenha uma LCT moderada a grave com base no escore GCS.

28. Método, de acordo com as reivindicações de 26 e 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de referência de GFAP, o nível de referência de UCH-L1 ou o nível de referência de GFAP e o nível de referência de

UCH-L1 correlacionam-se a pacientes com LCT moderada a grave com base em um escore GCS inferior ou igual a 12.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 26 a 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de GFAP na amostra for igual a um nível de referência de GFAP de cerca de 500 pg/mL a cerca de 1.300 pg/mL, ou de cerca de 1.500 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 26 a 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de que determina-se que o paciente sofreu uma LCT moderada a grave quando o nível de UCH-L1 na amostra for igual a um nível de referência de cerca de 220 pg/mL a cerca de 300 pg/mL, de cerca de 400 pg/mL a cerca de 950 pg/mL, de cerca de 970 pg/mL a cerca de 2.100 pg/mL, ou de cerca de 2.300 pg/mL a cerca de 3.000 pg/mL.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra é (a) uma amostra de sangue total; (b) uma amostra de soro; ou (c) uma amostra de plasma.

32. Método, de acordo com as reivindicações de 1 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ensaio é (a) um imunoensaio; (b) um ensaio químico clínico; ou (c) um ensaio de detecção de molécula única.

33. *Kit* compreendendo ao menos um calibrador ou composição controle para uso no método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 32, o *kit* sendo **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ao menos um calibrador ou composição controle é uma GFAP, fragmento de GFAP, UCH-L1, fragmento de UCH-L1, ou combinações desses.

34. Método para ajudar no diagnóstico ou a determinar se um paciente humano que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça possui uma lesão cerebral traumática (LCT), o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender:

realizar um ensaio dentro de cerca de 24 horas após uma lesão real ou suspeita de lesão sobre uma amostra obtida do paciente para medir o nível de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou o nível de hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1) na amostra;

determinar que o paciente provavelmente tem uma LCT quando:

(a) a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para GFAP é (i) de cerca de 84 a cerca de 99,5 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 61,0% e cerca de 64,0%, em que o nível de GFAP é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 136 pg/mL a cerca de 181 pg/mL; ou (ii) de cerca de 100 a cerca de 160 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade entre cerca de 65,5% e cerca de 75,0%, em que o nível de GFAP é superior a um nível de referência de GFAP de cerca de 67 pg/mL a cerca de 135 pg/mL; ou

(b) a razão de chances de que o paciente tenha sofrido uma LCT para UCH-L1 é (i) de cerca de 24 a cerca de 28 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 98% e uma sensibilidade de cerca de 30% a cerca de 35%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 307 pg/mL a cerca de 345 pg/mL; ou (ii) de cerca de 9 a cerca de 13 em um ensaio com uma especificidade de cerca de 94% e uma sensibilidade de cerca de 35% a cerca de 43%, em que o nível de UCH-L1 na amostra é superior a um nível de referência de UCH-L1 de cerca de 247 pg/mL a cerca de 301 pg/mL.

Análise Clínica TRACK-LCT
Análise ROC: Coorte
(todas as suspeitas de LCT vs. todos os controles)
Ensaio: GFAP

