

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 001 985**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2017** **PCT/US2017/054775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018** **WO18067468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2017** **E 17791223 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 3519824**

54 Título: **Métodos mejorados para evaluar el estado de UCH-L1 en muestras de pacientes**

30 Prioridad:

03.10.2016 US 201662403293 P
06.02.2017 US 201762455269 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
06.03.2025

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.00%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064, US

72 Inventor/es:

DATWYLER, SAUL;
MCQUISTON, BETH;
BELIGERE, GANGAMANI;
BRATE, ELAINE;
RAMP, JOHN y
PACENTI, DAVID

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 3 001 985 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

Métodos mejorados para evaluar el estado de UCH-L1 en muestras de pacientes

5 CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere a métodos mejorados para evaluar el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1), por ejemplo, como medida de lesión cerebral traumática o por otras razones clínicas. La presente se refiere a métodos de evaluación del estado de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y UCH-L1 de un sujeto, por ejemplo, como medida de lesión cerebral traumática o por otras razones clínicas.

ANTECEDENTES

Hay muchos escenarios en los que se observan lesiones cerebrales, de la médula espinal y otras neurológicas inducidas por traumatismos. Por ejemplo, los proveedores de atención militar sobre el terreno informaron de dolores intensos experimentados por heridos con lesiones en la columna vertebral y la cabeza cuando se les sometió a un transporte terrestre y aéreo accidentado y con altas vibraciones. Los golpes y vibraciones repetidos experimentados por los pacientes durante el transporte sanitario pueden afectar a los resultados médicos. Los heridos con lesiones de la médula espinal (SCI), lesiones cerebrales traumáticas (TBI) y/u otras lesiones neurológicas graves son los más vulnerables a los golpes y vibraciones repetidos del vehículo. Los marcadores de fluidos del daño neuronal, axonal y astrogliar serían valiosos para ayudar en el diagnóstico de conmoción cerebral en los pacientes, así como para evaluar su necesidad de diagnóstico por imagenología con traumatismo craneal, para predecir el resultado clínico a corto y largo plazo y para saber cuándo el cerebro se ha recuperado de la TBI. Los biomarcadores candidatos actuales están limitados por ser insuficientes en cuanto a su sensibilidad en la detección sérica, especificidad para señalar el cerebro y falta de estandarización del ensayo. Se carece de un marcador agudo para un ensayo de campo que evalúe el espectro de lesión de la TBI desde hiperaguda a aguda. Además, actualmente no hay forma de identificar la TBI leve (mTBI) con daño cerebral duradero después de una conmoción cerebral que pueda provocar trastorno de estrés postraumático (PTSD) o neurodegeneración crónica (encefalopatía traumática crónica, CTE, "síndrome del boxeador").

La TBI leve o conmoción cerebral es mucho más difícil de detectar objetivamente y supone un reto cotidiano en las unidades de atención de urgencias, en el ámbito militar, las salas de urgencias, los hospitales de hospitalización, las clínicas ambulatorias y los campos y áreas deportivos, en todo el mundo. La conmoción cerebral habitualmente no provoca ninguna patología macroscópica, como una hemorragia, ni anomalías en las tomografías computarizadas convencionales del cerebro, sino una disfunción neuronal de inicio rápido que se resuelve de manera espontánea a lo largo de unos pocos días o unas pocas semanas. Aproximadamente el 15% de los pacientes con TBI leve padecen una disfunción cognitiva persistente.

Hay una necesidad insatisfecha de herramientas para evaluar a las víctimas de TBI leve en el lugar de los hechos, en las salas de urgencias, en los hospitales y clínicas de hospitalización, en el ámbito deportivo y en la actividad militar (por ejemplo, en combate).

SUMARIO

La presente divulgación describe un método para evaluar el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) de un sujeto. El método incluye el paso de: detectar por lo menos un biomarcador en una muestra biológica de dicho sujeto en donde por lo menos uno de los biomarcadores es UCH-L1 y en donde el método (i) puede usarse para determinar los niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, (ii) tiene un intervalo dinámico de 5 log, y (iii) es lineal sobre el intervalo dinámico. En este método, la UCH-L1 puede detectarse mediante un inmunoensayo o un ensayo de detección de moléculas individuales. En algunos aspectos, el nivel de UCH-L1 determinado puede ser superior a 25.000 pg/ml, dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usada.

