

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 014**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2021 PCT/US2021/016740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2021 WO21158865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2021 E 21750114 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024 EP 4100060**

54 Título: **Método in vitro para diagnosticar lesiones del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

06.02.2020 US 202062970769 P

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

21.10.2024

73 Titular/es:

**PERSEUS SCIENCE GROUP, LLC (100.0%)
5 Dogwood Drive
Old Lyme, CT 06371, US**

72 Inventor/es:

CORNELL-BELL, ANN H.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 983 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* para diagnosticar lesiones del sistema nervioso central

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a un método *in vitro* mejorado para diagnosticar rápidamente la aparición y gravedad de un evento isquémico traumático que involucra al sistema nervioso central, como una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral. El método incluye el uso de anticuerpos monoclonales para detectar la presencia de la isoforma gamma de la proteína cinasa C (PKC γ) y de fragmentos proteolíticos de PKC γ que entran al torrente sanguíneo como resultado de la ruptura de la barrera hematoencefálica después de una lesión en el sistema nervioso central.

10 Antecedentes de la invención

15 La lesión cerebral traumática (TBI) es una de las principales causas de muerte en el mundo y es una de las principales causas de discapacidad en adultos (Langlois et al., J. Head Trauma Rehabil., 21(5): 375-378 (2006)). La incidencia de TBI en EE.UU. es comparable a la de derrame cerebral, pero afecta a personas más jóvenes, de modo que resulta en una mayor carga para la atención médica. Cada año se producen en Estados Unidos aproximadamente 5 millones de casos nuevos de TBI, con un coste anual estimado de 60,000 millones de dólares (Yu et al., Brain Res., 1287: 157-163 (2009)); Mammis et al., Surg. Neurol., 71:(5), 527-531 (2009)).

20 El daño de la lesión cerebral traumática (TBI) resulta en la hiperexcitabilidad de las células nerviosas, también denominada "excitotoxicidad", a través de actividad eléctrica y neurotransmisora mediada predominantemente por receptores de glutamato (Barr et al., Brain Inj., 26: 58-66 (2012)). La TBI también es una enfermedad isquémica. Utilizando tomografía por emisión de positrones, Veenith et al. reportaron que el volumen cerebral isquémico y el volumen cerebral hipóxico son más altos después de una TBI que en pacientes control (Veenith et al., JAMA Neurol., 73(5): 542-550 (2016)). La isquemia e hipoxia se producen de TBI en regiones que no se traslapan y se observa una reducción generalizada en el metabolismo oxidativo en la mayoría de los casos de TBI (Vespa, P.M., JAMA Neurol., 73(5): 504-505 (2016)).

25 Un "derrame cerebral" se define clínicamente como un síndrome de origen vascular de evolución rápida con pérdida focal de la función cerebral. Un derrame cerebral se produce cuando el suministro de sangre a una parte del cerebro se interrumpe repentinamente (derrame cerebral isquémico) o cuando un vaso sanguíneo en el cerebro se rompe, derramando sangre en los espacios que rodean a las células cerebrales (derrame cerebral hemorrágico). Una persona tiene un derrame cerebral cada cuarenta segundos en EE.UU. El 85% de ellos, aproximadamente 750,000 casos al año son isquémicos, el resultado de una obstrucción en un vaso sanguíneo que suministra sangre al cerebro. El 15 por ciento restante de los derrames cerebrales se produce cuando un vaso sanguíneo del CNS se desgarrar y se acumula sangre en el cerebro (Stanford Stroke Center).

35 El diagnóstico oportuno de una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral es fundamental para la recuperación de la víctima. Los retrasos en el diagnóstico y la intervención médica pueden contribuir al deterioro clínico y la discapacidad. Un diagnóstico temprano permite a los médicos elegir con mayor eficacia las intervenciones de urgencia adecuadas. Un retraso en la evaluación de un diagnóstico preciso y certero desperdicia la limitada cantidad de tiempo disponible en la que el cerebro puede responder a la reperusión y aumenta significativamente el riesgo de hemorragia después de que se haya producido la mayor parte de la lesión permanente (Marler, J.R., Ann. Emerg. Med., 33: 450-451 (1999)). El ensayo DEFUSE 3 para derrame cerebral isquémico (ensayo aprobado por los NIH) estableció una ventana de tiempo de 6-24 horas después de que se supiera por última vez que el paciente estaba "bien" para el tratamiento endovascular. La ventana para trombectomía es de 6-16 horas (Albers et al., N. Engl. J. Med., 378: 708-718 (2018)). Dos estudios electrofisiológicos demostraron un efecto significativo en la lesión a los 8 días después de sufrir una contusión relacionada con los deportes, con recuperación para el día 45, aunque los síntomas clínicos del deportista aparentemente se recuperaron entre los 5 y 8 días. Este hallazgo indica que las perturbaciones fisiológicas persisten mucho después de la aparente "recuperación clínica" (McCrea et al., J. Head Trauma Rehabil., 25: 283-292 (2010); Barr et al., Brain Inj., 26: 58-66 (2012)). A un paciente que acude a la sala de urgencias con una lesión cerebral traumática leve se le realizan pruebas neurológicas básicas y puede someterse a pruebas de neuroimagen como MRI o escaneo CT. Dependiendo de la gravedad de la lesión cerebral, se pueden administrar determinados fármacos, como diuréticos, fármacos anticonvulsivos y/o fármacos inductores del coma. La cirugía puede ser necesaria para minimizar el daño a los tejidos cerebrales después del edema y la isquemia (Herring et al., Med. Sci. Sports Exerc., 38(2): 395-399 (2006)).

Liberación de glutamato del cerebro a la sangre

55 El cerebro es especialmente vulnerable a la isquemia y despolarización masiva (actividad eléctrica) de los nervios después de una TBI. Bajo esas condiciones, las señales normalmente responsables por el procesamiento de información se interrumpen en gran medida. El glutamato (Glu) se libera en grandes cantidades, inicialmente desde las terminales nerviosas y, finalmente, mediante transporte inverso que involucra astrocitos. (Szatkowski et al., Trends Neurosci., 17(9):359-365 (1994); Rossi et al., Nature, 403: 316-

321 (2000); Phillis et al., *Brain Res.*, 868(1): 105-112 (2000)). Los astrocitos poseen canales iónicos sensibles a glutamato que responden al glutamato con una rápida elevación del Ca^{2+} citoplasmático libre (Cornell-Bell et al., *Science*, 247(4941): 470-473 (1990)). Los astrocitos desempeñan un papel importante en la regulación de la barrera hematoencefálica.

5 El espacio intersticial cerebral, o "espacio extracelular" como se le denomina, es un espacio estrecho entre células neurales y capilares. La medición directa del glutamato en el espacio intersticial requiere inserción microquirúrgica de una cánula de microdiálisis en el cerebro (Chefer et al., *Curr. Protoc. Neurosci.*, 47(1): 7.1.1-7.1.28 (2009); Baker et al., *Neurochem.*, 57(4): 1370-1379 (1991)). Los estudios de microdiálisis en humanos y roedores demuestran un aumento inmediato en el glutamato intersticial en TBI (Guerriero et al., *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 15:27 (2015)). El aumento intersticial de glutamato se registró en humanos hasta 4 días después de la lesión, y los niveles se correlacionaron directamente con la mortalidad postraumática (Chamoun et al., *J Neurosurg.*, 113(3): 564-570 (2010); Guerriero et al. *supra*). El efecto neurotóxico de los aminoácidos excitatorios, concretamente glutamato y aspartato, en el cerebro ha sido bien documentado y se ha demostrado una correlación entre el contenido de glutamato en la sangre y la gravedad de la isquemia aguda (Castillo et al., *Stroke*, 27: 1060-1065 (1996); Castillo et al., *Lancet*, 349: 79-83 (1997)). El daño cerebral y su asociación con el derrame cerebral progresivo se atribuyen al aumento en la liberación de glutamato o a la baja recaptación de glutamato (Davalos et al., *Stroke*, 28: 708-710 (1997)).

Activación de PKC γ

20 La proteína cinasa C gamma (PKC γ o PKCg) se activa de forma persistente y se transloca a las membranas nerviosas después de la lesión cerebral. La PKCg es una enzima citosólica altamente regulada que está contenida en vesículas hasta que la exposición a Ca^{2+} elevado, lípidos elevados y diacilglicerol (DAG), ocasionan la activación y translocación de PKCg a la membrana plasmática (Mogami et al., *J. Biol. Chem.*, 278(11): 9896-9904 (2003)). La activación completa de PKCg requiere Ca^{2+} , DAG, así como fosfatidilserina (Oancea et al., *Cell*, 95:307-318 (1998); Nishizuka, Y., *Science*, 258: 607-614 (1992); Kaibuchi et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 6701-6704 (1983); Saido et al., *Biomed. Biochim. Acta*, 50(4-6): 485-489 (1991)). Una vez que se cumplen estas condiciones, la PKCg se libera al espacio intersticial. La excitotoxicidad por glutamato es directamente responsable por la distribución subcelular y la liberación cuantitativa de PKCg (Selvatici et al., *J. Neurosci. Res.*, 71: 64 -71 (2002); Domanska-Janik et al., *J. Neurochem.*, 58(4): 1432-1439 (1992); O'Reagan et al., *Neurosci. Lett.*, 185: 191-194 (1995); Lee et al., *J. Clin. Invest.*, 106(6): 723-731 (2000)). La excitotoxicidad por glutamato induce la activación de PKCg, la liberación de PKCg de las neuronas al espacio intersticial e inicia la ruptura de la barrera hematoencefálica lo que permite la entrada de PKCg a la circulación periférica. Esta es la base para el reciente ensayo del biomarcador PKCg (Cornell-Bell et al., *Pat. de EE.UU No.* 6,268,223). La liberación de PKCg aumenta a medida que la lesión aumenta (Selvatici et al., *Neurochem. Int.*, 49(8): 729-736 (2006)) y disminuye al remitir la lesión. Esto convierte a PKCg en un biomarcador ideal para calibrar el grado de lesión cerebral en lesiones del CNS como TBI o derrame cerebral.

Localización de PKC γ

40 La PKCg se expresa únicamente en el cerebro y la médula espinal y su localización está restringida a las neuronas (Saito, N. and Shirai, Y., *J. Biochem.*, 132: 683-687(2002)). La PKCg muestra una distribución neuronal y una localización intracelular únicas en el cerebro y el ARNm de PKCg se encuentra únicamente en el cerebro y la médula espinal (Tanaka, C. and Saito, N., *Neurochem. Int.*, 21: 499-512 (1992); Saito, N. and Shirai, Y., *supra*). La PKC gamma se ha localizado inmunológicamente en muchas regiones del cerebro, incluyendo hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo y retina (Huang, K.-P., and Huang, F. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 320-326 (1986); Saito, N. and Shirai, Y., *supra*). Los dominios C1 y C2 de PKCg unen DAG y Ca^{2+} , respectivamente. El dominio C1 de PKCg consta de dos repeticiones ricas en cisteína (C1A y C1B), que se unen a DAG con alta afinidad (Ono et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 4868-4871 (1989)). Bajo microscopía electrónica, PKCg, previa a la activación, se localiza en el citoplasma de la neurona que incluye núcleo y dendritas, espinas dendríticas, axón y terminales sinápticas (Kose et al., *J. Neurosci.*, 8: 4262-4268 (1988)). Los estudios de imagenología in vivo utilizando PKCg etiquetada con GFP (proteína verde fluorescente) revelaron activación y un ciclo rápido de esta isoenzima entre el citoplasma y la membrana plasmática de las células tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G o ionóforos de Ca^{+} (Sakai et al., *J. Cell Biol.*, 139: 1465-1476 (1997)). El movimiento dinámico de PKCg se produce en respuesta a la activación por Ca^{2+} y DAG. La translocación de PKCg es un mecanismo molecular básico de esta enzima. Una vez que PKCg es activada por Ca^{2+} y DAG, va a pasar a través de la membrana plasmática de la neurona al intersticio cerebral siguiendo las respuestas del segundo mensajero a los receptores acoplados a proteína G como se describió anteriormente (Sakai et al., *supra*). La isquemia cerebral induce la ruptura de la barrera hematoencefálica (BBB) permitiendo la entrada de PKCg a la sangre periférica (Hawkins, B.T. and Davis, T.P., *Pharmacol. Rev.*, 57: 173-185 (2005); Yang, Y. and Rosenberg, G.A., *Stroke*, 42: 3323-3328 (2011)).

Ruptura de la barrera hematoencefálica después de la isquemia

60 La barrera hematoencefálica (BBB) está formada por las células endoteliales de los microvasos cerebrales, proporcionando una interfaz dinámica entre la circulación periférica y el sistema nervioso central. La BBB regula

el transporte de moléculas dentro y fuera del sistema nervioso central (CNS), lo que mantiene estrechamente controlada la composición química del medio neuronal que es necesaria para el correcto funcionamiento neuronal (Sweeney et al., *Physiol. Rev.*, 99(1): 21-78 (2019)). Bajo condiciones de derrame cerebral isquémico, la disminución de la integridad de la unión estrecha de la BBB resulta en un aumento de la permeabilidad paracelular bidireccional, lo que contribuye directamente al edema vasogénico cerebral, la transformación hemorrágica y el aumento de la mortalidad (Sandoval, K.E. and Witt, K.A., *Neurobiol. Dis.*, 32(2): 200-219 (2008)). Se ha reportado que ocurre un aumento en la permeabilidad de la BBB después de diversos tipos diferentes de lesiones cerebrales agudas experimentales (Yang, Y. and Rosenberg, G.A., *Stroke*, 42: 3323-3328 (2011)). Los modelos de contusión por percusión fluida e impacto-aceleración difusa, así como otros tipos de lesiones cerebrales como hipoxia-isquemia y cerebritis por radiación en la rata adulta, están acompañados por un aumento en la permeabilidad de la BBB. Las etiologías de la pérdida de integridad de la BBB se han atribuido a una alteración mecánica directa, o a mecanismos específicos como inflamación o excitotoxicidad (Adelson et al., *Acta Neurochir. Suppl.*, 71: 104-106 (1998)). El aumento en la permeabilidad de la BBB por VEGF está limitado por el tamaño de la sustancia administrada, lo que sugiere que un tamaño más pequeño mejora el paso a través de la BBB (Ay et al., *Brain Res.*, 1234: 198-205 (2008); Mikitsh, J.L. and Chacko, A.M., *Perspect. Medicin. Chem.*, 6: 11-24 (2014)).

Fragmentos PKCg

Un problema técnico con los métodos anteriores que utilizan PKCg como un biomarcador diana para diagnosticar lesión en el CNS es que la señal para PKCg de longitud completa en sangre periférica es variable de un paciente a otro, de modo que los ensayos centrados en la detección de PKCg a menudo conducen a resultados negativos falsos. Esto se debe en parte al hecho de que en la serie de acontecimientos que conducen a que PKCg atraviese la barrera hematoencefálica, la proteína PKCg de longitud completa se descompone en fragmentos proteolíticos, y por lo tanto los métodos de detección dirigidos a la proteína intacta buscan a una diana cada vez menor.

El sitio intersticial de la isquemia cerebral es un ambiente excitotóxico con alto Ca^{2+} , fosfolípidos y altos niveles de DAG de las neuronas dañadas, así como niveles tóxicos de neurotransmisores y proteasas que se dirigen a PKCg. Los fragmentos proteolíticos de PKCg se han identificado y caracterizado desde los 1970s (Inoue et al., *J. Biol. Chem.*, 252: 7610-7616 (1977)). Un entorno isquémico, excitotóxico repleto con enzimas proteolíticas contribuye a la formación de fragmentos de PKCg antes de su liberación a la circulación periférica. Hemos determinado que los fragmentos proteolíticos de PKCg que aparecen en una muestra de sangre periférica pueden ser un biomarcador adicional de lesión en el CNS.