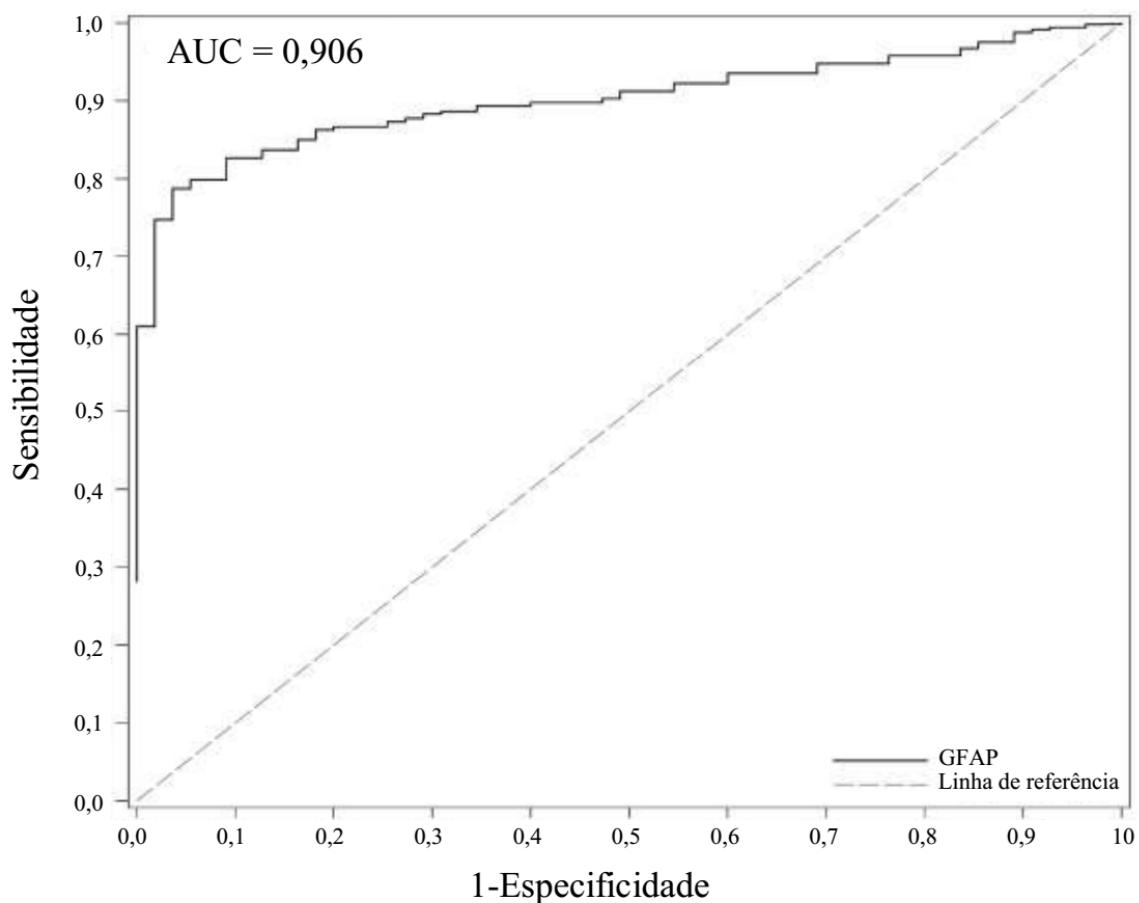


FIG. 1A

Análise Clínica TRACK-LCT
Análise ROC: Coorte
(todas as suspeitas de LCT vs. todos os controles)
Ensaio: UCHL1

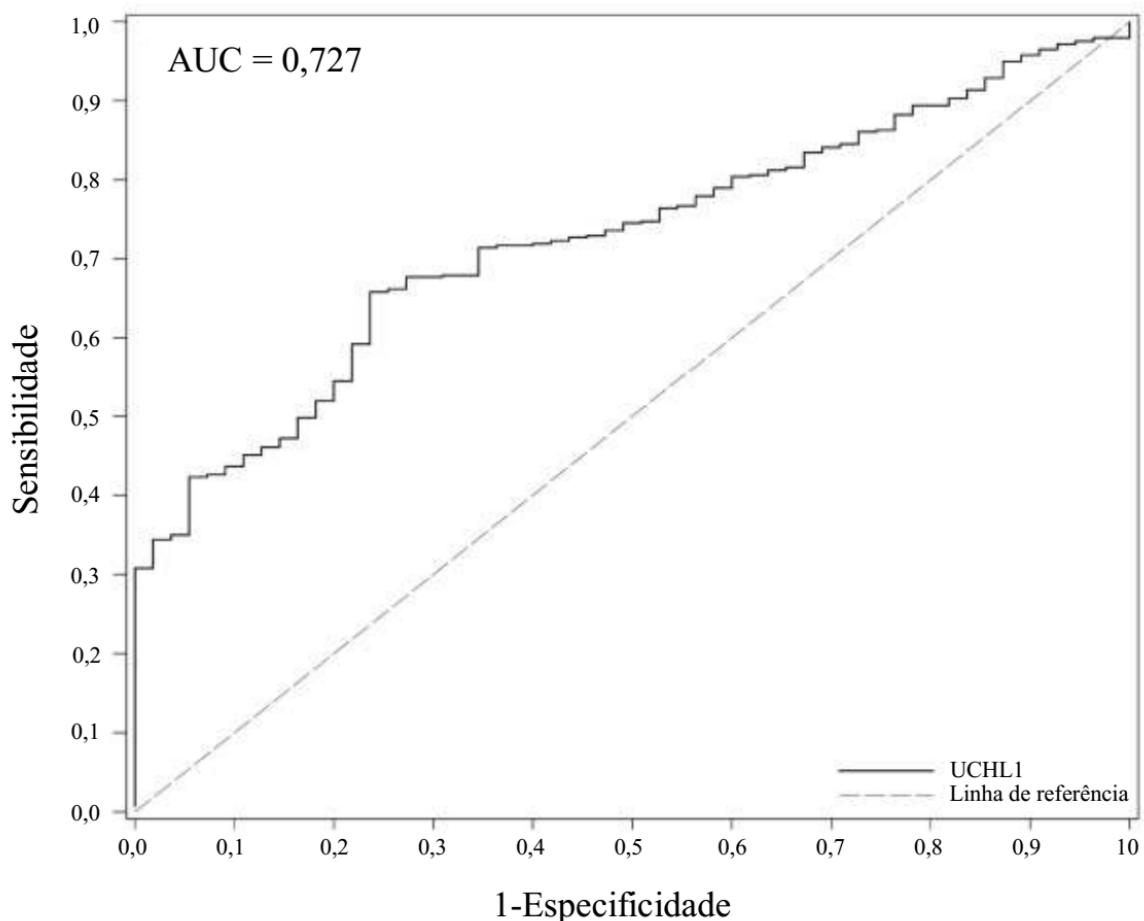


FIG. 1B

Análise Clínica TRACK-LCT
Análise ROC: LCT leve vs. controles ortopédicos
Ensaio: GFAP