La presente divulgación describe un método para evaluar el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) de un sujeto. El método incluye los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto, ya sea simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, con por lo menos un primer miembro de unión específica y por lo menos un segundo miembro de unión específica, en donde el por lo menos un primer miembro de unión específica y el por lo menos un segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1 produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden por lo menos un primer miembro de unión específica-UCH-L1-por lo menos un segundo miembro de unión específica; y b) detectar UCH-L1 en los uno o más primeros complejos presentes en la muestra, en donde el método (i) puede usarse para determinar niveles menores o iguales a 25.000 pg/ml de UCH-L1 y no requiere dilución de la muestra biológica; (ii) puede usarse para determinar niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, y en donde dicho método tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal a lo largo del intervalo dinámico; o (iii) es capaz de cuantificar el nivel de UCH-L1 en un intervalo dinámico de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml con una precisión de menos de aproximadamente el 10% de CV y con menos de aproximadamente un 10% de desviación de la linealidad (DL)

alcanzada en el intervalo dinámico. En este método, la UCH-L1 puede detectarse mediante un inmunoensayo o un ensayo de detección de moléculas individuales. En algunos aspectos, el nivel de UCH-L1 determinado puede ser más alto de 25.000 pg/ml dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

La presente divulgación describe un método para evaluar el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) de un sujeto. El método incluye los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto, ya sea simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, con por lo menos un primer miembro de unión específica y por lo menos un segundo miembro de unión específica, en donde el por lo menos un primer miembro de unión específica y el por lo menos un segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1 produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden por lo menos un primer miembro de unión específica-UCH-L1-por lo menos un segundo miembro de unión específica, en donde por lo menos uno de los por lo menos un primer miembro de unión específica y por lo menos un segundo miembro de unión específica comprenden un marcador detectable; y b) evaluar una señal de los uno o más primeros complejos, en donde la cantidad de señal detectable del marcador detectable indica la cantidad de UCH-L1 presente en la muestra, de tal manera que la cantidad de señal detectable del marcador detectable puede emplearse para evaluar el estado de UCH-L1 de dicho sujeto, en donde el método (i) puede usarse para determinar niveles menores o iguales a 25.000 pg/ml de UCH-L1 y no requiere dilución de la muestra biológica; (ii) puede usarse para determinar niveles de UCH-L1 en una cantidad de menos o igual a 25.000 pg/ml, y en donde dicho método tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal a lo largo del intervalo dinámico; o (iii) es capaz de cuantificar el nivel de UCH-L1 a lo largo de un intervalo dinámico de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml con una precisión de menos de aproximadamente el 10% de CV y con menos de aproximadamente un 10% de desviación de la linealidad (DL) alcanzada a lo largo del intervalo dinámico. En algunos aspectos, el nivel de UCH-L1 determinado puede ser mayor de 25.000 pg/ml dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

La presente divulgación está dirigida a un método para medir UCH-L1 en una muestra biológica de un sujeto. El método incluye (a) poner en contacto la muestra biológica con, simultánea o secuencialmente, en cualquier orden (1) por lo menos un anticuerpo de captura, que se une a un epítipo de UCH-L1 o fragmento de UCH-L1 para formar un complejo de por lo menos un anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1, y (2) por lo menos un (primer) anticuerpo de detección que incluye un (primer) marcador detectable y se une a un epítipo de UCH-L1 al que no se ha unido el anticuerpo de captura, para formar un complejo de por lo menos un anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-por lo menos un anticuerpo de detección, de tal manera que se forme por lo menos un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-por lo menos un anticuerpo de detección, y (b) determinar la cantidad o concentración de UCH-L1 en la muestra biológica basándose en la señal generada por el marcador detectable en el por lo menos un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-por lo menos un anticuerpo de detección, en donde la muestra biológica no requiere dilución, en donde el método se realiza en de 5 a 20 minutos, y en donde el método (i) puede usarse para determinar niveles menores o iguales a 25.000 pg/ml de UCH-L1; (ii) puede usarse para determinar niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, y en donde dicho método tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal a lo largo del intervalo dinámico; o (iii) es capaz de cuantificar el nivel de UCH-L1 a lo largo de un intervalo dinámico de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml con una precisión de menos de aproximadamente el 10% de CV y con menos de aproximadamente un 10% de desviación de la linealidad (DL) alcanzada a lo largo del intervalo dinámico. En algunos aspectos, el nivel de UCH-L1 determinado puede ser mayor de 25.000 pg/ml dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además evaluar UCH-L1 junto con uno o más de otros biomarcadores. Por ejemplo, puede evaluarse el estado de la proteína del ácido fibrilar glial (GFAP) de un sujeto junto con el estado de UCH-L1 del sujeto. En un aspecto, el método implica detectar por lo menos dos biomarcadores en una muestra biológica del sujeto donde por lo menos dos de los biomarcadores son GFAP y UCH-L1 y donde el método (i) puede usarse para determinar niveles de GFAP en una cantidad menor o igual a 50.000 pg/mL y niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, (ii) tiene un intervalo dinámico de 5 log, y (iii) es lineal sobre el intervalo dinámico. En este método, la UCH-L1 puede detectarse mediante un inmunoensayo o un ensayo de detección de moléculas individuales. En algunos aspectos, el nivel de GFAP determinado puede ser mayor de 50.000 pg/ml, dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