La PKCg humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1  MAGLGGVGD  SEGGPRPLFC  RKGALRQKVV  HEVKSHKFTA  RPFKQPTFCG  HCTDFIWGIG
61  RQGLQCQVCS  FVVHRRCHEF  VTFECPGAGK  GPQTDQPNK  HKFRLESYSS  PTFCDKCGSL
121 LYGLVHQGMK  CSCCEMNVHR  RCVRSVPSLC  GVDHETERRG  LQLEIRAPTA  DEIHVTVGEA
181 RNLIPMDPNG  LSDPFYVKLKL  IPDRNLTSQ  KTRIVKATLN  PVWNETFVFN  LKPGDVEBRL
241 SVEVNDWDRT  SRNDFMGAMS  FGVSSELLKAP  VDGWYKLLNQ  EEGEYYNVPV  ADADNCSLLQ
301 KFEACNYPLE  LYERVRMGFS  SSPIPSPSPS  FTDPKRCFTG  ASPGRLHISD  FSFLMVLGKG
361 SFGKVMLAER  RGSDELYAIK  ILKRDVIVQD  DDVDCTLVEK  RVLALGGRGP  GGRPHFLTQL
421 HSTFQTPDRL  YFVMEYVTGG  DLMYHIQQLG  KFKEPAAAFY  AAELAIGLFF  LHNQGLIYRD
481 LKLDNVMLDA  EGRIKITDFG  MCKENVFPGT  TTRIFCGTPD  YIAPEIIAYQ  PYGKSVDWWS
541 FGVLLYEMLA  GQPPFDGEDE  EELFQAIMSQ  TVTYPKSLSR  EAVAICKGFL  TRHPGKRLGS
601 GPDGEFTIRA  HGFFRWIDWE  RLERLEIPPF  FRPRPCGRSG  ENFDKFFTRA  APALTFPDRL
661 VLASIDQADF  QGFTYVNPDF  VEPDARSPTS  PVPVPEVM  (SEQ ID NO:1)

```

Todos los sitios de proteólisis de PKCg están situados en la región variable V3, que está situada justo N-terminalmente a los dominios reguladores C3/C4. Véase, Kishimoto et al., *J. Biol. Chem.*, 264(7): 4088-4092 (1989). En la secuencia polipeptídica de PKCg reproducida a continuación, los dominios variables (V1, V2, V3) se denotan con subrayado sencillo y los dominios reguladores (C1, C2, C3/C4) se denotan con subrayado doble:

MAGLGFGVGDSEGGPRPFLCRRKALRQKVVHEVKSHEKFTARFFKQPTFCSHCTDFIWIIGIKGKGLQDQVCSFVVHPRC
HEFVTFEFCPSAGRGQPTDDPRNKHKERLESYSSPFFCDRCGSLLYGLVROGMKCSCEEMNVERRTVRSVPFLSGVDHF
TERRGRLOLEIRAPTADDEIKVTVGEARNLI PMDPNGLSDPYVKLKLIPDFRNLTKOKIRTVKATLNPVWNETEVFNL
KPGDVERRLSVEVWDWDRISRNDFMGAMSEGVSELLKAPVDGWYKLLNQEEGEYYNVFVADADNCSLLQKFEACNYP
LELYERVVMGPFSSSPIPSPSPSPDTPKRCFFGASEGRPLHISDFSLMVLGKGSFGKVMLAEBRGSDDELYAIKILKKD
VIVQDDDDVDCILVEKRVLALGGGRGGRPHFELTQLESTEQTPDRLYFVWVEYVTGGDLMYHIQQLGKEKPEHAAFYAA
EHAIGLFFLENQGIYRDLELONVMIDAEGRHKITDFGCMCKENVFPPTITKTFECGTFDYIAPETIAYQPVYKSVDNW
SFGVLLYEMLASQPPFDGEDEEELFQAIMEQTVTPKSLSGREAVAICKGFLTKHFGKRLGSGPDSEPTIRAGGFFRN
IDWERLERLEIPPPFRPRPCGRSGENEDKFFTRAAPALTEPDRLVLASIDQADFOGFTYVNFDFVHFDARSPTSPVP

VPVM (SEQ ID NO:1)

Hay sitios de corte de calpaína en el dominio V3, entre Ser₃₂₁ y Ser₃₂₂ y entre Phe₃₃₈ y Phe₃₃₉.

5 La calpaína escinde sustratos preferentemente en un residuo de leucina o valina (P2), sin embargo, esto no ocurre con todos los sustratos. También está involucrado un segundo sitio de reconocimiento que contiene aminoácidos hidrofílicos (Pro, Asp/Glu, Ser y Thr). Las calpaínas no causan una degradación general de las proteínas celulares, sino que más bien provocan una escisión limitada de sus sustratos y, en muchos casos, activan diversos sistemas celulares, incluyendo la enzima PKCg (Zhivotovsky et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 230(3): 481-488 (1997)).

10 Los fragmentos de PKCg han sido nombrados por el peso molecular que los identifica a partir de estudios bioquímicos anteriores que identificaron dominios de unión de la molécula PKCg. El primer fragmento de PKCg identificado en la literatura fue el fragmento de 50 kDa del dominio catalítico de PKCg (V3) (Inoue et al., J. Biol. Chem., 252: 7610-7616 (1977)). Un estudio posterior (Kishimoto et al. (1989), *supra*) identificó dos fragmentos catalíticos de 49 kDa y 47 kDa, y se identificó un fragmento regulador de 36 kDa después de la digestión de Calpaína. Los fragmentos de 45-50 kDa de estas isoenzimas contenían el dominio catalítico de la cinasa, y los
 15 fragmentos de 33-38 kDa contenían el dominio de unión PS/éster de forbol (Huang, K.P. and Huang, F.L. (1986) *supra*). Se volvieron a confirmar fragmentos de 50, 45, 38, 36, 35 y 33 kDa para PKCg (Huang, K.P. and Huang, F. L., J. Biol. Chem., 261: 14781-14787 (1986)). Ahora se ha establecido que estos fragmentos de PKCg enlistados son productos persistentes de proteólisis que son cuantificables y estables en las muestras clínicas de sangre. La presente invención proporciona un medio para utilizar estos fragmentos en ensayos de
 20 diagnóstico cuantitativos para lesiones en el CNS. WO0116599A1 divulga un método para la detección de daños en el CNS con una técnica de sándwich utilizando dos anticuerpos anti-PKCg.

Sumario de la invención

25 La presente invención está definida por las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención se refiere a tres anticuerpos anti-PKCg y su uso en un método *in vitro* para diagnosticar una lesión que involucra al sistema nervioso central (CNS).

30 Actualmente, existe la necesidad de un método rápido, sencillo y altamente confiable para diagnosticar la aparición y gravedad de una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral que permita una intervención médica rápida y eficaz para minimizar los efectos a corto y largo plazo de la lesión en el CNS. La presente invención proporciona un novedoso método *in vitro* para diagnosticar una lesión a las neuronas del CNS mediante la detección de la presencia de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg en una muestra de
 35 sangre venosa extraída de un sujeto sospechoso de sufrir una lesión en el sistema nervioso central, como una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral. El cribado de PKCg y de fragmentos de PKCg en sangre venosa después de un evento isquémico que involucra al sistema nervioso central es especialmente ventajoso porque (1) esta molécula de señalización está estrechamente controlada por la activación del receptor de glutamato resultante de la lesión; (2) este biomarcador sólo se encuentra en células nerviosas del cerebro y la médula espinal; (3) PKCg está estrechamente controlada sin fugas basales al espacio extracelular; y (4) la ruptura de la barrera hematoencefálica resultante de la excitotoxicidad por glutamato permite que PKCg y los fragmentos de PKCg viajen a través de la BBB y estén disponibles para su detección en una muestra de sangre
 40 periférica. El análisis de fragmentos proteolíticos, como el fragmento de 49-52 kDa, muestra que este fragmento se puede utilizar como un indicador muy sensible de TBI, ya que este fragmento se observa raramente y con baja señal en el plasma humano normal. Junto con este aumento en el diagnóstico de lesión del CNS utilizando fragmentos de PKCg, se descubrió que las combinaciones multiplexadas de los anticuerpos descritos en la presente, 1H1 (PKC11), 5H1 (PKC13) y 7H1 (PKC14) pueden mejorar también el diagnóstico de lesión.

45 La presente invención está dirigida a un novedoso método *in vitro* para el diagnóstico rápido y preciso de una lesión al sistema nervioso central (CNS). El método incluye obtener una muestra de sangre periférica de un sujeto sospechoso de haber sufrido una lesión que involucra al sistema nervioso central y analizar la muestra

para la presencia de PKCg y de fragmentos de PKCg. La PKCg y los fragmentos proteolíticos de PKCg no están normalmente presentes en el torrente sanguíneo de un individuo sano, pero atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB) y entran en el torrente sanguíneo después de un evento traumático o isquémico que involucra al sistema nervioso central. El método también es capaz de determinar la gravedad de la lesión en el sujeto mediante el análisis de los niveles de la PKCg y los fragmentos de PKCg presentes en la sangre periférica.

En una realización preferible, la presente invención se dirige a un método novedoso para el diagnóstico de una lesión cerebral traumática (TBI) en un sujeto sospechoso de haber sufrido una TBI. En otra realización, la presente invención se dirige a un método novedoso para el diagnóstico de un derrame cerebral en un sujeto sospechoso de haber sufrido un derrame cerebral. En una realización preferible, el método se lleva a cabo mediante un ensayo *in vitro* en el que los biomarcadores en una muestra de sangre periférica se ponen en contacto con uno o más anticuerpos monoclonales dirigidos contra al menos un epítipo presente en los biomarcadores bajo condiciones en las que los anticuerpos van a formar complejos de unión con los biomarcadores, cuyos complejos se pueden detectar mediante métodos conocidos en la técnica. De acuerdo con los descubrimientos detallados en la presente, la precisión del diagnóstico y la velocidad con la que se puede realizar se mejoran en un grado sorprendente mediante la utilización de al menos un anticuerpo anti-PKCg capaz de unirse a fragmentos proteolíticos particulares de PKCg que incluyen epítopes específicos y únicos de la isoforma gamma de PKC.

De acuerdo con el método de la invención, se obtiene una muestra de sangre periférica, por ejemplo, sangre venosa, de un sujeto sospechoso de haber sufrido una lesión en el CNS como TBI o derrame cerebral, y la muestra de sangre se analiza para la presencia de biomarcadores indicativos de un evento isquémico en el sistema nervioso central, específicamente la isoforma gamma de la proteína cinasa C nativa (en adelante, PKCγ o PKCg), y uno o más fragmentos proteolíticos únicos (productos de descomposición) de PKCg en la muestra. Estos biomarcadores de PKCg, que normalmente no se encuentran en la sangre periférica de individuos sanos, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y entrar en el torrente sanguíneo después de una lesión en el sistema nervioso central. La presencia de PKCg y/o de los fragmentos proteolíticos de PKCg en el torrente sanguíneo es un indicador de que el sujeto ha sufrido una lesión en el CNS. Los datos divulgados en la presente muestran la precisión aumentada de los métodos reivindicados para diagnosticar la aparición de lesiones por TBI y derrame cerebral. Además, los niveles absolutos (cantidad) de biomarcadores de PKCg presentes en la sangre periférica después de una TBI o un derrame cerebral dan una indicación de la gravedad de la lesión, donde niveles más altos de la PKCg y/o los fragmentos proteolíticos de PKCg indican un evento traumático más grave. Por "nivel más alto" se entiende, por ejemplo, en comparación con los niveles de fondo encontrados en muestras de sangre periférica de sujetos normales, esto es, sujetos que no han sufrido una lesión en el CNS). Además, dado que estos biomarcadores aparecen en el torrente sanguíneo casi inmediatamente después de una TBI o un derrame cerebral, el presente método puede ser empleado por el personal de urgencias en el campo o la sala de urgencias para proporcionar un diagnóstico rápido y preciso inmediatamente, o en cuestión de minutos, del evento traumático.

En una realización preferible, la precisión y confiabilidad de métodos para identificar individuos que han sufrido una TBI o un derrame cerebral se incrementa a más de 90% o superior (es decir, diagnóstico preciso de > 9 pacientes de cada 10) e incluso a niveles que se aproximan a 100% al combinar los niveles de detección de al menos dos de los anticuerpos monoclonales anti-PKCg descritos en la presente (multiplexación). Al combinar las señales de detección de las muestras sondeadas con dos o más anticuerpos como se describe en la presente, la confiabilidad del diagnóstico mejoró hasta esencialmente 100% de las muestras, o precisión total.

En ensayos adicionales, con la finalidad de mejorar la precisión y confiabilidad de un diagnóstico de TBI o derrame cerebral, descubrimos que combinar los resultados de sondear una muestra de sangre de un paciente con TBI o derrame cerebral con los anticuerpos monoclonales anti-PKCg descritos en la presente proporcionaba un "perfil" o patrón de fragmentos proteolíticos de PKCg/PKCg que mejoraba la precisión y confiabilidad del diagnóstico. Se identificaron anticuerpos únicos que reconocen fragmentos de PKCg que tenían alta sensibilidad, alta especificidad y bajos resultados positivos falsos cuando los anticuerpos anti-PKCg se ponían en contacto en una muestra de plasma de TBI o de derrame cerebral.

Adicionalmente, el novedoso método *in vitro* descrito en la presente es capaz de cuantificar los niveles (concentraciones) de PKCg de longitud completa (63-73 kDa) y de fragmentos proteolíticos de PKCg particulares descritos en la presente en la muestra de sangre y, por lo tanto, proporcionar un indicador confiable de la gravedad de la lesión en el CNS, ya que niveles más altos de estos biomarcadores de PKCg son indicativos de una lesión más grave en el sistema nervioso central. Este procedimiento de diagnóstico mínimamente invasivo se puede llevar a cabo fácilmente por personal de ambulancias o de sala de urgencias y se puede llevar a cabo con una muestra de sangre venosa y un kit de ensayo como se describe en la presente, cuyo kit va a incluir todos los componentes necesarios para un diagnóstico rápido y confiable.

En otra realización, la presente invención también proporciona novedosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos capaces de unir PKCg humana, en los que el dominio variable del anticuerpo comprende un conjunto de seis regiones determinantes de la complementariedad, o CDR (es decir, CDR-H1,

ES 2 983 014 T3

CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3), seleccionadas del grupo de conjuntos de CDR definidos a continuación:

No. de conjunto de CDR	CDR	Secuencia de aminoácidos de las CDR	SEQ ID NO:
1	CDR-H1	GFSLNYIA	SEQ ID NO:3
	CDR-H2	ITSDTT	SEQ ID NO:4
	CDR-H3	ASGGSTTSPAL	SEQ ID NO:5
	CDR-L1	QSVWSKNY	SEQ ID NO:6
	CDR-L2	SAS	SEQ ID NO:7
	CDR-L3	LGSYDCRSADCWT	SEQ ID NO:8
2	CDR-H1	GFSLSSYA	SEQ ID NO:9
	CDR-H2	IISGGSA	SEQ ID NO:10
	CDR-H3	ARAKSGTYTGDYFTL	SEQ ID NO:11
	CDR-L1	ESIGNA	SEQ ID NO:12
	CDR-L2	RAS	SEQ ID NO:13
	CDR-L3	QSYVGSRSTGYNV	SEQ ID NO:14
3	CDR-H1	GFTLTTYW	SEQ ID NO:15
	CDR-H2	ILTGSGST	SEQ ID NO:16
	CDR-H3	ARYGGDATYNENL	SEQ ID NO:17
	CDR-L1	QSVYNNNR	SEQ ID NO:18
	CDR-L2	GVS	SEQ ID NO:19
	CDR-L3	LGGYDCASADCYA	SEQ ID NO:20

- 5 En realizaciones adicionales, un anticuerpo anti-PKCg de acuerdo con la invención comprende dominios VH (cadena pesada variable) y VL (cadena ligera variable), en los que los dos dominios variables comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

dominios VH & VL de los anticuerpos	Dominio variable	SEQ ID NO.	secuencias de aminoácidos 1234567890123456789012345678901234567890
1H1/1K1	VH	21	METGLRWLLLVAVLKGVCQCSVEESGGRLVTPGTPALATC TVSGFSLNYIAMNWVRQAPVKGLEWIGVITSDTTYASWA KGRFTISKTSITVELQITSPITTEDTATYFCASGGSTTSPA LWQQGTLVTVSS
	VL	22	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSPVSAAVGST VTINCOASQSVWSKNYLSWFQQKPGQPPKQLIYSASTLAS GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCRS ADCWIFGGGTEVVVK
4H1/4K1	VH	23	METGLRWLLLVAVLKGVCQCSVEESGGRLVTPGTPPLTLC TVSGFSLSLSRNAVSWVRQAPGKLEWTGIIFGDAKTYYA SWAKGRFTISKTTATVLDLKITSLTTEDTATYFCVAGTGLW GQGTLVTVSS

ES 2 983 014 T3

	VL	24	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTASPVSAAVGST <u>VTINCQASQSVYNKNR</u> LSWYQQKPGQPPKRLIYSSSTLDS <u>GVPLRFSGSGSGTQFTLT</u> ISGVQCDDAATYYCLGSDYDCSS <u>ADCNAFGGGTEVVVK</u>
7H1/7K3	VH	25	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVQPGASLTLC TASGFTLTYWICWVRQAPGKGLEWVACILTGSGSTYYAS WVNGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARYGGDA TYNENLWGQGTTLVTVSS
	VL	26	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTPSSVSAAVGGT <u>VTINCQASQSVYNNR</u> LSWYQQKPGQPPKRLIYGVSTLYY <u>GVSSRFKSGSGTQFTLT</u> ISGMQCDDAATYYCLGGYDCAS <u>ADCYAFGGGTEVVVK</u>
20H1/20K3	VH	30	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGRLVTPGTPLTLC TVSGIDLSSNAMNWRQAPGKGLEWIGIIGFSGSTNYASW AKGRFTISKTSSTVDLKITSPPTTDTATYFCARGLNIGM NLWGQGTTLVTVSS
	VL	31	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTPSPVSAAVGGT <u>VPI SCQSSQSVYDNN</u> WLAWYQQKPGQPPKLLVYYASTLAS <u>GVP SRFKSGSGTQFTLT</u> INDLECCDDAATYYCAGGYGDTN <u>GGASSFGGGTEVVVK</u>
5H1/5K1	VH	32	METGLRWLLLGAVLKGVQCQEQLKESGGGLVTPGGTTLTLT CTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIISGGSAYYAT WAKGRFTISKTSSTVDLSITSPPTTDTATYFCARAKSGTY TGDYFTLWGQGTTLVTVSS
	VL	33	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GARCAFELTQTPASVEAAVGGT <u>VTIKQASESIGNALAWY</u> QQKPGQPPKLLIYRASTLESV

Definiciones

- 5 Tal como se utiliza en la presente, el término "evento isquémico" se refiere a cualquier episodio potencialmente dañino resultante de la disminución temporal o permanente de la eliminación del flujo sanguíneo a los tejidos, en particular, con respecto a la presente invención, cualquier evento o suceso fisiológico que interrumpe el flujo sanguíneo a una porción del sistema nervioso central (CNS), especialmente el flujo sanguíneo craneal, y conduce a daños en el sistema nervioso central. Los tipos específicos de eventos isquémicos incluyen lesiones cerebrales traumáticas (TBI), derrames cerebrales u otros eventos que resulten en la interrupción del flujo sanguíneo al CNS.