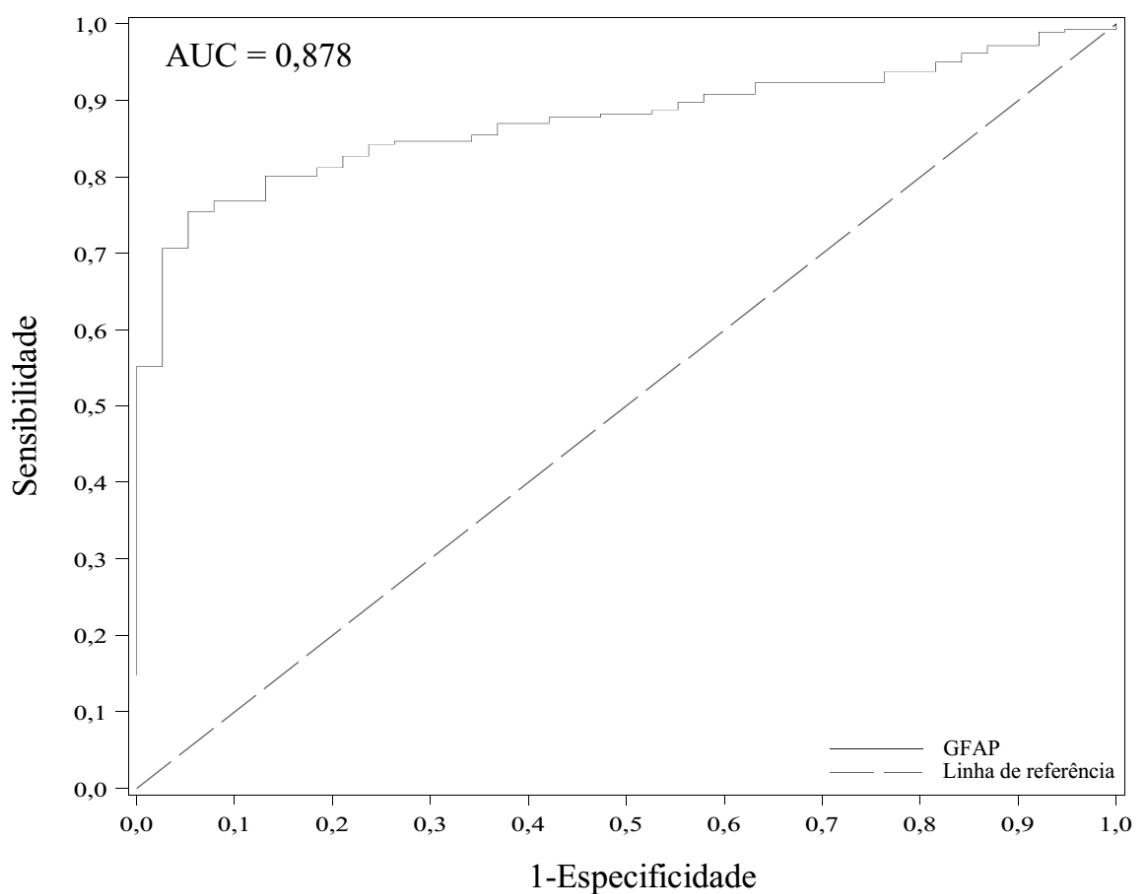


FIG. 2A

Análise Clínica TRACK-LCT
Análise ROC: LCT leve vs. controles ortopédicos
Ensaio: UCHL1

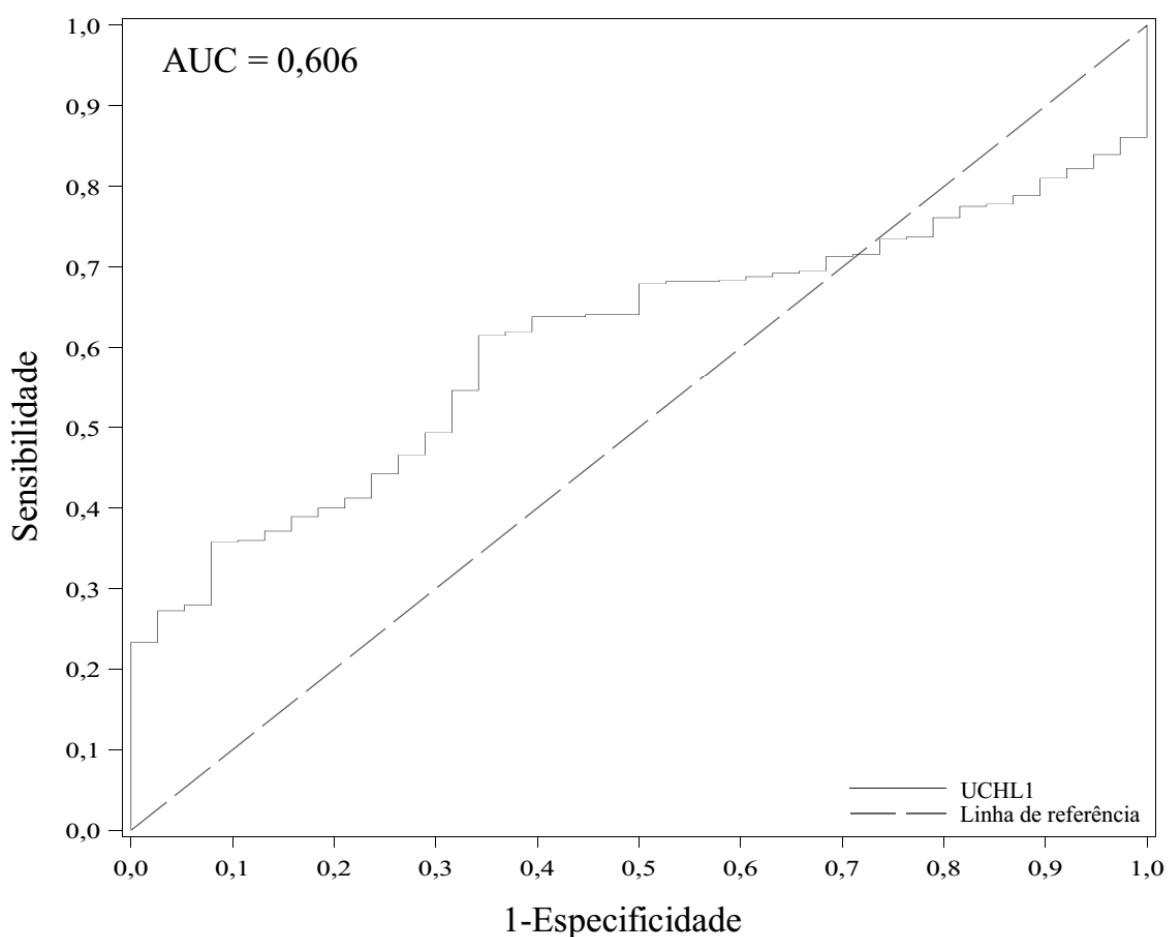


FIG. 2B

Análise Clínica TRACK-LCT Análise
ROC: LCT leve vs. controles saudáveis
Ensaio: GFAP