En la presente divulgación, el método de evaluar el estado UCH-L1 de un sujeto comprende además evaluar el estado de GFAP del sujeto usando un método que incluye los pasos de:

a) poner en contacto la muestra biológica, simultánea o secuencialmente, con: (i) por lo menos un primer miembro de unión específico a GFAP y por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP, en donde el por lo menos un primer miembro de unión específico a GFAP y el por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP se unen cada uno específicamente a GFAP, produciendo de este modo uno o más segundos complejos que comprenden el por lo menos un primer miembro de unión específico a GFAP-GFAP-por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP; y b) detectar GFAP en los uno o más segundos complejos en la muestra; en donde el método (i) puede usarse para determinar niveles de hasta 50.000 pg/ml de GFAP y 25.000 pg/ml de UCH-L1, (ii) no requiere dilución de la muestra biológica, y (iii) se realiza usando un dispositivo de punto de atención. En este método, la GFAP puede detectarse mediante inmunoensayo o un ensayo de detección de moléculas individuales. En algunos

aspectos, el nivel de GFAP determinado puede ser más alto de 50.000 pg/ml, dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

En la presente divulgación, el método de evaluar el estado de UCH-L1 de un sujeto comprende además evaluar el estado de GFAP del sujeto usando un método que incluye los pasos de: a) poner en contacto la muestra biológica, ya sea simultánea o secuencialmente, con: (i) por lo menos un primer miembro de unión específico a GFAP y por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP, en donde el por lo menos un primer miembro de unión específico a GFAP y el por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP se unen cada uno específicamente a GFAP, produciendo de este modo uno o más segundos complejos que comprenden el por lo menos un primer miembro de unión específico a GFAP-GFAP-por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP, en donde el por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP comprende un segundo marcador detectable; y b) evaluar una señal de los uno o más segundos complejos, en donde (i) la presencia de una señal detectable del marcador detectable del por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP indica que GFAP está presente en la muestra y la cantidad de señal detectable del marcador detectable del por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP indica la cantidad de GFAP presente en la muestra, de tal manera que puede emplearse la presencia y/o cantidad de la señal detectable del marcador detectable del por lo menos un segundo miembro de unión específico a GFAP para evaluar el estado de GFAP de dicho sujeto, en donde el método (i) puede usarse para determinar niveles de hasta 50.000 pg/ml de GFAP y 25.000 pg/ml de UCH-L1, (ii) no requiere dilución de la muestra biológica, y (iii) se lleva a cabo usando un dispositivo de punto de atención. En algunos aspectos, el nivel de GFAP determinado puede ser mayor de 50.000 pg/ml dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

En la presente divulgación, el método de evaluar el estado de UCH-L1 de un sujeto comprende además evaluar el estado de GFAP del sujeto usando un método que incluye los pasos de: (a) poner en contacto la muestra biológica con, ya sea simultánea o secuencialmente, en cualquier orden (1) (i) por lo menos un anticuerpo de captura, que se une a un epítipo en GFAP o fragmento de GFAP para formar un complejo de por lo menos un anticuerpo de captura-antígeno de GFAP, y (ii) por lo menos un anticuerpo de detección que incluye un marcador detectable y se une a un epítipo en GFAP al que no se ha unido el anticuerpo de captura, para formar un complejo de por lo menos un captura-antígeno de GFAP-por lo menos un anticuerpo de detección, y (c) determinar la cantidad o concentración de GFAP en la muestra biológica basándose en la señal generada por el marcador detectable en el por lo menos un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de GFAP-por lo menos un anticuerpo de detección, en donde el método puede usarse para determinar niveles de GFAP en una cantidad menor o igual a 50.000 pg/ml y UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml y en donde dicho método tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal a lo largo de dicho intervalo dinámico. En algunas realizaciones, el método tiene un intervalo dinámico de 5 log tanto para GFAP como para UCH-L1. En algunos aspectos, el nivel de GFAP determinado puede ser mayor de 50.000 pg/ml dependiendo del formato del ensayo y de la instrumentación usados.