- 10 Tal como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo" pretende ser sinónimo de "inmunoglobulina". Tal como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo" se refiere al anticuerpo nativo y a los derivados biológicamente activos del anticuerpo nativo, comúnmente denominados como "fragmentos activos" de un anticuerpo, como, por ejemplo, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂ o fragmentos Fv, así como anticuerpos de dominio sencillo y anticuerpos de cadena sencilla (scFv). Un fragmento activo de un anticuerpo conserva la
- 15 capacidad de unirse al antígeno reconocido por el anticuerpo completo (no fragmentado).
- Una composición o método descrito en la presente como "que comprende" (o "comprendiendo") uno o más elementos o pasos nombrados es de final abierto, lo que significa que los elementos o pasos nombrados son esenciales, pero pueden añadirse otros elementos o pasos dentro del alcance de la composición o método. Para evitar prolijidad, también se entiende que cualquier composición o método descrito como "que comprende" uno o más elementos o pasos nombrados también describe la composición o método correspondiente, más limitado, "que consiste esencialmente en" (o "consiste esencialmente en") los mismos elementos o pasos nombrados, lo que significa que la composición o método incluye los elementos esenciales nombrados y también puede incluir elementos o pasos adicionales que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la composición o método. También se entiende que cualquier composición o método
- 20 descrito en la presente como "que comprende" o "que consiste esencialmente en" uno o más elementos o pasos nombrados también describe la composición o método correspondiente, más limitado y de final cerrado "que consiste en" (o "consiste en") los elementos o pasos nombrados a la exclusión de cualquier otro elemento o paso. En cualquier composición o método divulgado en la presente, los equivalentes conocidos o divulgados de cualquier elemento o paso esencial nombrado se pueden sustituir por dicho elemento o paso, respectivamente.
- 30

Tal como se utiliza en la presente, el término "sujeto" o "paciente" puede ser cualquier vertebrado incluyendo, por ejemplo, un humano, primate no humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, vaca, gato, conejillo de indias o roedor. Un "paciente" se refiere a un sujeto mamífero afectado por una enfermedad, trastorno o lesión.

- 5 Tal como se utiliza en la presente, el término "fragmento proteolítico de PKCg único" significa cualquier fragmento de PKCg que incluye un epítipo que no se encuentra en otras isoformas que ocurren naturalmente de la proteína cinasa C, como la isoforma alfa de la proteína cinasa C (PKCa, PKC α) o las isoformas I o II de la proteína cinasa C beta (PKCb_i o PKCb_{ii}; PKC β _i o PKC β _{ii}). Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente se dirigen a segmentos de PKCg que no tienen segmentos correspondientes (tramos de residuos de aminoácidos consecutivos) en, por ejemplo, PKCa. Véase, a continuación, la comparación de secuencias de PKCg versus PKCa:
- 10

únicos, lo que permite la tinción diferencial de PKCg sobre otras isoformas de la proteína cinasa C. Por ejemplo, para obtener anticuerpos de acuerdo con la invención, se inmunizó un conejo blanco New Zealand con dos de estas secuencias peptídicas únicas (SEQ ID NO:35 y 36). Como se discute a continuación, los anticuerpos criados contra estos epítopes únicos reconocen (se unen a) PKCg de longitud completa, así como cada uno de los fragmentos proteolíticos de PKCg adecuados para diagnosticar una lesión en el sistema nervioso central.

Descripción breve de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de un ELISA capilar quimioluminiscente utilizado para detectar la unión de los anticuerpos anti-PKCg en muestras de sangre periférica de pacientes normales (control) versus de TBI. La figura 1 muestra el aumento significativo en la señal de TBI cuando se compara con muestras de plasma normal teñidas con anticuerpos que tienen componentes VH/VL 1H1/1K1 (PKC11), 5H1/5K1 (PKC13), o 7H1/7K3 (PKC14). Se completó un análisis de prueba T de student no pareada de 2 colas comparando media y SE de la media al límite de confianza del 95% utilizando el programa GraphPad Prism 8.

Las figuras 2A, 2B y 2C muestran los niveles (unidades de quimioluminiscencia) de PKCg en muestras de plasma teñidas con los anticuerpos anti-PKCg PKC11 (panel A), PKC13 (panel B) y PKC14 (panel C), en muestras de plasma de sujetos normales (control) versus de TBI. Los niveles de PKCg/fragmentos de PKCg muestran un aumento en el plasma de pacientes con TBI en comparación con controles normales.

La figura 3 es un análisis multiplex utilizando dos anticuerpos monoclonales, PKC11 (1H1/1K1) y PKC13 (5H1/5K1) teñiendo muestras de plasma normal versus de TBI. La figura 3 muestra el aumento en la señal de las muestras de TBI cuando se multiplexan PKC11 (barras negras) y PKC13 (barras grises).

Las figuras 4A, 4B y 4C muestran las curvas ROC de plasma normal versus de TBI teñidas con PKC11 (panel A), PCK13 (panel B) y PKC14 (panel C). El punto blanco en las figuras 4A, 4B y 4C representa el punto en el que se calculó sensibilidad y falsos positivos:

(A) Quimioluminiscencia 1137; sensibilidad de $P = 0.91$ con un falso positivo de $P = 0.4$;

(B) Quimioluminiscencia 6630; sensibilidad de $P = 0.91$ con un falso positivo de ($P = 0.58$);

(C) Quimioluminiscencia 1320; sensibilidad de $P = 0.906$ con un falso positivo de $P = 0.66$.

La figura 5 es una comparación estadística de las señales de quimioluminiscencia de las muestras normales y de TBI teñidas con PKC11 (1H1), PKC13 (5H1) y PKC14 (7H1). Con el programa GraphPad Prism 8 se completó un análisis mediante una prueba T de student no pareada de 2 colas para comparar media y SE de la media al límite de confianza del 95%.

La figura 6 muestra la distribución de PKCg y de los fragmentos proteolíticos de PKCg reconocidos por PKC13 de muestra de plasma humano normal H011 (gráfica superior) y de muestra de paciente TBI T265 (gráfica inferior).

Las figuras 7A, 7B, y 7C muestran el análisis de la Curva ROC del fragmento de PKCg de 49-52 kDa en una muestra de plasma de TBI teñida con PKC11 (panel A), o PKC13 (panel B), o PKC14 (panel C).

La figura 8 muestra el análisis multiplex de muestras de plasma de derrame cerebral versus de plasma normal teñidas con PKC11, PKC13 y PKC14. La figura 8 muestra el aumento significativo cuando se compara la señal de derrame cerebral con muestras de plasma normal teñidas con PKC11, PKC13 o PKC14. Con el programa GraphPad Prism 8 se completó un análisis mediante una prueba T de student no pareada de 2 colas para comparar media y SE de la media al límite de confianza del 95%.

Las figuras 9A, 9B y 9C muestran los niveles (unidades de quimioluminiscencia) de PKCg en muestras de plasma de derrame cerebral teñidas con PKC 11 (panel A), PKC13 (panel B) y los resultados del análisis multiplex de muestras de plasma de derrame cerebral versus normal teñidas con PKC11 y PKC13 (panel C).

Las figuras 10A, 10B y 10C ilustran un análisis estadístico que muestra los niveles de diferentes fragmentos proteolíticos de PKCg en muestras de derrame cerebral versus normal teñidas con PKC11 (panel A), PKC13 (panel B) y PKC14 (panel C). Con el programa GraphPad Prism 8 se completó un análisis mediante una prueba T de student no pareada de 2 colas para comparar media y SE de la media al límite de confianza del 95%.

La figura 11A, 11B y 11C muestra el análisis de la curva ROC del fragmento de PKCg de 49-52 kDa en muestras de pacientes con derrame cerebral teñidas con PKC11 (panel A), PKC13 (panel B) y PKC14 (panel C).

La figura 12 muestra el análisis de la curva ROC del fragmento de PKCg de 42-48 kDa en muestras de pacientes con derrame cerebral teñidas con PKC13.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención se refiere a tres anticuerpos anti-PKCg y su uso en un método *in vitro* para diagnosticar de una lesión que involucra al sistema nervioso central (CNS).

5 La presente invención describe un método rápido y preciso para detectar daño en el sistema nervioso central ocasionado por un evento traumático o isquémico. En particular, la presente invención se dirige a un novedoso método *in vitro* para diagnosticar una lesión cerebral traumática (TBI) o un derrame cerebral. Los eventos traumáticos en el sistema nervioso central, como TBI o derrame cerebral, provocan alteraciones bioquímicas derivadas del daño celular. Estas alteraciones bioquímicas incluyen la aparición en el torrente sanguíneo de biomarcadores que son indicativos de un evento isquémico que involucra al cerebro, cuyos biomarcadores se
10 pueden detectar y cuantificar como indicadores confiables de un episodio isquémico en el sistema nervioso central.

15 La diana diagnóstica del método de la presente invención es la isoenzima gamma de la proteína cinasa C (PKCγ o PKCg), que está confinada en el sistema nervioso central bajo condiciones normales, pero que aparece fuera de la barrera hematoencefálica después de una lesión en el CNS, como después de una TBI o un derrame cerebral. Además, el entorno excitotóxico intersticial del CNS resultante de una lesión en el CNS ocasiona que PKCg de longitud completa se descomponga en uno o más fragmentos proteolíticos que también aparecen en la sangre periférica de un individuo que sufre una lesión en el CNS. Tal PKCg periférica y fragmentos proteolíticos de PKCg son detectables en una muestra de sangre una vez que la barrera hematoencefálica se afloja, proporcionando un indicador potencial de diagnóstico de lesiones en el CNS,
20 incluyendo TBI y derrame cerebral, si los fragmentos de PKCg se pueden detectar preferentemente y distinguirse de otras isoformas de la proteína cinasa C. La presente invención demuestra que dicho método de diagnóstico sensible es posible y proporciona materiales y métodos específicos para realizar determinaciones completamente precisas de lesión en el CNS a partir del análisis de sangre periférica *in vitro* de un sujeto sospechoso de haber sufrido una lesión en el CNS.

25 Por consiguiente, la detección de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg en una muestra de sangre periférica es un indicador de diagnóstico temprano de un evento traumático o isquémico que involucra al sistema nervioso central, lo que hace posible la detección temprana y el tratamiento temprano. Además, ventajosamente, la cantidad de PKCg y de fragmentos proteolíticos detectados en la sangre venosa de un individuo que ha sufrido una TBI o un derrame cerebral es proporcional al grado de daño al tejido y, por lo tanto,
30 un ensayo para cuantificar los niveles de PKCg/fragmentos de PKCg en una muestra de sangre periférica como se describe en la presente es indicativo de la extensión del traumatismo sufrido en el sistema nervioso central.

A medida que PKCg/fragmentos proteolíticos de PKCg entran en el torrente sanguíneo como resultado de un evento isquémico, el método *in vitro* de la presente invención es particularmente ventajoso en el sentido de que proporciona un diagnóstico rápido y confiable de TBI o derrame cerebral, particularmente dentro del periodo de tiempo crítico en el que la detección temprana y el tratamiento del daño del CNS pueden prevenir daño permanente. Como tal, preferiblemente la muestra de sangre se extrae del sujeto sospechoso de haber sufrido una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral inmediatamente después del evento isquémico o tan pronto como sea posible después de este, preferiblemente dentro de las 6 a 24 horas del momento de la lesión en el CNS, más preferiblemente dentro de las 6-16 horas del momento de la lesión en el CNS.

40 El presente método puede emplear cualquier técnica que sea conocida en la técnica para detectar/cuantificar la presencia de una proteína en una muestra biológica. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo tipo sándwich capaz de detectar la presencia de PKCg y uno o más fragmentos proteolíticos de PKCg en una muestra de sangre. De acuerdo con el método, una muestra biológica de un paciente sospechoso de haber sufrido una lesión en el CNS se carga en un recipiente de detección que separa e inmoviliza la proteína PKCg diana y uno
45 o más de sus fragmentos proteolíticos. A continuación, las proteínas/polipéptidos diana inmovilizados se ponen en contacto con un primer anticuerpo anti-PKCg (primario) criado contra un epítipo único en la proteína PKCg bajo condiciones que faciliten la formación del complejo de unión PKCg/anticuerpo primario. Se puede emplear un paso de lavado subsecuente para eliminar cualquier proteína/anticuerpo no unido del resto de la mezcla de la muestra. A continuación, se pone en contacto un anticuerpo secundario etiquetado detectablemente, por ejemplo, conjugado con una etiqueta fluorescente, capaz de unirse al anticuerpo primario, con el complejo
50 diana/anticuerpo primario y se detecta la etiqueta detectable (por ejemplo, señal fluorescente) y se calcula la cantidad de PKCg y/o fragmento(s) proteolítico(s) de PKCg presente(s) en la muestra.

Cualquier método *in vitro* conocido en la técnica para detectar la presencia de una proteína en una muestra se puede emplear en el presente método para diagnosticar TBI o derrame cerebral. Preferiblemente, PKCg se
55 detecta en una muestra de sangre de un sujeto mamífero poniendo en contacto la muestra con un compañero de unión para PKCg, es decir, un péptido, una inmunoglobulina, una molécula pequeña u otra fracción capaz de formar un complejo de asociación con PKCg. Más preferiblemente, la PKCg en una muestra se detecta utilizando los anticuerpos monoclonales anti-PKCg como se describe en la presente para formar un complejo de unión PKCg/anticuerpo anti-PKCg. La detección y cuantificación del complejo de unión PKCg/anticuerpo anti-PKCg también se puede realizar mediante métodos bien conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopia de masas por cromatografía de gases, cromatografía de capa fina, cromatografía de
60

hidroxiapatita, cromatografía líquida de alta presión, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, etc. Preferiblemente, la muestra de sangre se analiza mediante un ensayo de fluorescencia o el método de ensayo capilar quimioluminiscente descrito a continuación.

5 En otra realización, la presente invención está dirigida a un kit de ensayo del punto de atención para diagnosticar una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral a partir de la muestra de sangre de un sujeto sospechoso de sufrir dicha lesión en el CNS. El kit de ensayo del punto de atención incluirá todos los materiales necesarios para un inmunoensayo rápido para el diagnóstico de TBI o derrame cerebral de acuerdo con el método de la presente invención. Los materiales incluyen reactivos, recipientes, un lector portátil con conexión inalámbrica a un ordenador para la descarga rápida de la información del paciente, instrumentos y/o
10 instrucciones necesarias para realizar el método. Un kit de ensayo del punto de atención es particularmente adecuado para uso por el personal médico de urgencia para clasificar rápidamente a un paciente en función de un diagnóstico definitivo de un evento isquémico como TBI o derrame cerebral.

A continuación, se exponen ejemplos que ilustran los métodos de diagnóstico de la presente invención. Los ejemplos se proporcionan para demostrar métodos y reactivos útiles para practicar la invención y se pretende que ilustren la invención sin limitar el alcance de la invención. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de la habilidad en la técnica, los practicantes van a apreciar que numerosos cambios, modificaciones y alteraciones se pueden emplear sin apartarse del alcance de la materia actualmente divulgada.
15

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de anticuerpos monoclonales anti-PKCg en conejos

20 Los anticuerpos monoclonales contra PKCg se generaron en conejos blancos New Zealand. Se inmunizó un conejo blanco New Zealand con un polipéptido de 303 aminoácidos que comprende los aminoácidos 395-697 de PKCg:

```

CTLVEKRVLALGGRGPGGRPHEFLTQLHSTFQTPDRLYFVMEYVTGGDLMYHIQQLGKFKEPHAA
FYAAEIAIGLEFLHNQGI IYRDLKLDNVMLDAEGHEKITDFGMCKENVVFPGTTTRTFCTGTPDYI
APEI IAYQPYGKSVDWWSFGVLLYEMLAGQPPFDGEDEEELFQAIMEQTVTYPKSLSREAVAIC
KGFLLTKHFGKRLGSGFDGEP TIRAHGFFRWIDWERLERLEIPPPFRFRPCGRSGENFDKFFTRA
APALTPPDRLVLASIDQADFQGFYVNPDFVHPDARSPTSFPVPVPM (SEQ ID NO:38).
    
```

25 Un segundo conejo blanco New Zealand fue inmunizado con dos péptidos más cortos que tienen secuencias únicas del dominio catalítico C3/C4 de PKCg que comprende los aminoácidos 405-414 (Péptido #1) que comprende la secuencia de aminoácidos: LGGRGPGGRP (SEQ ID NO:35), y los aminoácidos 673-697 (Péptido #2) que comprende la secuencia de aminoácidos: FTYVNPDFVHPDARSPTSFPVPVPM (SEQ ID NO:36). Los péptidos #1 y #2 se sintetizaron con un residuo de cisteína N-terminal que se utilizó como un sitio reactivo para unir los péptidos plurales a una proteína portadora de hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH).
30

Las inmunizaciones de ambos conejos siguieron un protocolo estándar de 78 días (anticuerpos de ImmunoPrecise, Ltd, Victoria Vancouver Canada) de la siguiente manera: Día 0: recolecta de suero control/Sangrado pre inmune; Día 1: inyección primaria para inmunizar con 0.25 mg de antígeno en adyuvante completo de Freund; Día 14: Refuerzo con 0.1 mg de antígeno en adyuvante incompleto de Freund; Día 28:
35 Recolecta de suero (25 ml por conejo); Día 42: Segundo refuerzo con 0.10 mg de antígeno en adyuvante incompleto de Freund; Día 56: segunda recolecta de suero (25 ml por conejo) y tercer refuerzo con 0.10 mg de antígeno en adyuvante incompleto de Freund; Día 72: recolecta de suero de 50 ml por conejo; Día 78: Titulación por ELISA para verificar la concentración de anticuerpo en los conejos.

40 Antes de la inyección, cada péptido (antígeno) se mezcló 1:1 en adyuvante completo de Freund (CFA) para la inmunización primaria. Las inyecciones de refuerzo posteriores (descritas anteriormente en el protocolo de 78 días) se realizaron en una mezcla 1:1 de antígeno en adyuvante incompleto de Freund (ICFA). La mezcla de péptido y adyuvante se dividió en 4 porciones iguales y se inyectó por vía subcutánea en cuatro puntos de los cuartos delanteros y traseros de cada conejo.

45 Se realizaron sangrados de prueba en el Día 28, Día 56 y Día 72 para cada conejo y se analizó el suero mediante ELISA indirecto. Se determinó que los títulos de ambos conejos eran adecuados para los procedimientos de prueba de anticuerpos monoclonales de conejo. Ambos conejos mostraron títulos similares en ELISA indirecto. El ELISA indirecto utiliza ambos tipos de anticuerpos para amplificar las señales para mejorar la detección. La técnica de ELISA indirecto se realizó de la siguiente manera: placas de 96 pocillos se incubaron con antígenos y se lavaron para bloquear la unión no específica. Se añadieron anticuerpos primarios

y se lavaron. Se añadió anticuerpo secundario ligado a enzima y se lavó. El anticuerpo indirecto está ligado enzimáticamente a un punto final colorimétrico que permite la cuantificación del anticuerpo unido a la placa utilizando un espectrómetro.

5 Se extrajeron aproximadamente 30 ml de sangre total heparinizada en cada recolecta de suero descrita anteriormente de cada conejo y se agruparon para el cultivo de células B. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre total de cada conejo y los sobrenadantes se cultivaron en placas de 40x96 pocillos y se cribaron mediante ELISA indirecto frente a PKC γ en el día 9. Los pocillos positivos para antígeno se conservaron en amortiguador de lisis de ARN Invitrogen (ThermoFisher) y se almacenaron a -80°C.

10 Se sintetizó ADNc a partir de muestras individuales de ARN y se realizaron 2 rondas de PCR para preparar el ADNc de la región variable del anticuerpo para clonación. Los ADNc de la cadena pesada de IgG de conejo y ADNc de la cadena ligera kappa de IgG de conejo se clonaron en vectores de expresión de mamífero. Las construcciones de expresión se co-transfectaron en células HEK 293 y los sobrenadantes de cultivos celulares se analizaron mediante ELISA en sándwich. Los sobrenadantes de cultivos celulares transfectados se sometieron adicionalmente a pruebas utilizando el inmunoensayo de impresión multiantígeno, MAPIA (Lyashchenko et al., J. Immunol. Methods, 242(1-2): 91-100 (2000)).

15 La clonación de los 28 positivos mejor clasificados siguió a la Fase III de clonación. Se analizaron adicionalmente 22 clones, cada uno en 1.5 ml de sobrenadante transfectado. Se seleccionaron cinco clones para la expresión/purificación a escala de 50 ml (véase la Tabla 1) utilizando la técnica inmunoensayo de impresión multiantígeno (MAPIA) de ChemBio Diagnostic Systems, en la que los sobrenadantes de cultivos celulares se inmovilizan en membranas de nitrocelulosa, seguido por la detección de anticuerpos utilizando inmunodesarrollo cromogénico estándar.

Tabla 1. Cinco mejores clones seleccionados y rendimiento de la expresión/purificación a escala de 50 mL

	Clon (HC)	Clones (κC)	Número de lote	Conc. (mg/ml)	Cantidad (mg)
1	1H1	1K1	1777	1.6	3.3
2	4H1	4K1	1778	1.7	0.7
3	7H1	7K3	1779	1.4	3.2
4	20H1	20K3	1780	1.9	1.4
5	5H1	5K1	1781	1.5	4.6

Se determinaron las secuencias de ADN de los cinco clones de la Tabla 1.

25 Análisis de la secuencia de ADN de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos IgG de conejo

30 La cadena pesada de IgG de conejo fue aislada y secuenciada y tiene aproximadamente 1200 pb. La cadena ligera kappa de conejo fue aislada y secuenciada y tiene aproximadamente 700 pb. Se determinó que todas las secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera de cada clon en la Tabla 1 (1H1/1K1, 4H1/4K1, 7H1/7K3, 20H1/20K3 y 5H1/5K1) tienen secuencias diferentes dentro de la región variable. Las secuencias de aminoácidos de la región variable para los cinco clones codificados por los ADN aislados se exponen a continuación en la Tabla 2. Las tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) y las tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3) de cada clon están subrayadas en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos del dominio variable para anticuerpos anti-PKC γ de conejo

Clones VH y VL	Dominio variable	SEQ ID NO.	secuencias de aminoácidos 1234567890123456789012345678901234567890
1H1	VH	21	METGLRWLLLVAVLKGVCQSVESGGRLVTPGTPLALTC TVSGFSLNYYAMNWVRQAPVKGLEWIGVITSDTTYASWA KGRFTISKTSSTVELQITSPTEEDTATYFCASGGSTTSPA <u>LWGQGT</u> LVTVSS

ES 2 983 014 T3

1K1	VL	22	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTPSPVSAAVGST VTINCOASQSVWSKXNLSWFQQKPGQPPKQLIYSASTLAS GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCRS <u>ADCWTFGGGTEVVVK</u>
4H1	VH	23	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVVEESGGRVLTPTGTPLTLC TVSGFSLSLSRNAVSWVRQAPGKGLEWIGIIFGDAKTYA SWAKGRFTISKTTATTVDLKITSLTEDTATYFCVAGTGLW GQGTLVTVSS
4K1	VL	24	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTPSPVSAAVGST VTINCOASQSVYNKNRLSWYQKPGQPPKRLIYSSSTLDS GVPLRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGSYDCSS <u>ADCNAFGGGTEVVVK</u>
7H1	VH	25	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVLEESGGDLVQPGASLTLC TASGFTLTYWICWVRQAPGKGLEWVACILTGSGSTYYAS WVNGRFTISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCARYGGDA <u>TYNENLWGQGTLVTVSS</u>
7K3	VL	26	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTPSSVSAAVGGT VTINCOASQSVYNNRLSWYQKPGQPPKRLIYGVSTLYY GVSSRFKSGSGTQFTLTISGMQCDDAAIYYCLGGYDCAS <u>ADCYAFGGGTEVVVK</u>
20H1	VH	30	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVVEESGGRLVTPGTPLTLC TVSGIDLSSNAMNVRQAPGKGLEWIGIIGFSGSTINYASW AKGRFTISKTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGGLNIGM <u>NLWGQGTLVTVSS</u>
20K3	VL	31	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GATFAQVLTQTPSPVSAAVGGT VPI SCQSSQSVYDNNWLAWYQKPGQPPKLLVYYASTLAS GVPSRFKSGSGTQFTLTINDLECDDAATYYCAGGYGDTN <u>GGASSFGGGTEVVVK</u>
5H1	VH	32	METGLRWLLLGAVLKGVQCQEQLKESGGGLVTPGGTTLT CTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIISGGSAYYAT WAKGRFTISKTSSTTVDLSTISPTTEDTATYFCARAKSGTY <u>IGDYFTLWGQGTLVTVSS</u>
5K1	VL	33	<u>MDTRAPTQLLGLLLLWLP</u> GARCAFELTQTPASVEAAVGGT VTIKCQASESIGNALAWYQKPGQPPKLLIYRASTLES PSPRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQSYVGSRTG <u>YNVFGGGTEVVVK</u>

Los datos de la secuencia indican que todos los clones de anticuerpos recuperados tienen diferentes secuencias en la región variable, lo que sugiere que todos los anticuerpos monoclonales de conejo recuperados se unen a diferentes epítopes de la proteína PKCg.

5 Clonación, expresión y purificación de cinco anticuerpos monoclonales

El ADN de la cadena pesada de IgG de conejo para cada clon y el ADN de la cadena ligera kappa de conejo para cada clon se clonaron por separado en un vector de expresión CMV. Los linfocitos se fusionaron con células de mieloma de conejo (240E-W) en presencia de polietilenglicol. Los clones de hibridoma resultantes se cultivaron en medio de cultivo tisular hasta alcanzar la mitad del crecimiento log (métodos patentados de ImmunoPrecise). Los hibridomas fueron isotipados para IgG, IgM e IgA; los clones elegidos expresaban el isotipo IgG. Los clones se sondearon frente a PRKCG recombinante de Proteintech (catálogo ag5910) utilizando un inmunoensayo de impresión multiantígeno (MAPIA) desarrollado por Chembio Diagnostic Systems Inc. (Lyashchenko et al., J. Immunol. Methods, 242(1-2): 91-100 (2000)). Se probó la actividad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-PKCg fabricados a partir de las cadenas pesadas y ligeras clonadas, y se seleccionaron tres mAbs anti-PKCg de alta afinidad, designados PKC11 (1H1/1K1), PKC13 (5H1/5K1) y PKC14 (7H1/7K3), respectivamente, para pruebas posteriores.

Ejemplo 2. Análisis de la unión del anticuerpo monoclonal anti-PKCg a fragmentos proteolíticos de PKCg en el diagnóstico de TBI a partir de muestras de plasma humano