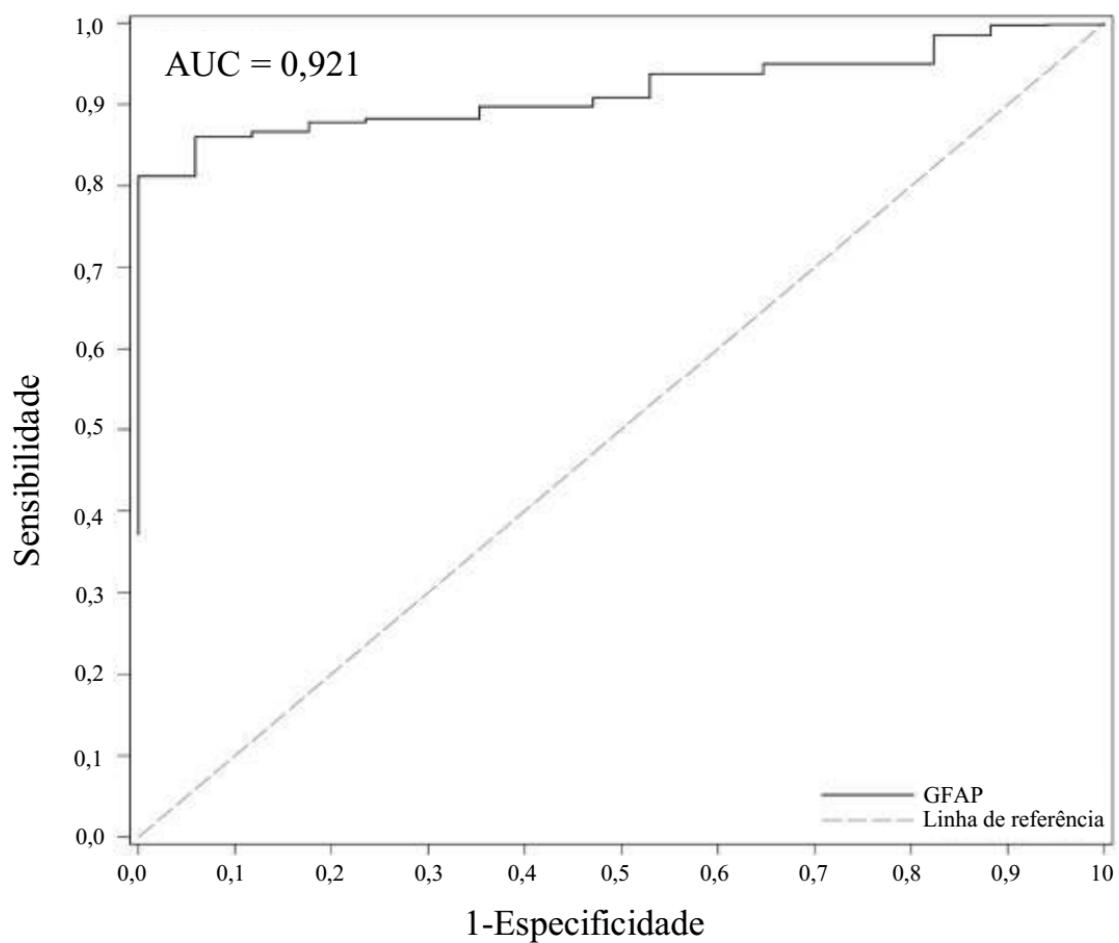


FIG. 3A

Análise Clínica TRACK-LCT
Análise ROC: LCT leve vs. controles saudáveis
Ensaio: UCHL1