Cada uno de los métodos descritos anteriormente puede proporcionar una ventana de detección ampliada. La ventana de detección ampliada es una ventana de detección amplia, como una ventana de detección que es más amplia que los ensayos del estado de la técnica. Específicamente, los métodos descritos anteriormente pueden llevarse a cabo en cualquier sujeto independientemente de la condición clínica del sujeto, los valores de laboratorio, la condición clínica y los valores de laboratorio, la exposición de niveles bajos o altos de UCH-L1. Los métodos descritos anteriormente también pueden llevarse a cabo en cualquier sujeto independientemente de la condición clínica del sujeto, los valores de laboratorio, la condición clínica y los valores de laboratorio, la exposición de niveles bajos o altos de GFAP. Además de, o alternativamente, los métodos anteriores pueden tener un límite inferior de detección (LoD) de aproximadamente 10 pg/ml. Además de, o alternativamente, los métodos anteriores pueden tener un límite final inferior de detección (LoD) de aproximadamente 20 pg/ml.

Adicionalmente, cada uno de los métodos anteriores puede realizarse usando un volumen de menos de 20 microlitros de dicha muestra biológica.

Además, cada uno de los métodos anteriores puede usarse para determinar niveles de UCH-L1 en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, y de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

Adicionalmente, en los métodos descritos anteriormente, cualquiera del primer miembro de unión específica, el segundo miembro de unión específica, el tercer miembro de unión específica o el cuarto miembro de unión específica o más (dependiendo de si se están detectando múltiples biomarcadores), cualquiera que no comprenda el marcador

detectable, puede inmovilizarse en un soporte sólido.

Adicionalmente, en los métodos descritos anteriormente, cualquiera de los socios de unión específicos (como UCH-L1, GFAP u otros) pueden ser anticuerpos monoespecíficos, como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Además, en los métodos descritos anteriormente, la muestra biológica no requiere dilución. Por ejemplo, en los métodos descritos anteriormente, la muestra biológica puede seleccionarse del grupo que consiste en una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de líquido cefalorraquídeo y una muestra de plasma. En los métodos descritos anteriormente, la muestra biológica es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 microlitros.

Además, en los métodos descritos anteriormente, el método se realiza en un tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 minutos. Alternativamente, el método se realiza en aproximadamente 15 minutos. Alternativamente, el método se realiza en menos de aproximadamente 30 minutos, como en menos de aproximadamente 25 minutos, en menos de aproximadamente 20 minutos o en menos de aproximadamente 15 minutos.

Adicionalmente, en los métodos descritos anteriormente, puede no conocerse el tiempo entre el momento en que se obtiene la muestra biológica y el momento en que el sujeto puede haber sufrido una lesión en la cabeza. Alternativamente, el tiempo entre el momento en que se obtiene la muestra biológica y el momento en que el sujeto puede haber sufrido una lesión en la cabeza puede seleccionarse del grupo que consiste en de cero a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 24 a aproximadamente 36 horas, de aproximadamente 36 a aproximadamente 48 horas, de aproximadamente 48 a aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 72 a aproximadamente 96 horas, de aproximadamente 96 a aproximadamente 120 horas, de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 mes, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses, de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 6 meses, de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 1 año a aproximadamente 3 años, de aproximadamente 3 años a aproximadamente 6 años, de aproximadamente 6 años a aproximadamente 12 años, de aproximadamente 12 años a aproximadamente 20 años, de aproximadamente 20 años a aproximadamente 30 años, y de aproximadamente 30 años a aproximadamente 50 años. Alternativamente, el tiempo transcurrido entre el momento en el que se obtiene la muestra biológica y el momento en que el sujeto puede haber sufrido una lesión en la cabeza puede seleccionarse del grupo que consiste en menos de 50 años, menos de 30 años, menos de 20 años, menos de 12 años, menos de 6 años, menos de 3 años, menos de 1 año, menos de aproximadamente 6 meses, menos de aproximadamente 3 meses, menos de aproximadamente 1 mes, menos de aproximadamente 7 días, menos de aproximadamente 120 horas, menos de aproximadamente 96 horas, menos de aproximadamente 72 horas, menos de aproximadamente 48 horas, menos de aproximadamente 36 horas, menos de aproximadamente 24 horas o menos de aproximadamente 12 horas.