Los tres anticuerpos monoclonales de conejo seleccionados mencionados anteriormente, PKC11, PKC13 y PKC14 se utilizaron para detectar la presencia de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg en muestras de sangre obtenidas de pacientes con TBI o derrame cerebral. Los resultados descritos a continuación demuestran que los tres anticuerpos monoclonales de conejo muestran patrones de tinción únicos para las muestras clínicas de plasma humano normal (control) versus plasma de pacientes con TBI o derrame cerebral. Con la finalidad de cuantificar los diferentes perfiles de tinción de fragmentos para cada anticuerpo y los efectos observados para muestras de plasma clínico normal versus muestras de TBI, se graficó la señal de quimioluminiscencia específica compuesta para cada muestra teñida (complejada) con los anticuerpos monoclonales. Se utilizó un inmunoensayo de quimioluminiscencia por electroforesis capilar (Raybiotech, Norcross, GA) para generar los niveles de señal para una cohorte de 33 muestras de plasma de TBI y 12 muestras de plasma de control humano normal.

Análisis de datos de unión de anticuerpo/PKCg mediante curvas características operativas del receptor (ROC)

Para el presente análisis de comparación de los perfiles de unión de PKCg/fragmentos proteolíticos de PKCg para los tres anticuerpos monoclonales con el plasma de pacientes con TBI y derrame cerebral versus plasma de sujetos normales (control), las curvas ROC compararon las probabilidades de traslapar entre las muestras de sensibilidad y falso positivo (1-Especificidad) en las cohortes clínicas descritas anteriormente. Para este propósito, sensibilidad se describió como la probabilidad (P) de que un resultado positivo de la prueba traslape con una enfermedad positiva (TBI o derrame cerebral) [$P(\text{Prueba} + | \text{Enfermedad} +)$]. Pruebas similares para los falsos positivos, utilizamos la [$P(\text{Prueba} + | \text{Enfermedad} -)$], una condición en la que hay una prueba positiva cuando no hay enfermedad. Se utilizó una aplicación de tabla dinámica en Excel para contar el número de muestras sanas versus de enfermedad. La sensibilidad se calculó utilizando ($=\text{SUM de muestras de enfermedad individuales} / \text{total de todas las muestras de enfermedad}$). Los falsos positivos se calcularon utilizando la ($=\text{SUM de cada muestra individual sana} / \text{total de todas las muestras sanas}$). La especificidad se define como (1-Falsos Positivos). Este método estadístico maximiza la sensibilidad e identifica la probabilidad de falsos positivos. Se calculó el punto de corte de cada curva ROC entre las muestras sanas y enfermas y posteriormente se relacionó a la señal de quimioluminiscencia total que representan esas probabilidades. El punto de corte para cada cohorte de muestras teñidas con los anticuerpos PKC11, PKC13 y PKC14 está representado por una línea en cada gráfica a continuación.

Análisis de muestras normales y de TBI mediante ELISA capilar quimioluminiscente

Todas las muestras de plasma normal y de TBI se cribaron con cada uno de los tres anticuerpos monoclonales anti-PKCg para la presencia de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg mediante un ensayo de ELISA capilar quimioluminiscente. Ventajosamente, el ELISA capilar quimioluminiscente que utiliza los anticuerpos de detección de PKCg y de fragmentos de PKCg como inmunosondas de acuerdo con la presente divulgación, proporciona un método altamente sensible para detectar la presencia de PKCg y/o fragmentos proteolíticos de PKCg presentes en una muestra de sangre venosa de un individuo después de una posible lesión cerebral traumática o un derrame cerebral.

Análisis de muestras de TBI

Brevemente, para llevar a cabo el ELISA capilar quimioluminiscente en este ejemplo, se cargaron reactivos y plasma individual de muestras clínicas normales versus de TBI en una máquina de inmunotransferencia automatizada (utilizando el servicio Auto-Western de RayBiotech Life, Inc). En el primer paso, la muestra se carga automáticamente en el capilar. A continuación, las proteínas se separan por tamaño a medida que migran electroforéticamente a través de una matriz de apilamiento y separación. A continuación, las proteínas separadas se inmovilizan en la pared capilar mediante una química de captura fotoactivada patentada. Las proteínas diana, es decir, PKCg y/o fragmentos proteolíticos de PKCg se identificaron utilizando un anticuerpo primario, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de conejo descritos en la presente, e inmunosondeados con un anticuerpo IgG secundario anti-conejo de cabra conjugado con HRP y sustrato quimioluminiscente. Se produce un electroferograma que traza la línea de base, el peso molecular y la señal de quimioluminiscencia cuantitativa de cada pico. Se derivó la señal cuantitativa para cada banda de peso molecular en cada electroferograma. Cada señal cuantitativa de quimioluminiscencia se generó utilizando la siguiente fórmula; $(C2 - C1 / C1)$, donde C2 es igual al área bajo la curva y C1 es igual a la línea de base para esa muestra. Esta medida específica de quimioluminiscencia se utilizó en comparaciones de todo el plasma humano normal comparado con muestras de plasma de TBI o derrame cerebral después de la tinción con anticuerpos, es decir, PKC11, PKC13 o PKC14. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 8. La señal de quimioluminiscencia específica resultante se detectó y cuantificó, con una sensibilidad en el intervalo de picogramos/ml, proporcionando una medida directa de los biomarcadores de TBI, es decir, PKCg, y/o fragmentos proteolíticos de PKCg.

- Se analizó un total de 201 muestras de plasma humano utilizando la tecnología de inmunotransferencia automatizada. Se tiñeron muestras de plasma humano normal (contactadas) con PKC11 (n=13), PKC13 (n=13) y PKC14 (n=14). Se analizó un mínimo de 13 muestras individuales de plasma humano normal con cada anticuerpo monoclonal de conejo. Teniendo en cuenta las medidas repetidas de las comparaciones en cinco
- 5 fechas distintas, se analizó un total de 56 muestras de plasma humano normal mediante el ensayo de ELISA capilar. El plasma de pacientes con TBI también se analizó frente a (en contacto con) PKC11 (n=34), PKC13 (n=33) y PKC14 (n=33). Se analizó un mínimo de 33 muestras individuales para cada anticuerpo monoclonal de conejo y combinaciones de anticuerpos monoclonales. Un total de 145 muestras de plasma de TBI de 5 fechas distintas se corrieron y correlacionaron.
- 10 Todas las comparaciones estadísticas se corrieron utilizando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Se compararon las señales de quimioluminiscencia de una cohorte de muestras normales versus una cohorte de TBI. Se corrió una prueba T de Student no apareada de 2 colas asumiendo una distribución paramétrica. Se utilizó una corrección de Welch para probar la igualdad de SD de ambas
- 15 muestras. Los valores P son significativos a $P < 0.05$. La media y el error estándar de la media se calcularon al nivel de confianza de 95%.
- Comparación de la señal compuesta de muestras de plasma de TBI versus normales teñidas con mAbs anti-PKCg PKC11, PKC13 y PKC14
- Se utilizó un análisis de inmunotransferencia capilar quimioluminiscente (RayBiotech, GA) para caracterizar la señal de PKCg en muestras teñidas con PKC11, PKC13 y PKC14 de plasma humano normal versus plasma
- 20 de lesión cerebral traumática. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando una prueba T de Student no pareada de 2 colas al límite de confianza del 95%. Para cada uno de los tres anticuerpos monoclonales de conejo probados hubo una señal de quimioluminiscencia significativamente mayor para las muestras de plasma de TBI en comparación con las muestras de plasma normal. Los resultados se muestran en la figura 1.
- Como se observa en la figura 1, los patrones de tinción de las muestras individuales (normal versus TBI) son
- 25 únicos con los diferentes anticuerpos monoclonales de conejo PKC11, PKC13, y PKC14 y para cada anticuerpo, las señales son más altas en las muestras de plasma de TBI versus las muestras de plasma normal.
- En la figura 2 se muestran los patrones de tinción para muestras individuales sondeadas con los mAbs anti-PKCg. Se compararon muestras de plasma humano normal (n=13 individuos) con muestras de lesión cerebral traumática (n=34 individuos), teñidas con anticuerpos PKC11 (panel A), PKC13 (panel B) y PKC14 (panel C).
- 30 Los patrones de tinción con PKC11, PKC13 y PKC14 son únicos. Los picos altos en las muestras de PKC11 de TBI (T) incluyen T130, T223, T247 versus los picos de PKC13 a T220, T233, T240, T265, T266, T293, T305 y los picos de PKC14 a T079, T209, T258. Se realizó un diagnóstico positivo de TBI para PKC11 en 91% de las muestras (30/33 muestras de TBI por encima del fondo), 91% de las muestras para PKC13 (31/34 muestras de TBI positivas,) y 91% de las muestras para PKC14 (30/33 muestras de TBI positivas).
- 35 Análisis multiplex de muestras de TBI
- Como se demuestra a continuación, se descubrió que mediante la combinación (también denominada en la presente como "multiplexación") de los resultados de la unión quimioluminiscente de dos anticuerpos monoclonales para PKCg produce una mejora notable en la precisión y confiabilidad del diagnóstico de TBI. Los resultados de la multiplexación de los resultados de unión de PKCg de los anticuerpos PKC11 y PKC13
- 40 para las muestras de TBI se muestran en la Figura 3 con PKC11 mostrado como líneas verticales negras y PKC13 mostrado como líneas verticales grises.
- PKC11 y PKC13 fueron multiplexados para determinar los efectos resultantes en un diagnóstico positivo de TBI. La combinación de los resultados quimioluminiscentes para PKC11 y PKC13 mejoró el diagnóstico positivo para TBI del 91% cuando los anticuerpos se evaluaron individualmente, al 100% positivo para TBI para los anticuerpos combinados (34/34 muestras TBI(+)) en o por encima de la línea de fondo). La multiplexación con