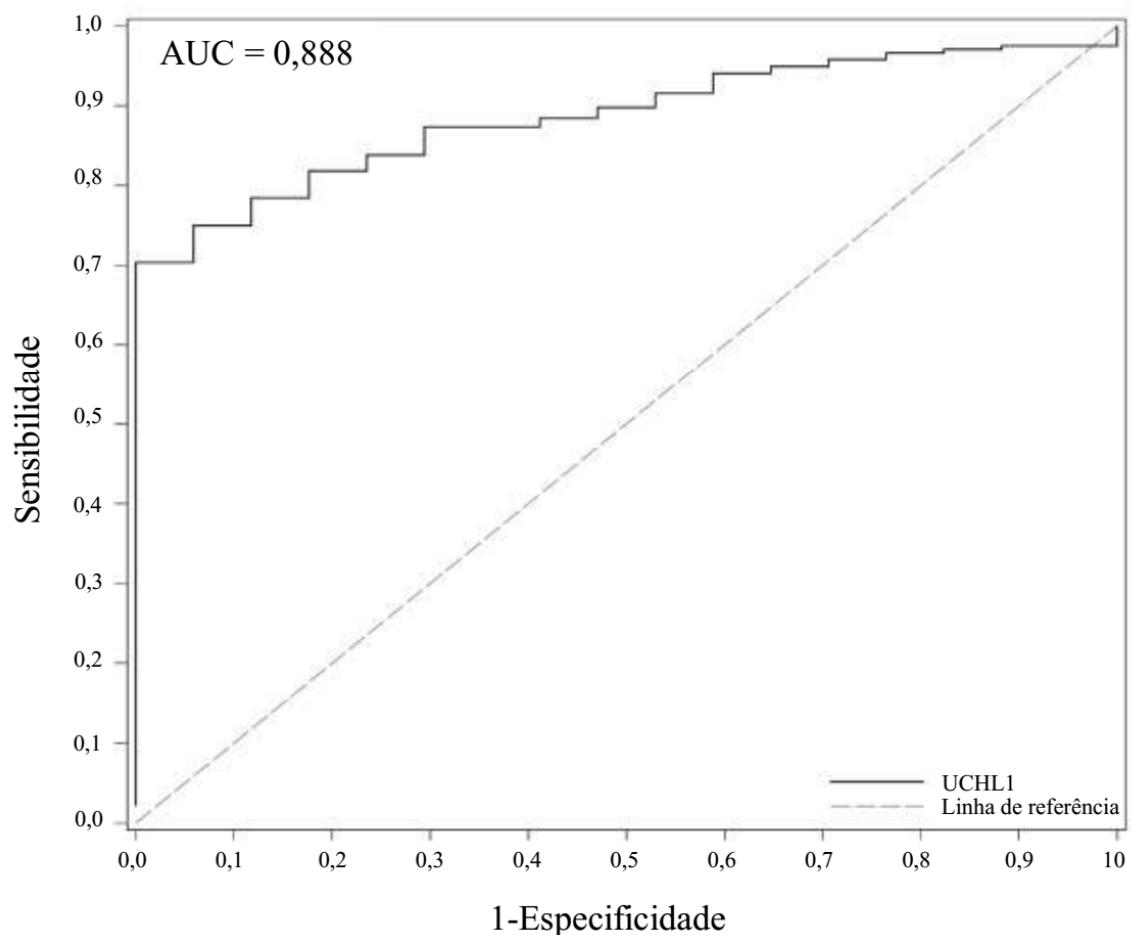


FIG. 3B

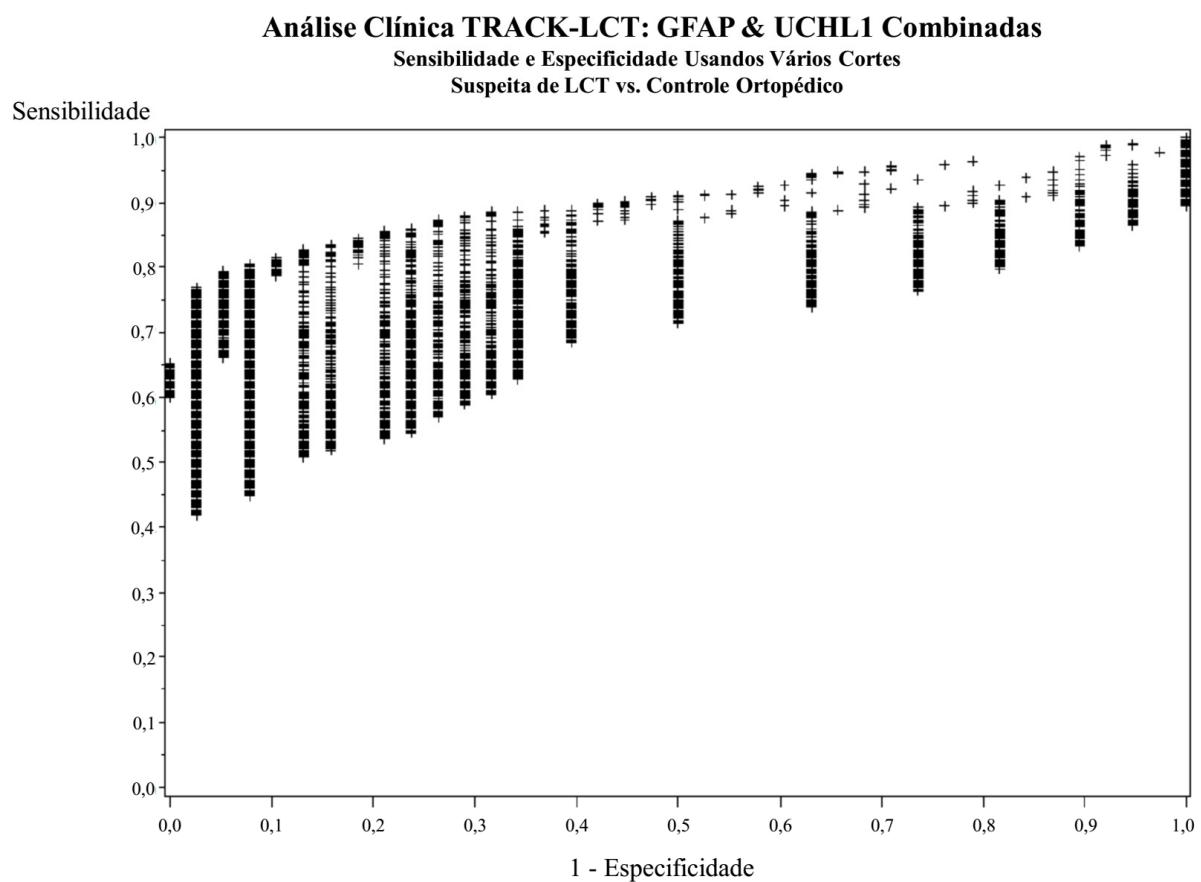


FIG. 4

Análise Clínica TRACK-LCT: GFAP & UCHL1 Combinadas

Sensibilidade e Especificidade Usando Vários Cortes
Suspeitas de LCT vs. Controles Saudáveis