En los métodos anteriores, el método puede realizarse para confirmar la aparición de una lesión cerebral traumática o la ausencia de lesión cerebral traumática. Por ejemplo, el método puede usarse para ayudar en el diagnóstico, determinar el riesgo, confirmar, evaluar y/o pronosticar una lesión cerebral traumática o la ausencia de lesión cerebral traumática en un sujeto. En los métodos anteriores, la lesión cerebral traumática puede ser una lesión cerebral traumática leve.

En los métodos anteriores, el contacto puede realizarse simultáneamente. Alternativamente, el contacto puede realizarse de secuencialmente.

En los métodos anteriores, el estado puede evaluarse midiendo el nivel o la cantidad de UCH-L1 en un único punto temporal. Alternativamente, en los métodos anteriores, el estado de UCH-L1 del sujeto puede evaluarse midiendo el nivel o la cantidad de UCH-L1 en múltiples puntos temporales.

En cualquiera de los métodos anteriores, el primer miembro de unión específico y el segundo miembro de unión específico se unen a la UCH-L1 humana.

En cualquiera de los métodos anteriores, el primer miembro de unión específica, el segundo miembro de unión específica, el tercer miembro de unión específica, el cuarto miembro de unión específica, etc., pueden ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en cualquiera de los métodos anteriores, el primer miembro de unión específica, el segundo miembro de unión específica, el tercer miembro de unión específica, el cuarto miembro de unión específica, etc. pueden ser cada uno un anticuerpo monoespecífico, tal como un anticuerpo monoclonal, que se une a UCH-L1 humano.

Cada uno de los métodos descritos anteriormente puede llevarse a cabo en un dispositivo de punto de atención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra una curva de calibración de UCH-L1.

La FIG. 2 muestra la distribución de muestras de UCH-L1 en donantes normales.

La FIG. 3 muestra los perfiles de biomarcadores de UCH-L1. Los puntos temporales son los descritos en el Ejemplo 3.

La FIG. 4 muestra gráficos de caja que muestran una amplia distribución de los resultados de UCH-L1 en toda la población de pacientes. Los puntos temporales de muestra son los mismos que en la FIG. 3.

La FIG. 5 muestra las concentraciones esperadas frente a las observadas de UCH-L1 en la Dilución 1 (como se describe en el Ejemplo 1).

La FIG. 6 muestra las concentraciones esperadas frente a las observadas de UCH-L1 en la Dilución 2 (como se describe en el Ejemplo 1).

La FIG. 7 muestra las concentraciones esperadas frente a las observadas de UCH-L1 en la Dilución 3 con curva de calibración ampliada (como se describe en el Ejemplo 1).

La FIG. 8 muestra una correlación de muestras de UCH-L1 en donantes potenciales de TBI.

La FIG. 9 muestra una correlación de muestras de UCH-L1 en donantes normales.

La FIG. 10 muestra una correlación de muestras de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en donantes potenciales de TBI.

La FIG. 11 muestra una correlación de muestras de GFAP en donantes normales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se refiere a ensayos mejorados para ayudar en la detección, análisis o detección y análisis de los niveles de GFAP en una muestra biológica o de prueba los niveles de UCH-L1 en una muestra biológica o de prueba. Los ensayos mejorados descritos en la presente pueden ser cualquier tipo de ensayo conocido en la técnica. Un tipo preferido de ensayo es un inmunoensayo. Los ensayos mejorados pueden emplearse para detectar, analizar o detectar y analizar o evaluar UCH-L1 para cualquier fin. En una realización, los ensayos mejorados pueden usarse para detectar, analizar, detectar y analizar o evaluar los niveles de UCH-L1 en una muestra biológica o de prueba para ayudar rápidamente en el diagnóstico de una lesión cerebral traumática (TBI), monitorizar la progresión y/o predecir el resultado en sujetos que o se sospecha que han sufrido una lesión en la cabeza o que han sufrido una lesión real en la cabeza.