- 45 PKC14 no mejoró aún más (100% de precisión) este diagnóstico (datos no mostrados).
- Las tinciones de los anticuerpos PKC11 y PKC13 del plasma humano normal versus muestras de plasma de TBI se graficaron simultáneamente ilustrando las diferencias en la tinción entre los dos anticuerpos. Para algunas muestras, por ejemplo, T022, T130 y T223, la señal de quimioluminiscencia de mAb PKC11 superó la
- 50 señal de mAb PKC13; pero para las muestras de TBI T265 y T266, se observó una señal muy alta, en comparación con una señal baja para las mismas muestras teñidas con mAb PKC11. El punto de corte horizontal (línea) en la figura 3 es de 1137 unidades de quimioluminiscencia derivadas del análisis de ajuste de la curva ROC de los anticuerpos multiplexados PKC11 + PKC13. Cualquier señal superior a este nivel representa una muestra predicha TBI(+) basada en la detección de la unión del anticuerpo a la diana PKCg y a biomarcadores diana de fragmento proteolítico de PKCg. La adición de mAb PKC14 al multiplex de mAb
- 55 PKC11 y mAb PKC13 no mejoró el análisis de la curva ROC ni el diagnóstico de las muestras positivas para TBI (datos no mostrados).

Análisis de muestras de plasma normal versus de TBI teñidas con mAbs anti-PKCg

Las muestras de plasma de pacientes normales y de TBI se teñieron con los anticuerpos monoclonales PKC11, PKC13 o PKC14 y se analizaron para detectar la presencia de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg mediante el ensayo de quimioluminiscencia descrito anteriormente. En las figuras 4A-4C se muestran los resultados de la curva ROC para las muestras de plasma normal versus de TBI. Se corrieron diversos subconjuntos de muestras normales versus de TBI, lo que generó algunas medidas repetidas que hicieron que el recuento final fuera de 145 muestras de TBI analizadas.

Los resultados mostrados en la Figura 4 demuestran que los tres anticuerpos alcanzaron una sensibilidad superior al 91% con diferentes especificidades y falsos positivos. PKC11 (panel A) tuvo sensibilidad del 91%, especificidad del 58% y 42% de falsos positivos. PKC13 (panel B) mostró sensibilidad del 91%, especificidad del 42% y los falsos positivos más elevados en 58%. PKC14 (panel C) mostró una sensibilidad del 94%, especificidad del 70% y falsos positivos en 30%.

La consecuencia a un paciente que muestra una probabilidad falsa positiva es que el paciente necesitaría someterse a una extracción de sangre adicional y a una nueva prueba del ensayo de PKCg para confirmar los niveles de PKCg en la muestra. Este es un factor significativo en un contexto de diagnóstico en el que el tiempo es esencial para prescribir un tratamiento eficaz que atenúe el efecto de las lesiones en el CNS. Con una indicación adicional de niveles de PKCg superiores a los normales, el paciente se sometería a pruebas radiológicas neurológicas e intervencionistas para identificar preocupaciones clínicas adicionales para el paciente. El beneficio clínico de un diagnóstico rápido y preciso de TBI se pierde si la incidencia y probabilidad de falsos positivos son elevadas. Esto hace que los ensayos de diagnóstico de TBI con sensibilidad mejorada sean muy deseables.

Detección de PKCg/fragmentos proteolíticos de PKCg mediante anticuerpos PKC11, PKC13 y PKC14

Se realizó una comparación estadística de las señales quimioluminiscentes de muestras normales y de TBI teñidas con PKC 11, PKC13 y PKC14. Los resultados se muestran en la Figura 5. La comparación estadística es una prueba T de Student no pareada de dos colas (GraphPad Prism 8). Las gráficas en la figura 5 representan la media y el SE de la media; * representa significancia al nivel de confianza del 95% y se enlistan los valores p para medidas significativas. Como se observa en la Figura 5, cada anticuerpo monoclonal muestra un patrón de tinción único para el plasma normal y de TBI. El fragmento de 49-52 kDa de PKCg es prevalente para los tres anticuerpos, lo que mejora el diagnóstico de TBI(+). Los tres anticuerpos muestran detección de niveles significativamente más altos del fragmento de 49-52 kDa en muestras de TBI en comparación con plasma normal.

El anticuerpo PKC11 muestra un aumento significativo en la señal para plasma de TBI comparado con plasma normal para el fragmento de 49-52 kDa, y PKC11 muestra la señal más alta para PKCg de longitud completa (63-73 kDa) en plasma de TBI comparado contra muestras de plasma normal.

El anticuerpo PKC13 muestra la mayor respuesta de señal para unir dianas PKCg/fragmentos de PKCg. PKC13 presenta un aumento significativo de la señal para los fragmentos de 42-48 kDa, 49-52 kDa y 53-60 kDa, lo que mejora el diagnóstico de TBI(+).

El anticuerpo PKC14 presenta un aumento significativo de la señal para la detección del fragmento de 49-52 kDa. La señal más alta fue para el fragmento de 53-60 kDa, pero la señal para el fragmento de 42-48 kDa no fue significativamente diferente para las muestras normales versus de TBI.

Comparación de las bandas teñidas con anticuerpos en muestras de plasma normal versus de TBI

La Figura 6 muestra una distribución diferencial típica de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg reconocidos por PKC13 en una muestra de plasma humano normal (H011) (panel superior) en comparación con una muestra de plasma de un paciente TBI (T265) (panel inferior).

Los resultados de la figura 6 demuestran que en muestras de plasma humano normal la presencia del fragmento de 49-52 kDa es extremadamente rara. Por el contrario, PKC13 detecta el fragmento de 49-52 kDa en altos niveles en el plasma de TBI, mejorando así la capacidad de realizar un diagnóstico TBI(+).

Curvas características operativas del receptor (ROC) del fragmento de 49-52KD teñido con PKC11, PKC13, y PKC14

Se generaron curvas ROC para el fragmento de PKCg de 49-52 kDa teñido con anticuerpos monoclonales de conejo PKC11 (A), PKC13 (B) y PKC14 (C). Los resultados se muestran en las figuras 7A, 7B y 7C.

Los círculos negros de la Figura 7 representan muestras de plasma de TBI. Los círculos blancos representan la sensibilidad máxima sin falsos positivos. Los círculos grises representan falsos positivos, es decir, muestras de plasma normal con una respuesta positiva para el fragmento de PKCg de 49-52 kDa.

En la Figura 7A, la Curva ROC de muestras teñidas con PKC11 que tienen una señal de quimioluminiscencia igual o superior a 710 unidades (círculo blanco) son positivas para TBI. No hay falsos positivos hasta este punto (sensibilidad de $P=0.64$, falsos positivos $P=0.0$, y especificidad de $P=1.0$), sin embargo, a una señal de 630 unidades de quimioluminiscencia hay un falso positivo. Esta es la única muestra de plasma humano normal (o no-TBI) que tiñe positivo para el fragmento de PKCg de 49-52 kDa bajo estas condiciones. Pruebas adicionales pueden mostrar que esta muestra es de hecho una muestra positiva para lesión en el CNS. Esto haría que la sensibilidad fuera superior a $P=0.9$, como en las curvas B y C.

La Figura 7B representa la tinción con PKC13 del fragmento de PKCg de 49-52 kDa para plasma humano normal comparado con plasma de TBI. El círculo blanco identifica el punto en el que una muestra emite una señal igual o superior a 658 unidades de quimioluminiscencia y es una muestra TBI(+). La sensibilidad en este punto es $P=0.95$, especificidad es $P=1.0$ y falsos positivos en $P=0.0$. Sólo hay una muestra positiva para TBI identificada a una señal inferior a las 2 muestras de plasma humano normal. Se identificaron dos falsos positivos en muestras de plasma normal (círculos grises) a 582 y 579 unidades de quimioluminiscencia. La sensibilidad correspondiente es $P=0.95$, mientras que los falsos positivos alcanzan una probabilidad de $P=0.5$ y $P=1.0$ para estos 2 puntos.

La Figura 7C representa la tinción con PKC14 del fragmento de PKCg de 49-52 kDa para plasma humano normal comparado con plasma de TBI. El círculo blanco identifica una señal de muestra de 299 unidades de quimioluminiscencia; cualquier muestra con una señal igual o superior a ésta se identifica como positiva para TBI. En este punto la sensibilidad es $P=0.92$, con falsos positivos $P=0$ y especificidad $P=1.0$. Hay tres muestras falsas positivas con señales de quimioluminiscencia más bajas (círculos grises) y una muestra TBI(+) adicional. Para estos puntos adicionales, la sensibilidad sube hasta $P=1.0$ y los falsos positivos aumentan a una probabilidad de $P=0.33$.

Conclusiones para TBI

Los datos presentados anteriormente demuestran que el novedoso método *in vitro* de la presente invención proporciona una herramienta sencilla, rápida y confiable para diagnosticar una lesión cerebral traumática a partir de una muestra de sangre venosa. Utilizando un ensayo estándar, como el ensayo de quimioluminiscencia capilar descrito anteriormente, se ha demostrado que los tres anticuerpos monoclonales de conejo descritos anteriormente, PKC11, PKC13 y PKC14, reconocen epítopes únicos en los biomarcadores PKCg/fragmentos proteolíticos de PKCg para lesiones en el CNS, y cada anticuerpo muestra un patrón de tinción único para estos biomarcadores y, por lo tanto, cuando se utilizan individualmente o en combinación, proporcionan una herramienta de diagnóstico confiable para determinar la aparición y gravedad de una lesión cerebral traumática.

Los resultados también demuestran que el fragmento de 49-52 kDa se encuentra normalmente sólo en muestras TBI(+) y como tal la PKCg o el fragmento PKCg mejora el diagnóstico de TBI en sujetos analizados de acuerdo con el método de la invención. La sensibilidad del fragmento de 49-52 kDa analizada mediante curvas ROC es superior a la probabilidad $P=.91$ para los tres anticuerpos monoclonales estudiados, lo que lo convierte en un amplificador ideal del diagnóstico de TBI clínica.