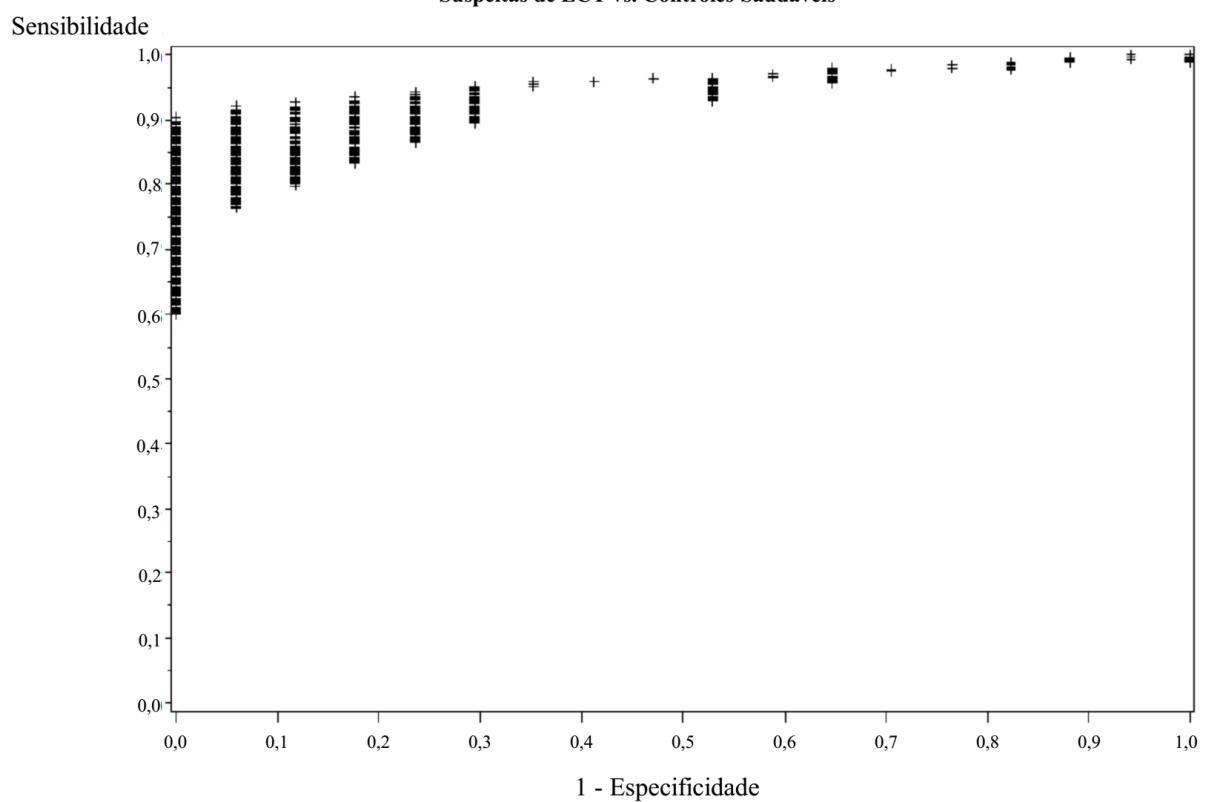


FIG. 5

Análise Clínica TRACK-LCT: GFAP & UCHL1 Combinadas

Sensibilidade e Especificidade Usando Vários Cortes
Controles Ortopédicos – TC (Positiva vs. Negativa)