Sorprendentemente, los inmunoensayos mejorados pueden utilizarse para medir o evaluar UCH-L1 a niveles bajos en una muestra biológica en un amplio intervalo de concentraciones y proporcionar, por tanto, un ensayo más versátil y sensible, por ejemplo, para ayudar a diagnosticar y distinguir TBI en un paciente. En particular, el intervalo aumentado de concentración de los inmunoensayos divulgados proporciona un ensayo más preciso y sensible y puede usarse opcionalmente para ayudar en el diagnóstico y distinción de la lesión cerebral traumática en un paciente. Por tanto, los inmunoensayos divulgados pueden usarse para determinar concentraciones aumentadas o disminuidas de UCH-L1 a niveles bajos o más altos de UCH-L1 en una muestra diluida o no diluida en comparación con una muestra de control o calibradora, y por lo tanto pueden usarse opcionalmente para identificar TBI en un paciente. Además, los inmunoensayos divulgados son lineales a lo largo del intervalo dinámico del ensayo. Además, los inmunoensayos divulgados tienen un intervalo dinámico igual o menor de cinco logaritmos (concretamente, 5-25.000). El uso del inmunoensayo de UCH-L1 puede, por ejemplo, proporcionar una ayuda precisa en el diagnóstico exacto y posterior tratamiento de pacientes con lesión cerebral traumática. Los inmunoensayos de UCH-L1 mejorados también pueden usarse en combinación con un inmunoensayo de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) mejorado para ayudar en el diagnóstico y distinguir el estado de un paciente (como una medida de lesión cerebral traumática o por otras razones clínicas). En un aspecto, los inmunoensayos de UCH-L1 y GFAP se realizan en un formato multiplex. Los métodos para realizar formatos multiplex son bien conocidos en la técnica. Los ensayos del estado de la técnica, como los inmunoensayos, usados para determinar los niveles de UCH-L1 en una muestra biológica o de prueba pueden no ser capaces de detectar niveles de UCH-L1 que estén fuera del intervalo dinámico de los ensayos mejorados descritos en la presente. Cuando se produce esto, los niveles de UCH-L1 tienen que volver a medirse después de la dilución (por ejemplo, en el caso de que la concentración de la muestra supere el límite superior de detección), o usando volúmenes de muestra mayores (por ejemplo, en el caso de que las concentraciones de UCH-L1 medidas estén por debajo del límite de detección (LoD)). Estas nuevas mediciones son problemáticas debido al gasto adicional en el que se incurre, así como a la pérdida de tiempo, y ambas cosas son problemáticas en particular cuando el ensayo se usa para ayudar en el diagnóstico de, diagnosticar, monitorizar la progresión o predecir el resultado en sujetos que se sospecha o que han sufrido una TBI real (u otra enfermedad, trastorno o afección crítica asociada a UCH-L1), donde la detección rápida, precisa y rentable es crítica. Por lo tanto, los ensayos mejorados que aumentan o amplían el intervalo dinámico de los ensayos conocidos en la técnica reducirían el número de repeticiones y permitirían la ayuda rápida, precisa y rentable en el diagnóstico de pacientes, incluyendo aquellos con lesión cerebral traumática, en sujetos que lo necesiten.

Los ensayos de la presente divulgación presentan una serie de mejoras con respecto a los ensayos conocidos en la técnica. Específicamente, los ensayos de la presente divulgación presentan un intervalo dinámico y sensibilidad aumentados. En un aspecto, los ensayos de la presente divulgación presentan un límite inferior de detección (LoD) de aproximadamente 1 pg/ml, 5 pg/ml, aproximadamente 10 pg/ml, aproximadamente 15 pg/ml, aproximadamente 20 pg/ml, aproximadamente 25 pg/ml o aproximadamente 30 pg/ml. Además, los ensayos de la presente divulgación

presentan un intervalo dinámico igual o menor a cinco logaritmos (es decir, 5 pg/ml-50.000 pg/ml). Un ejemplo de un ensayo mejorado de la presente divulgación es un inmunoensayo que tiene un LOD de aproximadamente 10 pg/ml o aproximadamente 20 pg/ml. Otro ejemplo de ensayo mejorado es un inmunoensayo con un intervalo dinámico igual o inferior a cinco logaritmos. La sensibilidad mejorada del extremo inferior de los ensayos de la presente divulgación evita el problema de nuevas mediciones de las muestras analizado anteriormente en la presente. Además, las muestras biológicas o de prueba usadas en los ensayos de la presente divulgación no requieren dilución.