Los fragmentos adicionales, como los de 33-36 kDa, 42-48 kDa, 53-60 kDa tienen una sensibilidad menor que el fragmento de 49-52 kDa mediante el análisis ROC ($P=<0.9$) con las correspondientes probabilidades elevadas de falsos positivos. Por lo tanto, estos fragmentos adicionales mejoran el diagnóstico de TBI en menor grado en muestras teñidas con los tres anticuerpos monoclonales, pero siguen proporcionando un indicador útil y confiable de TBI. Además, la combinación de dos cualesquiera de los anticuerpos anti-PKCg que reconocen uno o más fragmentos proteolíticos típicos de PKCg mejora la precisión del diagnóstico hasta el 100%.

Ejemplo 3. Análisis de la unión del anticuerpo monoclonal anti-PKCg a fragmentos proteolíticos de PKCg en el diagnóstico de derrames cerebrales a partir de muestras de plasma humano

Se analizaron muestras de plasma de sujetos a los que se les había diagnosticado un derrame cerebral para la presencia de PKCg y fragmentos proteolíticos de PKCg mediante tinción con mAbs PKC11, PKC13 y PKC14 de acuerdo con el ensayo de ELISA capilar quimioluminiscente como se describió anteriormente. Los resultados demuestran que el método novedoso de la presente invención proporciona un método de diagnóstico rápido y confiable para detectar derrame cerebral en pacientes sospechosos de padecer el mismo.

Detección de PKCg en muestras de plasma normales versus de derrame cerebral

La tinción de las muestras de derrame cerebral con PKC11, PKC13 y PKC14 utilizando el ensayo capilar de quimioluminiscencia mostró niveles significativamente más altos de PKCg en muestras de plasma humano normales versus de derrame cerebral. La Figura 8 muestra las señales agregadas de todas las muestras contribuyentes de derrame cerebral versus muestras normales teñidas con cada anticuerpo monoclonal (PKC11, PKC13 y PKC14). Como se ha demostrado anteriormente para las muestras de plasma de TBI, cada anticuerpo monoclonal muestra un patrón de tinción único.

Detección de PKCg utilizando anticuerpos multiplexados

5 Se analizaron muestras de plasma de los pacientes con derrame cerebral para detectar la presencia de PKCg y de fragmentos proteolíticos de PKCg mediante tinción con los anticuerpos monoclonales PKC11 y PKC13 de forma individual y multiplexada (tanto PKC11 como PKC13) de acuerdo con el ensayo de ELISA capilar quimioluminiscente como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 9A-9C. Las muestras numeradas S se obtuvieron de pacientes con derrame cerebral; las muestras numeradas H se obtuvieron de individuos normales (sin derrame cerebral).

10 Los resultados demuestran que el método novedoso de la presente invención proporciona un método de diagnóstico rápido y confiable para detectar la aparición de un derrame cerebral en pacientes que han sufrido un evento de derrame cerebral. Además, los resultados indican nuevamente que la multiplexación con anticuerpos anti-PKCg que tienen diferentes especificidades para fragmentos de PKCg mejora la certeza de este diagnóstico.

15 La tinción con PKC11 de muestras individuales de plasma humano normal comparadas contra muestras de plasma de víctimas de derrame cerebral en la figura 9A muestra 7/10 muestras de derrame cerebral positivas mayores que la línea de base (70% de detección). La tinción con PKC13 mostrada en la Figura 9B muestra 9 muestras de derrame cerebral por encima de la línea (9/11, u 82% de detección). Cuando se multiplexan PKC11 y PKC13, como se muestra en la figura 9C, se calcula un incremento en la detección del diagnóstico positivo para derrame cerebral con 10 muestras de derrame cerebral por encima de la línea (10/11, o 91% de detección). Las Figuras 9A y 9B muestran diferentes patrones de quimioluminiscencia, como la alta señal positiva en la muestra S013 en la fig. 9A y la alta señal positiva en la muestra S017 en la fig. 9B. Por lo tanto, al combinar la sensibilidad y especificidad de mAbs PKC11 y PKC13 en un ensayo, la precisión del diagnóstico del derrame cerebral mejora hasta 91%. La línea de base horizontal de la figura 9 representa 3445 unidades de quimioluminiscencia.

Detección de fragmentos de PKCg en muestras de plasma normal versus de derrame cerebral

25 Se realizó una comparación estadística de las señales quimioluminiscentes de muestras de plasma normal y de derrame cerebral teñidas con PKC11, PKC13 y PKC14. Los resultados se muestran en las figuras 10A-10C. La comparación estadística es una prueba T de Student no pareada, de dos colas (utilizando GraphPad Prism 8). Las gráficas de la figura 10 representan la media y el SE de la media; * representa la significancia al nivel de confianza del 95% y se enlistan los valores p para las mediciones significativas.

30 La Figura 10A muestra un pico más alto en los fragmentos de PKCg de 63-73 kDa y 49-52 kDa para las muestras de derrame cerebral contactadas con mAb PKC11, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas cuando se comparan con plasma humano normal. Existe un pico significativo para el fragmento de PKCg de 53-60 kDa en muestras de plasma normal en comparación con las muestras de plasma de derrame cerebral teñidas con PKC11.

35 La figura 10B muestra un aumento significativo en la presencia del fragmento de PKCg de 42-48 kDa en las muestras de derrame cerebral versus de plasma control ($P = 0.038$) teñidas con mAb PKC13. El fragmento de 49-52 kDa es mayor en el plasma de derrame cerebral y es casi significativo ($P=0.06$) cuando se compara con las muestras de plasma normal. Presumiblemente, un mayor número de muestras se presentaría con un aumento significativo en las muestras de derrame cerebral(+) para el fragmento de PKCg de 49-52 kDa. La banda de mayor peso molecular a 95-105 kDa es significativa en las muestras de derrame cerebral cuando se compara con plasma normal en las muestras teñidas con PKC13. No hay fragmentos evidentes de 63-73 kDa en las muestras de derrame cerebral teñidas con PKC13.

40 La figura 10C muestra la tinción de plasma humano normal versus plasma de derrame cerebral sondeada con mAb PKC14. Este anticuerpo no muestra bandas de tinción significativamente diferenciales y tiene una señal más baja que los otros dos anticuerpos probados.

Detección de los fragmentos de PKCg de 49-52 kDa en muestras de plasma normal versus de derrame cerebral

Las figuras 11A-11C muestran los análisis de la Curva ROC del fragmento de PKCg de 49-52 kDa en muestras de plasma normal versus de derrame cerebral teñidas con PKC11 (panel A), PKC13 (panel B), y PKC14 (panel C), respectivamente.

50 El análisis de la curva ROC muestra alta sensibilidad de los fragmentos individuales de 49-52 kDa de muestras de plasma normales versus de derrame cerebral teñidas con PKC11, PKC13 y PKC14, lo que confirma la utilidad diagnóstica aumentada del ensayo para el fragmento proteolítico de PKCg de 49-52 kDa para diagnosticar derrame cerebral. El análisis mostrado en la figura 11A es para solamente unos pocos ejemplos ($n=3$), sin embargo, la sensibilidad sigue siendo alta ($P=1.0$) sin falsos positivos ($P=0$). El círculo blanco identifica las muestras positivas para derrame cerebral a una señal superior a 797 unidades de quimioluminiscencia teñidas con PKC11. El círculo gris representa un control sano a 602 unidades de quimioluminiscencia.

Para la tinción PKC13 del fragmento de 49-52 kDa, mostrada en la figura 11B, la sensibilidad también permanece alta ($P=1.0$) sin falsos positivos ($P=0$) y especificidad ($P=1.0$). El círculo blanco representa 999 unidades de quimioluminiscencia; cualquier señal superior a esto representa una muestra positiva para derrame cerebral. Hay 2 muestras de control sanas con señales a 582 y 579 unidades de quimioluminiscencia (círculos grises).

Los resultados para la tinción PKC14 del fragmento de 49-52 kDa, mostrados en la figura 11C, confirman de nuevo la idoneidad de este fragmento como una diana de diagnóstico importante para diagnosticar derrame cerebral. La sensibilidad del ensayo sigue siendo muy alta ($P=1.0$) con 0 falsos positivos (Especificidad $P = 1.0$) aunque la señal compuesta global de cada uno de los fragmentos sea baja (Cf. Figura 10). El círculo blanco se sitúa a 257 unidades de quimioluminiscencia; una señal superior a ésta representa una muestra positiva para derrame cerebral. Las muestras de plasma sano (no-derrame cerebral) (círculos grises) presentan señales de quimioluminiscencia más bajas que las del círculo blanco.

Detección de fragmentos alternos de PKCg en muestras de plasma normal versus de derrame cerebral

Un análisis de muestras de derrame cerebral comparadas con muestras de plasma humano normal ilustra el grado en que los fragmentos de PKCg pueden contribuir a un diagnóstico positivo para derrame cerebral. El análisis ROC de los fragmentos de PKCg de 33-36 kDa, 42-48 kDa y 53-60 kDa teñidos con PKC11, PKC13 y PKC14 no alcanza la sensibilidad observada para el fragmento de 49-52 kDa ($P > 0.9$) y, como tal, contribuyen con diversos grados de mejora para el diagnóstico del derrame cerebral. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (a continuación).

[Por ejemplo, la tinción PKC13 muestra sensibilidad en el intervalo de $P=0.7$ a $P= 0.8$ con falsos positivos menores o iguales a $P=0.2$ y especificidad $P=0.8$ a $P=1.0$. Las contribuciones a la señal para los fragmentos de 42-48 kDa y 53-60 kDa son superiores a 2200 unidades de quimioluminiscencia, con una probabilidad de falsos positivos a un bajo nivel (20%).

Otro ejemplo de la Tabla 3 muestra que la mayor contribución del diagnóstico de derrame cerebral para el fragmento de 63-73 kDa es de PKC11 con sensibilidad a $P=0.5$, falsos positivos a $P=0.3$ y especificidad a $P=0.7$. Por el contrario, PKC13 no muestra respuesta para el fragmento de 63-73 kDa. (Véase la Tabla 3). PKC14 muestra una respuesta para el fragmento de 63-73 kDa con una señal de 688 unidades de quimioluminiscencia, pero menor sensibilidad y mayores falsos positivos (sensibilidad $P= 0.5$ y falsos positivos $P= 0.5$).