Sensibilidade

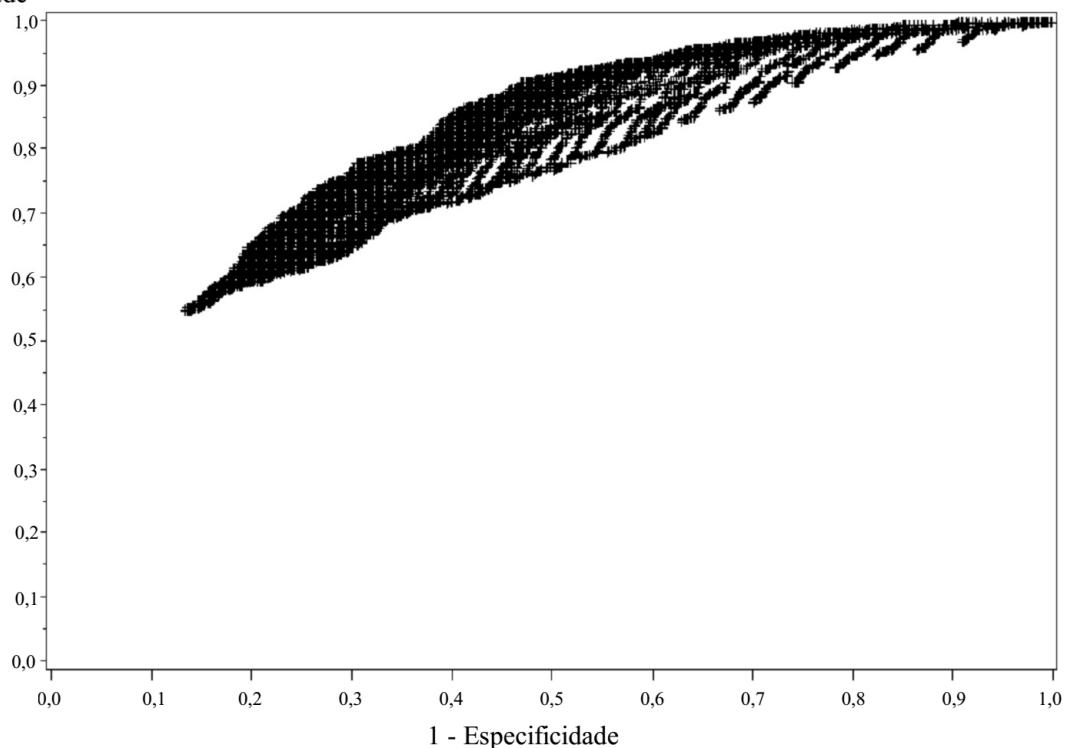


FIG. 6

Análise Clínica TRACK-LCT – GFAP & UCHL1 Combinadas

Sensibilidade e Especificidade Usando Vários Cortes

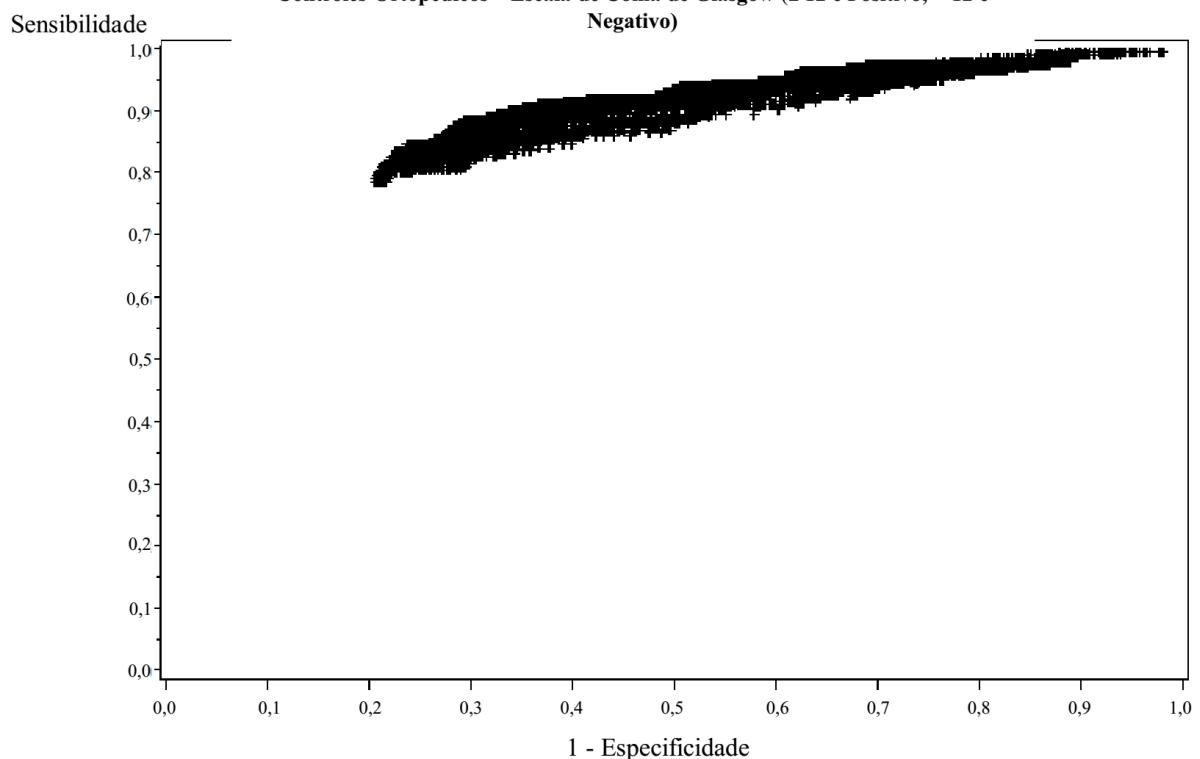
Controles Ortopédicos – Escala de Coma de Glasgow (≤ 12 é Positivo, > 12 é Negativo)

FIG. 7

Análise Clínica TRACK-LCT: GFAP & UCHL1 Combinadas

Sensibilidade e Especificidade Usando Vários Controles

Controles Ortopédicos – MRI (Positiva vs. Negativa)

Sensibilidade

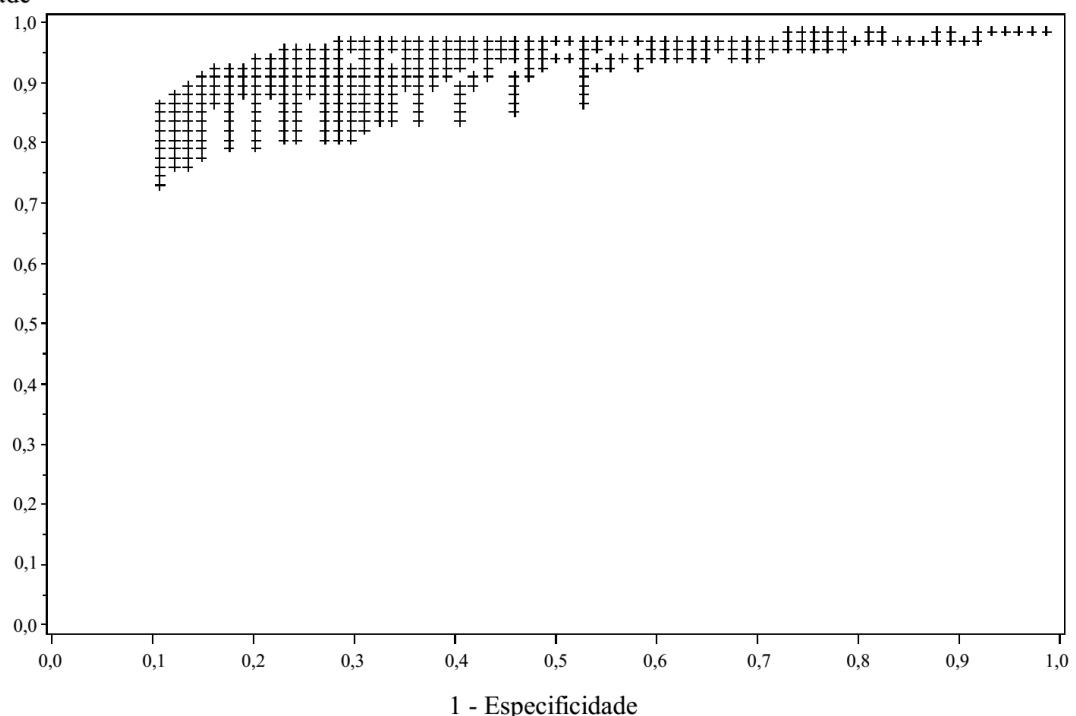


FIG. 8

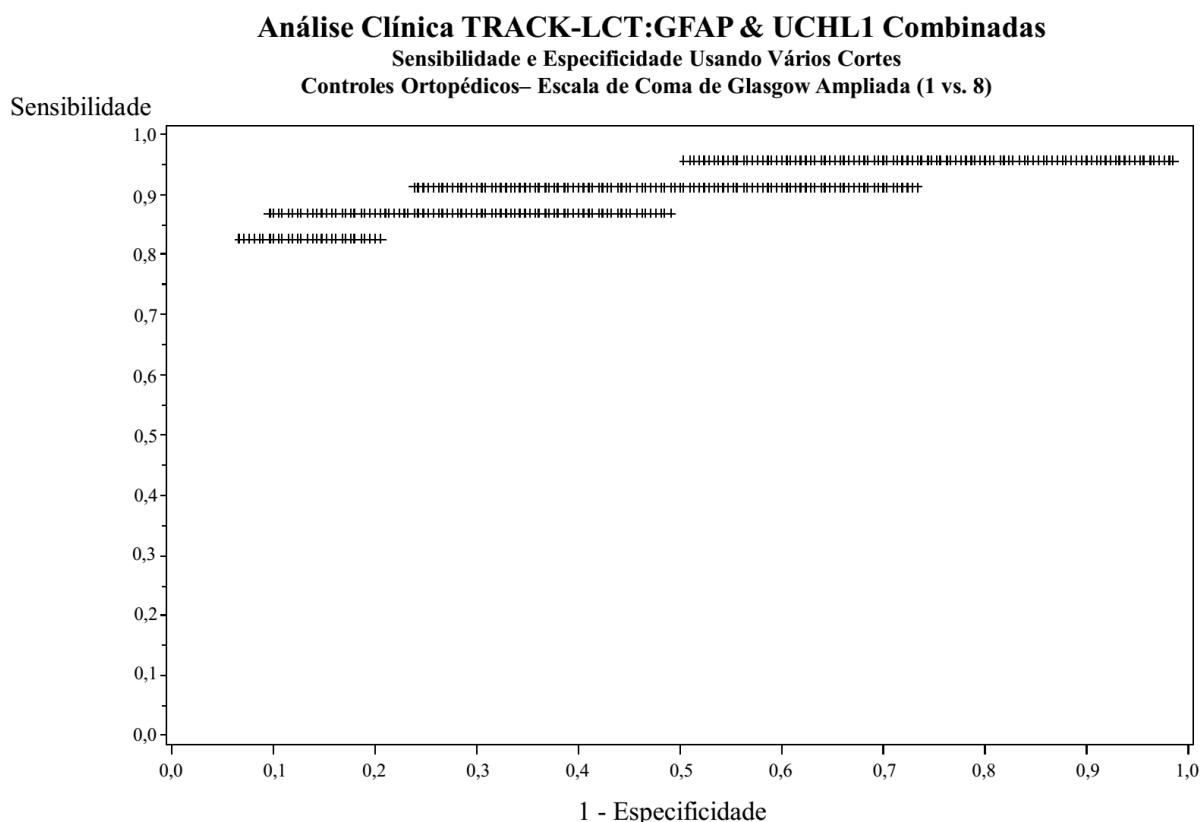


FIG. 9

RESUMO

"MÉTODOS PARA AJUDAR NO DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE UM PACIENTE QUE SOFREU UMA LESÃO ORTOPÉDICA E QUE SOFREU OU PODE TER SOFRIDO UMA LESÃO NA CABEÇA, TAL COMO UMA LESÃO CEREBRAL TRAUMÁTICA (LCT) LEVE, USANDO A PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP) E/OU A HIDROLASE CARBÓXI-TERMINAL DA UBIQUITINA L1 (UCH-L1)"

São revelados neste documento métodos, e *kits* para uso nos referidos métodos, que ajudam no diagnóstico e na avaliação de um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça, tal como uma lesão cerebral traumática (LCT) leve, usando a hidrolase carbóxi-terminal da ubiquitina L1 (UCH-L1), a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ou uma combinação dessas. Também são revelados neste documento métodos, e kits para uso nos referidos métodos, que ajudam a determinar se um paciente que sofreu uma lesão ortopédica e que sofreu ou pode ter sofrido uma lesão na cabeça se beneficiaria de um procedimento de imagiologia, tal como IRM ou varredura por tomografia computadorizada (TC) da cabeça, e, portanto, deve recebê-lo com base nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1. Esses métodos envolvem detectar níveis e mudanças nos níveis de GFAP e/ou UCH-L1 em amostras biológicas coletadas de um paciente em pontos no tempo dentro de 48 horas após o paciente sofrer ou poder ter sofrido uma lesão na cabeça.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 197.540-4 - listagem de sequências.txt
- Data de Geração do Código: 30/12/2019
- Hora de Geração do Código: 15:18:04
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4A8A0E19E25F1245
 - Campo 2: 46F711A44944629E