Tabla 3. Análisis ROC de diversos fragmentos de PKCg en plasma humano normal versus de derrame cerebral

Anticuerpo PKCg	Fragmento (Nombre)	Sensibilidad P =	Falso positivo P =	Señal Quimioluminiscencia
PKC11	33-36 kDa	0.75	0.2	126
	42-48 kDa	0.33	0.6	637
	53-60 kDa	0.33	0.54	1545
	63-73 kDa	0.5	0.33	1770
PKC13	33-36 kDa	0.71	0.2	319
	42-48 kDa	0.8	0	2213
	53-60 kDa	0.78	0.2	3348
	63-73 kDa	Sin respuesta		
PKC14	33-36 kDa	0.78	0.42	230
	42-48 kDa	0.88	0.33	633
	53-60 kDa	0.6	0.36	654
	63-73 kDa	0.5	0.5	866
	95-105	0.63	0.33	443

Por lo tanto, las señales de los fragmentos de PKCg con alta sensibilidad, alta especificidad, y bajos falsos positivos, han demostrado que mejoran el diagnóstico de derrame cerebral(+).

Curva ROC para el fragmento de PKCg de 42-48 kDa en muestras de plasma normales versus de derrame cerebral teñidas con mAb PKC13

- 5 La Figura 12 muestra el análisis de la Curva ROC de las muestras normales versus de derrame cerebral teñidas con PKC13 para el fragmento de PKCg de 42-48 kDa. La tinción del fragmento de PKCg de 42-48 kDa con PKC13 muestra 0 falsos positivos a una sensibilidad de $P=0.8$ y especificidad de $P=1.0$. Los puntos negros de la figura 12 representan muestras de plasma de derrame cerebral(+), mientras que los puntos grises representan controles sanos normales. El punto blanco corresponde a una señal de quimioluminiscencia de 2213. Las muestras con señales iguales o superiores a 2213 unidades de quimioluminiscencia se consideran positivas para el diagnóstico de derrame cerebral. Las señales de los fragmentos de PKCg, como la tinción PKC13 del fragmento de 42-48 kDa, tiene una sensibilidad relativamente alta, especificidad alta y falsos positivos bajos, lo que aumenta la precisión del diagnóstico de derrame cerebral(+).

Conclusiones

- 15 Todos los anticuerpos monoclonales de conejo recuperados tienen diferentes secuencias de región variable y se unen a diferentes epítopes en la proteína PKCg. Se analizó la capacidad de los tres anticuerpos monoclonales de conejo clonados, es decir, PKC11, PKC13 y PKC14, para detectar PKCg y fragmentos proteolíticos de PKCg en muestras de plasma de pacientes diagnosticados de haber sufrido una TBI y pacientes diagnosticados de haber sufrido un derrame cerebral, en comparación con muestras de plasma de sujetos normales (control), utilizando técnicas cuantitativas de inmunotransferencia capilar quimioluminiscente.

- 20 Los anticuerpos monoclonales de conejo PKC11, PKC13 y PKC14 se puede unir a epítopes únicos presentes en la proteína PKCg de longitud completa. Además, los tres anticuerpos monoclonales de conejo reconocen epítopes presentes en los fragmentos proteolíticos de PKCg de 32-36 kDa, 42-48 kDa, 49-52 kDa, y 53-60 kDa que se desarrollan como resultado de la lesión en el CNS y se transportan a través de la BBB en la circulación periférica.

- 25 PKC11 y PKC13 muestran fuertes señales (de unión a) para PKCg de longitud completa y los fragmentos proteolíticos de PKCg. La multiplexación de los anticuerpos PKC11 y PKC13 para los fragmentos proteolíticos de PKCg mejora en gran medida el diagnóstico de TBI o derrame cerebral en muestras de plasma. El análisis de los fragmentos proteolíticos de PKCg combinados a partir de la tinción PKC11, PKC13 y PKC14 puede mejorar la tasa de detección (diagnóstico) en diversos grados tanto de TBI como de derrame cerebral en las muestras clínicas analizadas. En particular, la presencia del fragmento de PKCg de 49-52 kDa en una muestra mejora en gran medida el diagnóstico tanto de TBI(+) como de derrame cerebral(+) debido a que raramente se encuentra en el plasma humano normal y se presenta con alta sensibilidad, bajos falsos positivos y alta especificidad en muestras de TBI y de derrame cerebral.

- 35 Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, el novedoso método *in vitro* de la presente invención para detectar y cuantificar la presencia de fragmentos proteolíticos de PKCg y PKCg a partir de una muestra de sangre venosa es capaz de diagnosticar de forma rápida y confiable la aparición de una lesión en el CNS, como una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral, en un individuo afectado. La presente invención también proporciona anticuerpos monoclonales únicos particularmente adecuados para uso en los novedosos métodos *in vitro* para diagnosticar TBI y derrame cerebral, cuyos anticuerpos reconocen (y forman un complejo de unión detectable con) al menos un epítopo presente en la proteína PKCg de longitud completa y reconocen (y forman un complejo de unión con) al menos un epítopo único presente en al menos uno de los fragmentos proteolíticos de PKCg descritos anteriormente, cuyos complejos de unión se pueden detectar mediante cualquier proceso conocido en la técnica para detectar biomarcadores en una muestra biológica. Los ejemplos expuestos anteriormente son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Las variaciones obvias a los métodos divulgados y las realizaciones alternativas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la divulgación anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, capaz de unir la isoforma gamma humana de la proteína cinasa C (PKC γ) o un fragmento proteolítico de PKC γ , en el que la porción de unión al antígeno del anticuerpo comprende un conjunto de seis CDR: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, cuyo conjunto de CDR se selecciona del grupo de conjuntos de CDR (conjuntos de CDR No. 1 a 3) que tienen los seis SEQ ID Nos: respectivos de la siguiente manera:

No. de conjunto de CDR	CDR	Secuencia de aminoácidos de las CDR	SEQ ID NO:
1	CDR-H1	GFSLNYA	SEQ ID NO:3
	CDR-H2	ITSDTT	SEQ ID NO:4
	CDR-H3	ASGGSTTSPAL	SEQ ID NO:5
	CDR-L1	QSVWSKNY	SEQ ID NO:6
	CDR-L2	SAS	SEQ ID NO:7
	CDR-L3	LGSYDCRSADCWT	SEQ ID NO:8
2	CDR-H1	GFSLSSYA	SEQ ID NO:9
	CDR-H2	IISGGSA	SEQ ID NO:10
	CDR-H3	ARAKSGTYTGDYFTL	SEQ ID NO:11
	CDR-L1	ESIGNA	SEQ ID NO:12
	CDR-L2	RAS	SEQ ID NO:13
	CDR-L3	QSYVGSRSTGYNV	SEQ ID NO:14
3	CDR-H1	GFTLTTYW	SEQ ID NO:15
	CDR-H2	ILTGSGST	SEQ ID NO:16
	CDR-H3	ARYGGDATYNENL	SEQ ID NO:17
	CDR-L1	QSVYNNNR	SEQ ID NO:18
	CDR-L2	GVS	SEQ ID NO:19
	CDR-L3	LGGYDCASADCYA	SEQ ID NO:20

2. Un anticuerpo anti-PKC γ , o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende dominios de cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL), en el que los dominios VH y VL respectivos comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs:21 y 22; SEQ ID NOs:32 y 33; y SEQ ID NOs:25 y 26:

anticuerpo	dominio	SEQ ID NO.	secuencia de aminoácidos
			123456789012345678901234567890123456789 0
PKC11	VH	21	METGLRWLLLVAVLKGVCQSVVEESGGRLVTPGTPLALT CTVSGFSLNYYAMNWRQAPVKGLEWIGVITSDTTYAS WAKGRFTISKSTTTVELQITSPTEDTATYFCASGGSTT SPALWGQGTLVTVSS
	VL	22	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSPVSAAVGS TVTINCQASQSVWSKNYLSWFQKPGQPPKQLIYSASTL ASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYD CRSADCWTFGGGTEVVVK

ES 2 983 014 T3

PKC13	VH	32	METGLRWLLLGA VLKGVQCQEQLKESGGGLVTPGGTLTL TCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIISGGSAYY ATWAKGRETISKTSSTTVDLSTSPPTEDTATYFCARAKS GTYTGDYFTLWGQGLTVTVSS
	VL	33	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAFELTQTPASVEAAVGG TVTIKCQASESIGNALAWYQQKPGQPPKLLIYRSTLES GVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYQCQSYVGSR STGYNVFEGGTEVVVK
PKC14	VH	25	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVQPGASLTLT CTASGFTLTTYWICWVRQAPGKGLEWVACILTGSGSTYY ASWVNGRFITISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARYG GDATYNENLWGGQGLTVTVSS
	VL	26	MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGG TVTINCQASQSVYNNNRLSWYQQKPGQPPKRLIYGVSTL YYGVSSRFKSGSGTQFTLTISGMQCDDAAIYYCLGGYD CASADCYAFGGGTEVVVK

3. Un método *in vitro* para diagnosticar una lesión que involucra al sistema nervioso central (CNS) que comprende:
- 5 a) poner en contacto una muestra de sangre de un sujeto sospechoso de haber sufrido una lesión en el CNS con al menos uno de los anticuerpos anti-PKCg definidos en la reivindicación 1 o reivindicación 2; y
- b) detectar la formación de un complejo de unión de dicho al menos un anticuerpo y PKCg o un fragmento proteolítico de la misma,
- en el que la presencia de dicho complejo de unión formado en dicha muestra indica una lesión en el CNS.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha lesión en el CNS es una lesión cerebral traumática o un derrame cerebral.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la muestra se pone en contacto con al menos dos dichos anticuerpos diferentes, en el que la porción de unión al antígeno de dichos dos anticuerpos comprende respectivamente (i) SEQ ID NOs:3 a 8; y (ii) SEQ ID NOs:9 a 14, y en el que los dominios VH y VL de dichos dos anticuerpos comprenden respectivamente (i) SEQ ID NOs:21 y 22; y (ii) SEQ ID NOs:32 y 33.
- 15 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra se pone en contacto con un tercer anticuerpo dicho, en el que la porción de unión al antígeno de dicho tercer anticuerpo comprende SEQ ID NOs: 15 a 20, y en el que los dominios VH y VL de dicho tercer anticuerpo comprenden SEQ ID NOs:25 y 26.

Quimioluminiscencia Total de PKC11, PKC13, PKC14

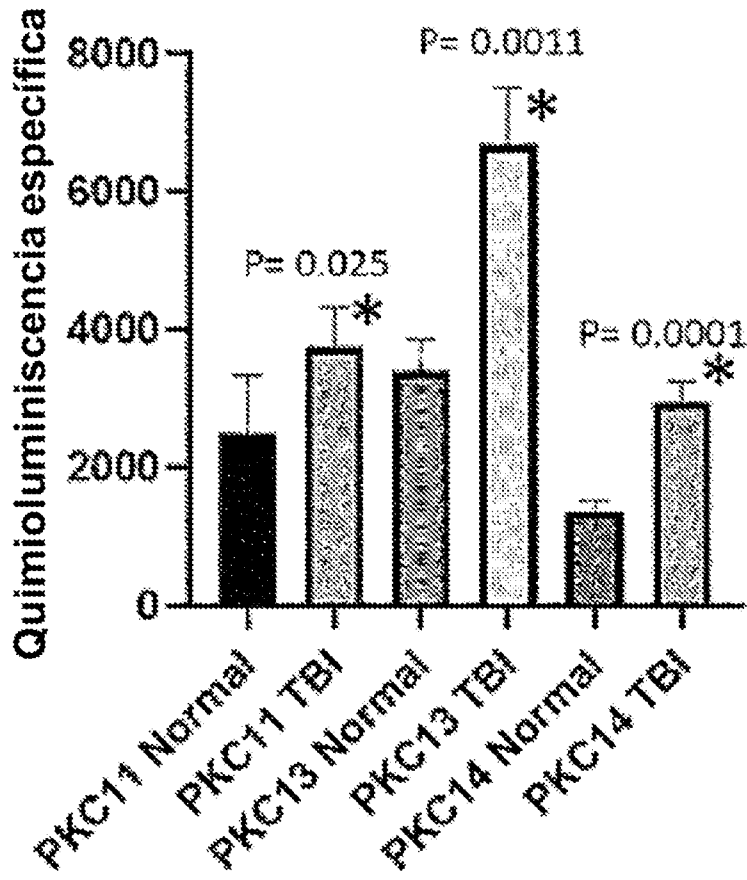


Fig. 1

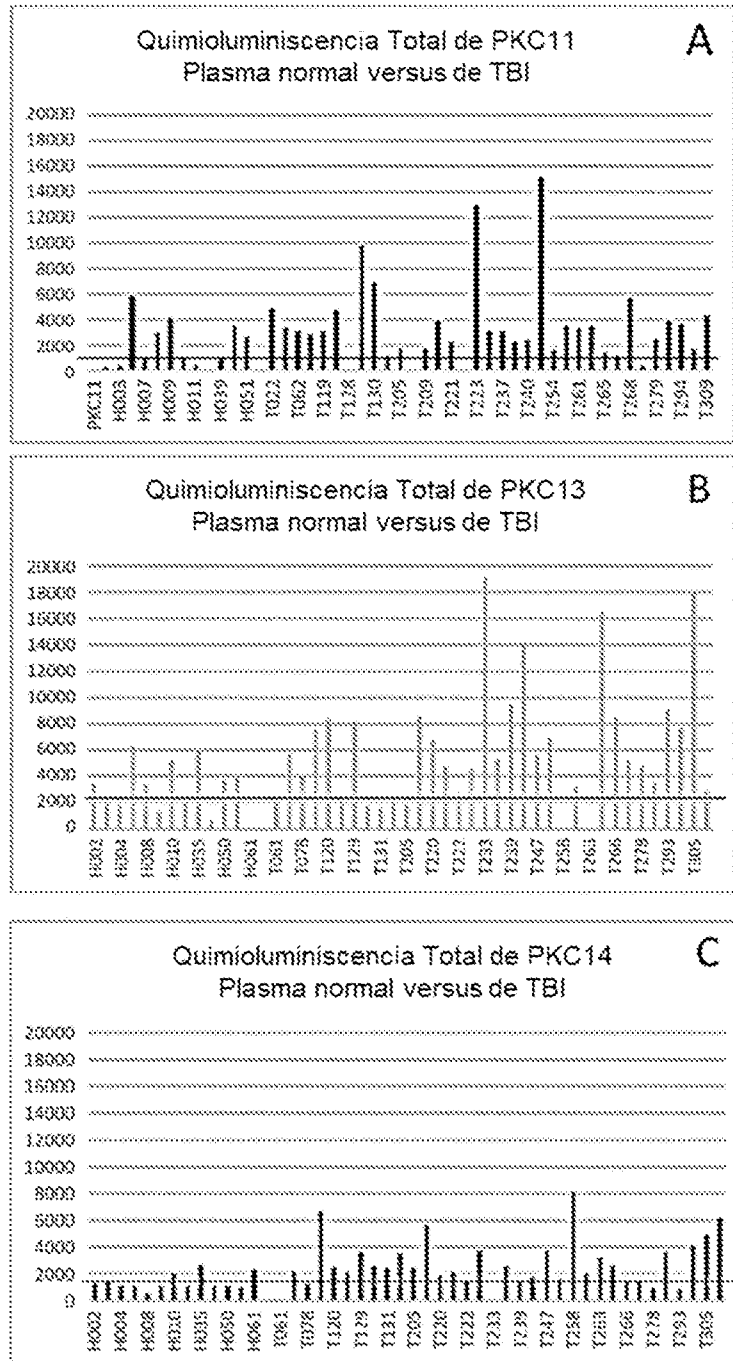


Fig. 2

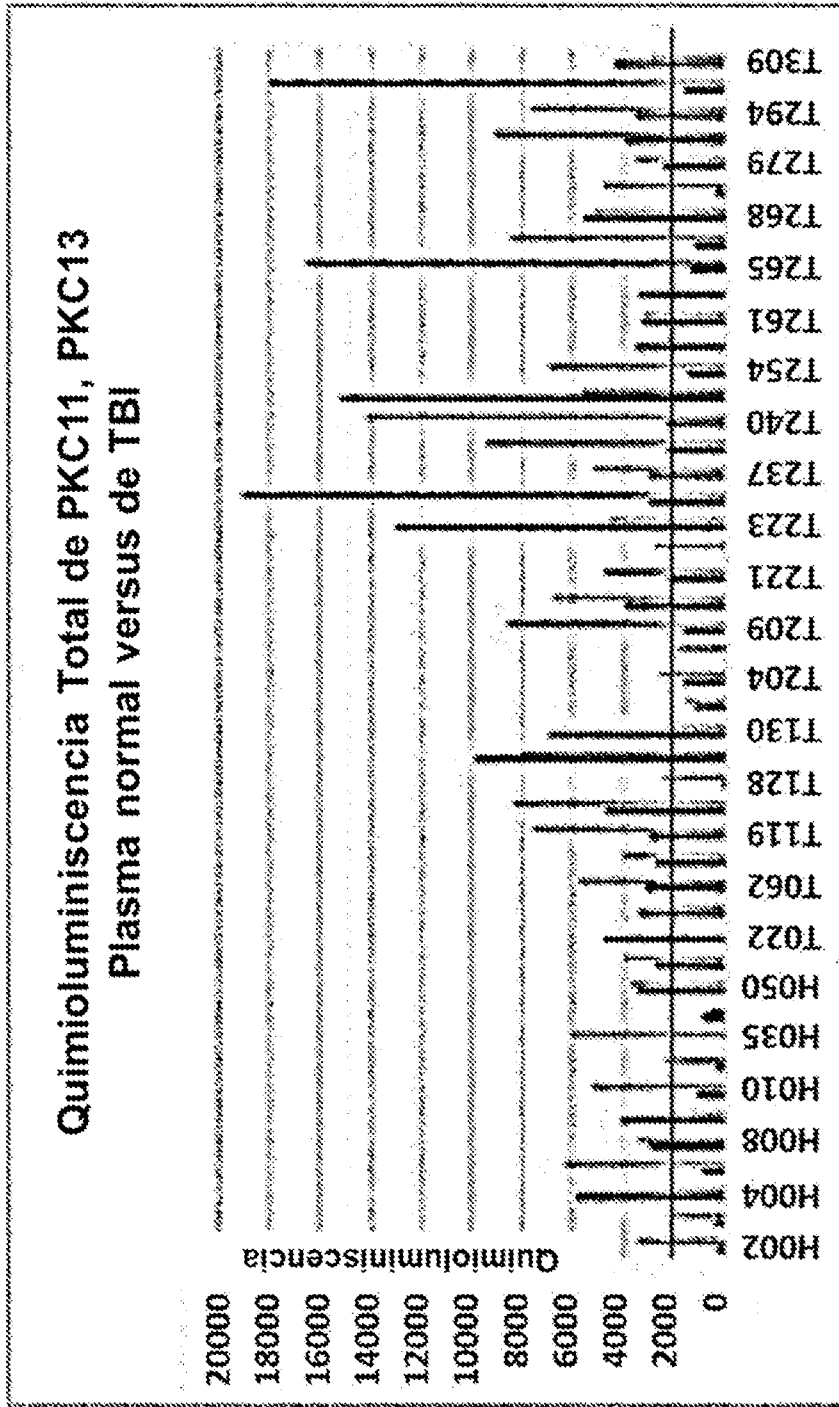


Fig. 3

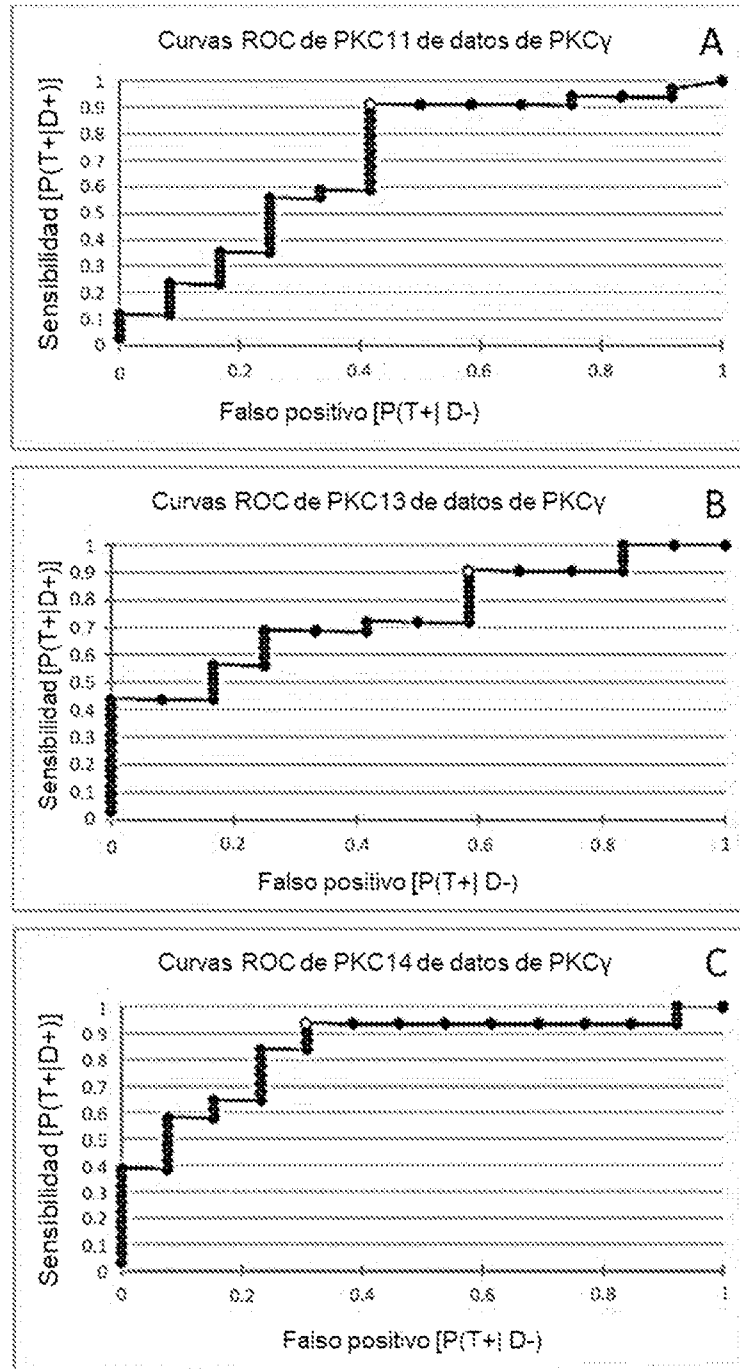


Fig. 4

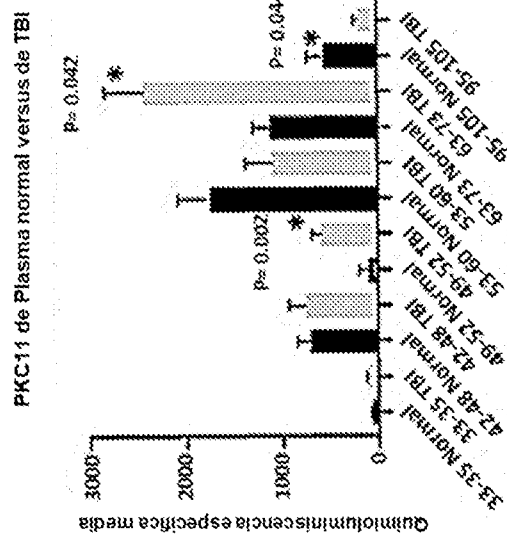
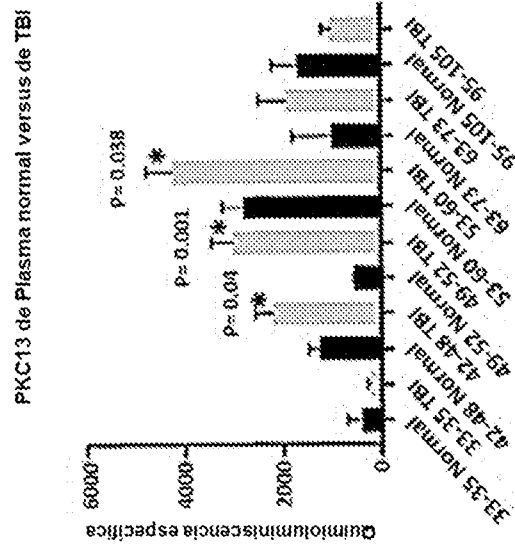
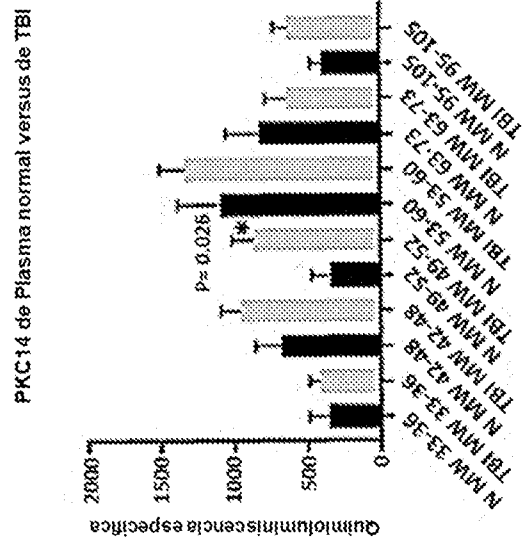


Fig. 5

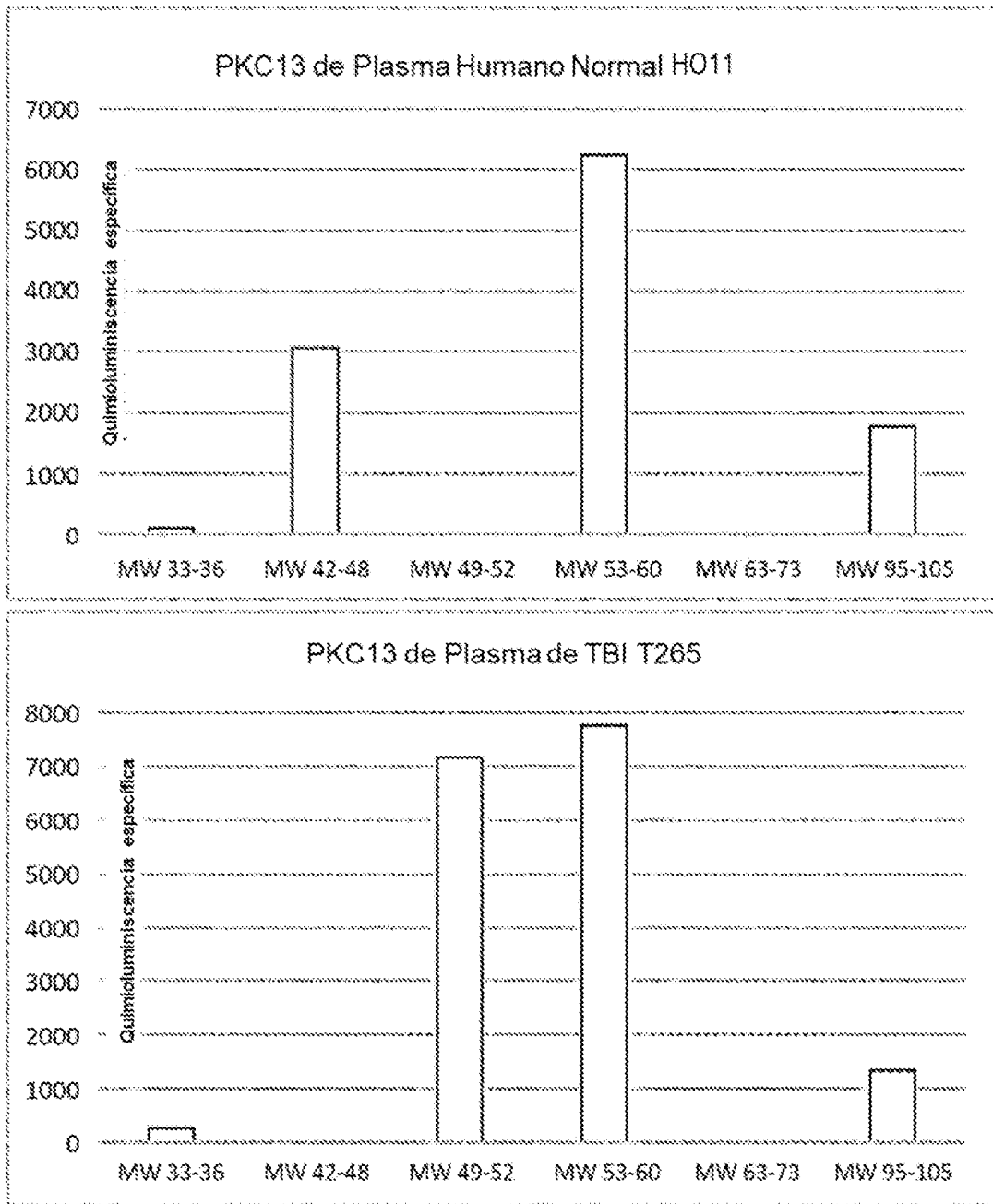


Fig. 6

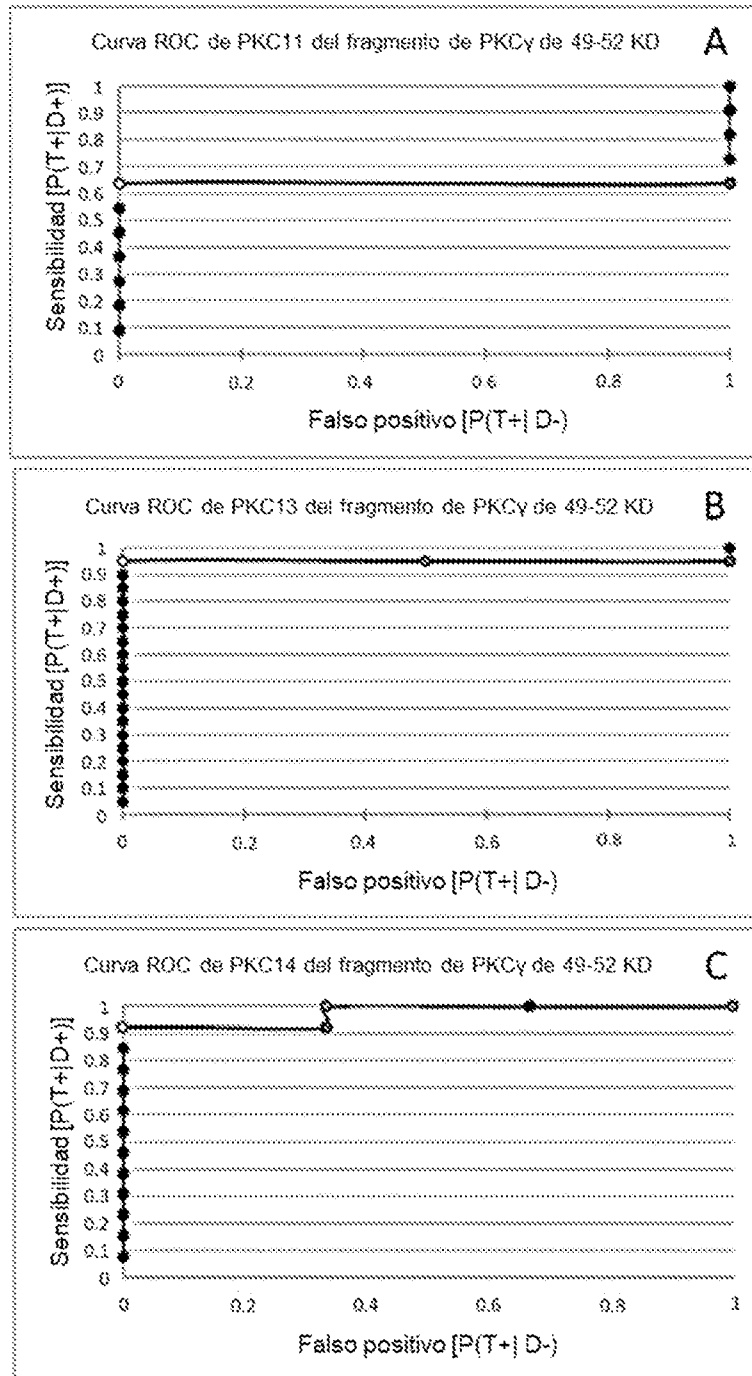


Fig. 7

Quimioluminiscencia Total de plasma normal versus de derrame cerebral

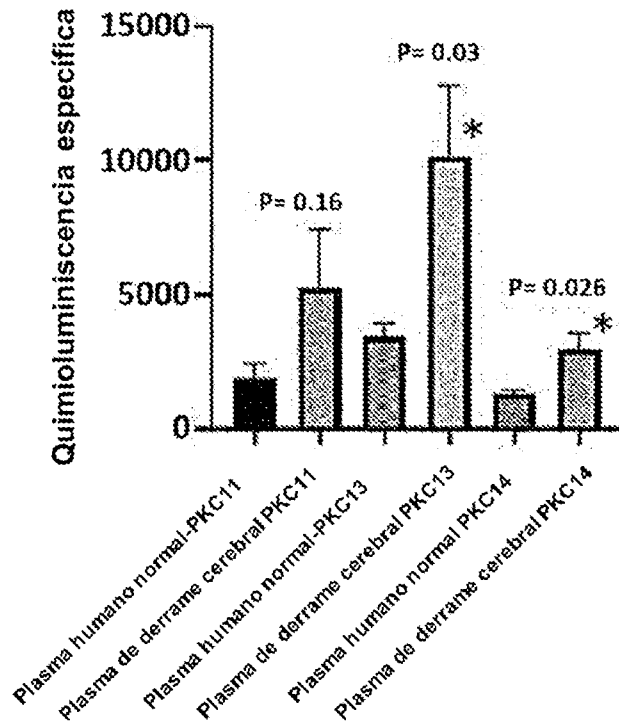


Fig. 8

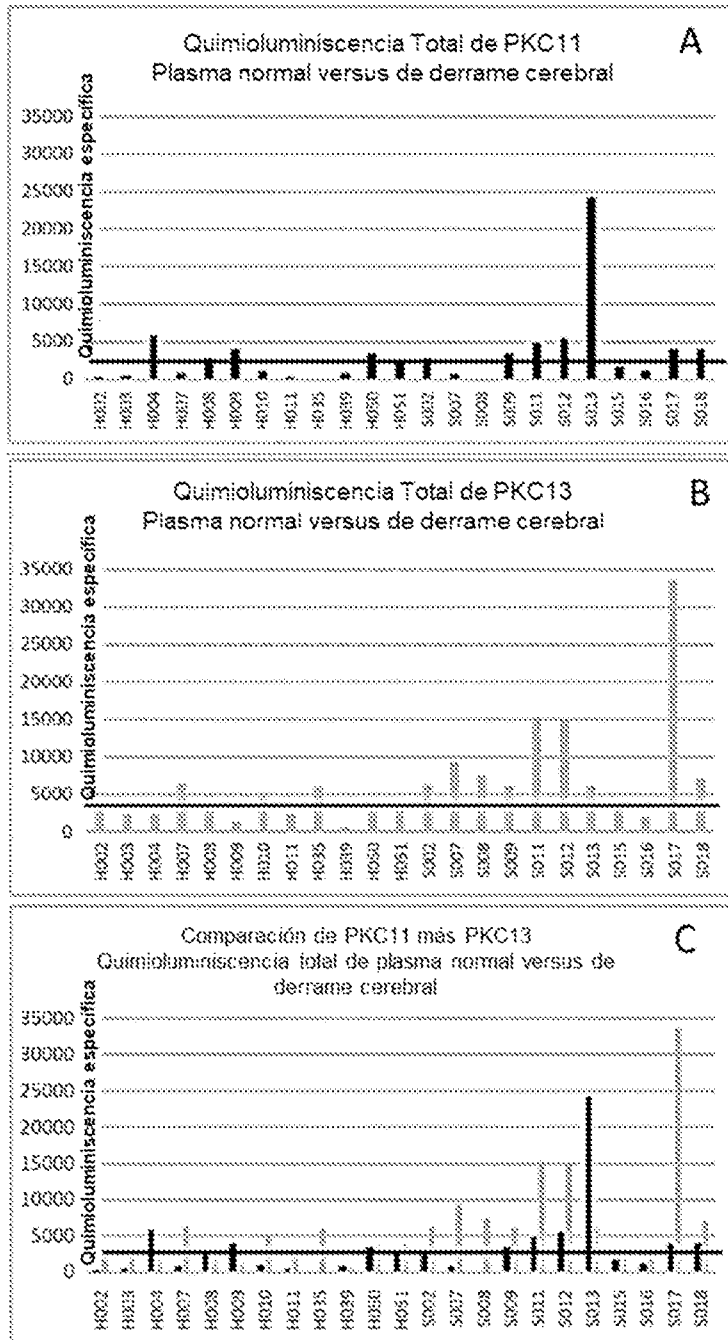


Fig. 9

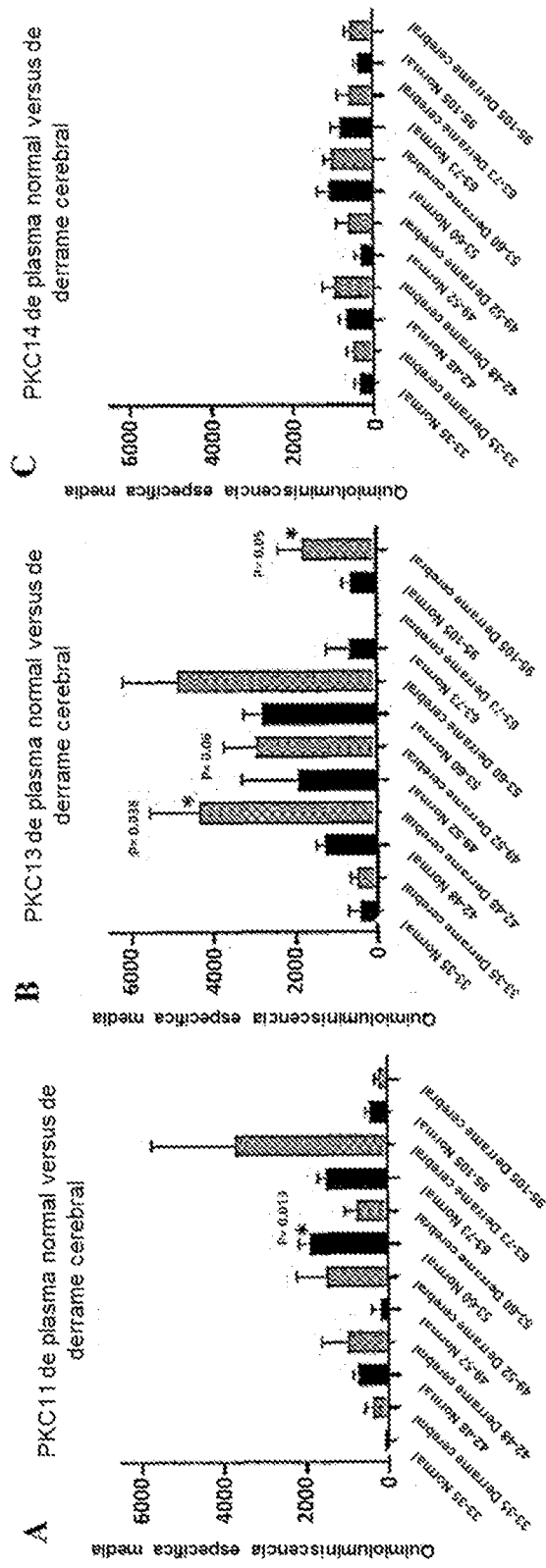
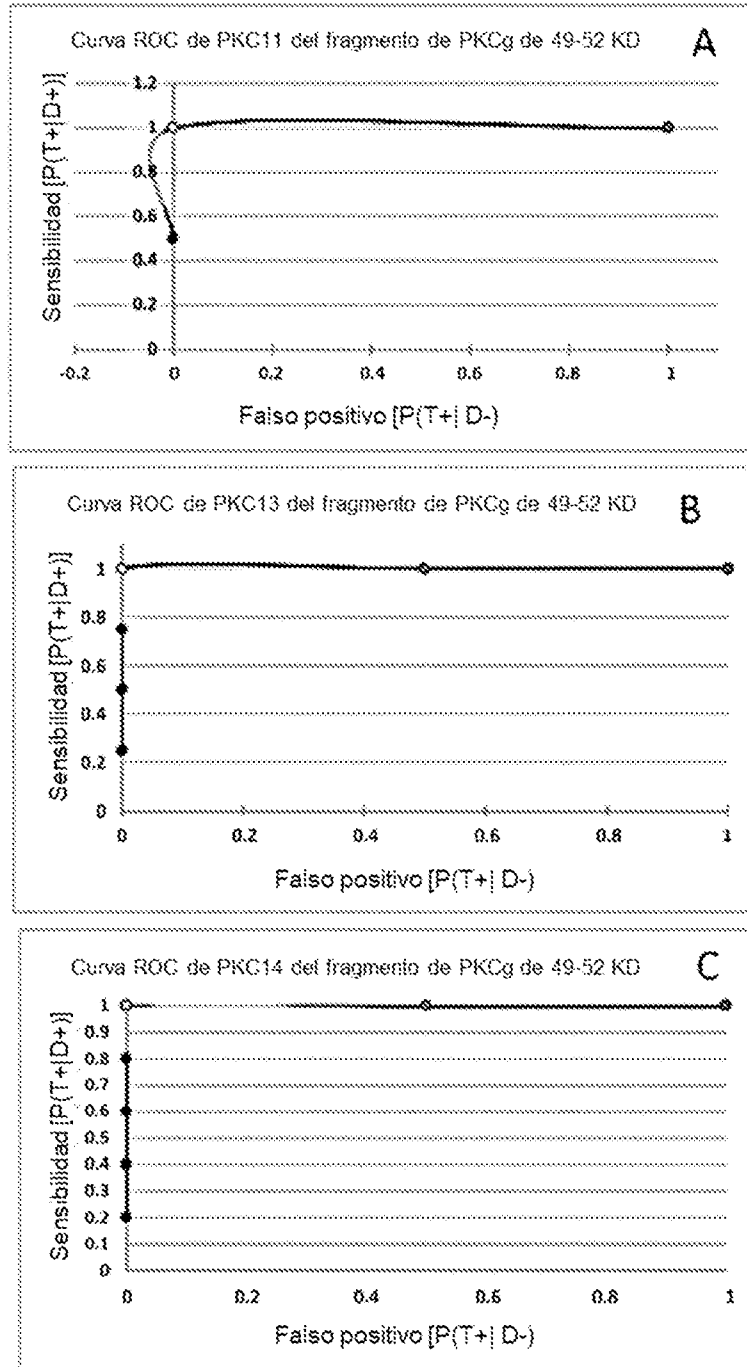


Fig. 10



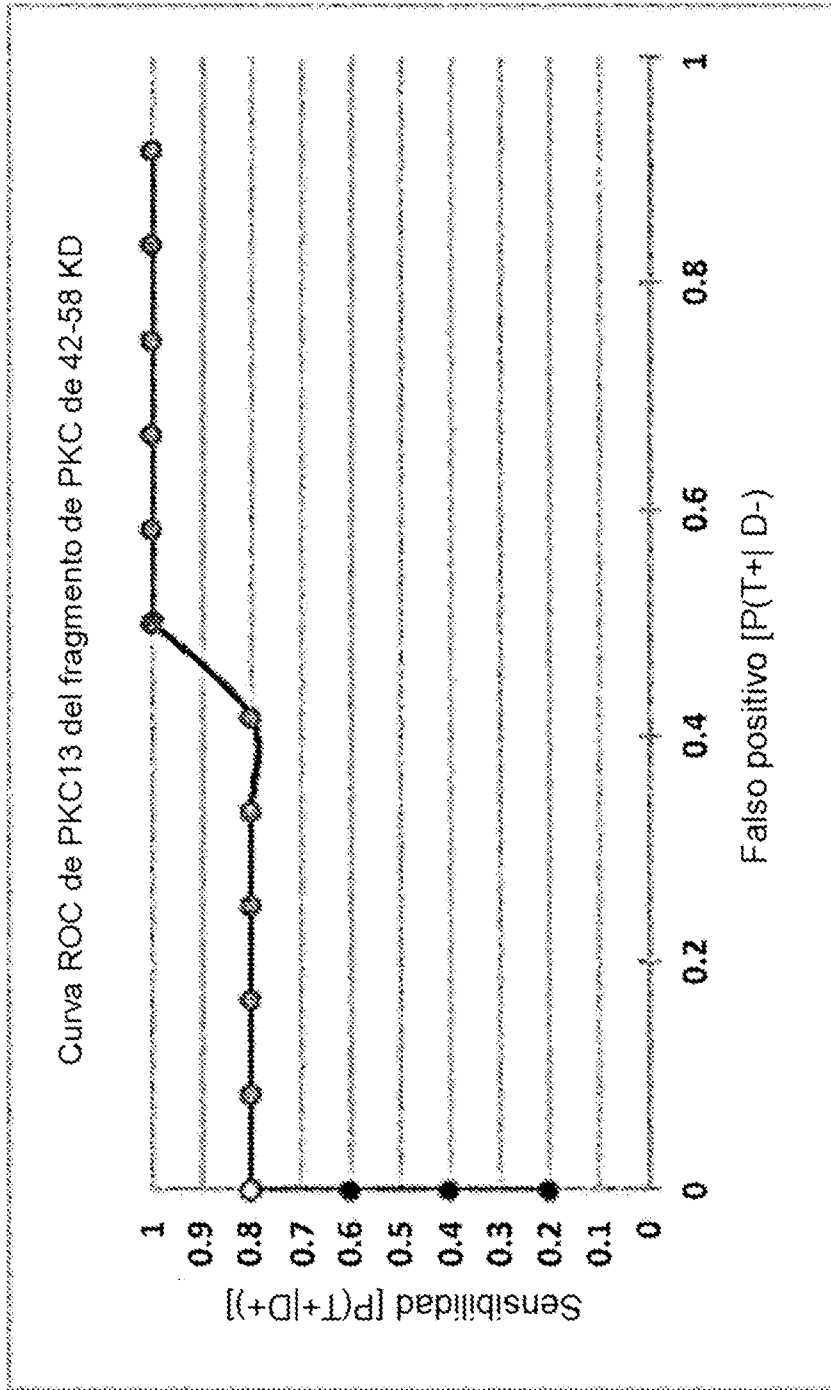


Fig. 12