Además, los ensayos mejorados de la presente divulgación pueden realizarse o llevarse a cabo rápidamente, y proporcionar resultados en menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 6 minutos, menos de aproximadamente 7 minutos, menos de aproximadamente 8 minutos, menos de aproximadamente 9 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 11 minutos, menos de aproximadamente 12 minutos, menos de aproximadamente 13 minutos, menos de aproximadamente 14 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, menos de aproximadamente 16 minutos, menos de aproximadamente 17 minutos, menos de aproximadamente 18 minutos, menos de aproximadamente 19 minutos y menos de aproximadamente 20 minutos desde que se inicia o comienza el ensayo. Un ejemplo de un ensayo mejorado de la presente divulgación es un inmunoensayo que proporciona un resultado en menos de aproximadamente 10 minutos desde que se inicia o comienza. Otro ejemplo de un ensayo mejorado de la presente divulgación es un inmunoensayo que tiene un LoD de aproximadamente 10 pg/ml y que proporciona un resultado en menos de 10 minutos. Otro ejemplo de un ensayo mejorado de la presente divulgación es un inmunoensayo que tiene un LoD de aproximadamente 20 pg/ml y que proporciona un resultado en menos de 10 minutos.

Como los ensayos de la presente divulgación se realizan y proporcionan resultados rápidamente, se controla la cantidad de señal producida por el ensayo y se reduce la sobresaturación de la señal. Como dicha sobresaturación de la señal se reduce en comparación con los ensayos conocidos en la técnica, los ensayos de la presente divulgación presentan un efecto gancho menor o reducido en comparación con otros ensayos conocidos en la técnica.

Los ensayos mejorados de la presente divulgación, cuando se usan para medir o evaluar UCH-L1 a niveles bajos en una muestra biológica en una amplia gama de concentraciones, proporcionan un ensayo más versátil y sensible para evaluar la lesión cerebral traumática que los ensayos conocidos actualmente en la técnica. Como resultado, el intervalo de concentración aumentado de los ensayos divulgados proporciona un ensayo más preciso y sensible para ayudar en el diagnóstico y distinguir la lesión cerebral traumática en un paciente. Por tanto, los ensayos mejorados de la presente divulgación pueden usarse para determinar concentraciones aumentadas o disminuidas de UCH-L1 a niveles bajos o altos de UCH-L1 en una muestra diluida o no diluida en comparación con una muestra de control o calibradora, y por tanto pueden usarse para identificar TBI en un paciente.

Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que hay una serie de razones que contribuyen y dan como resultado los sorprendentes ensayos mejorados de la presente divulgación. Una razón clave parece ser la reducción del tiempo de ensayo, reduciendo de este modo la probabilidad del efecto gancho. El efecto gancho (o fenómeno de prozona) también puede evitarse por otros medios conocidos en la técnica (por ejemplo, aumentando la concentración de conjugado), algunos de los cuales pueden destruir la sensibilidad del extremo inferior de un ensayo. Sin embargo, en este caso se tuvo cuidado de mantener la sensibilidad del extremo inferior del ensayo, por ejemplo, mediante la optimización de la concentración de los reactivos usados en el ensayo. Además, se tuvo cuidado en el cribado y la selección de anticuerpos que tuvieran diferentes especificidades de unión para UCH-L1, permitiendo que los anticuerpos se unieran a diferentes sitios y, por lo tanto, se emplearan o para la captura o para la detección. Dicha optimización puede realizarse usando técnicas habituales en la técnica.

Los encabezamientos de sección usados en esta sección y en toda la divulgación tienen meramente propósitos organizativos y no se pretende que sean limitativos.

1. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones. A continuación, se describen los métodos y materiales preferidos, aunque en la práctica o en los pruebas de la presente divulgación pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente. Los materiales, métodos y ejemplos divulgados en la presente son meramente ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Los términos "comprende o comprenden", "incluye o incluyen", "que tiene", "tiene" "puede", "contiene o contienen" y variantes de los mismos, como se usan en la presente, se pretende que sean frases, términos o palabras transitorias abiertas que no excluyen la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La presente divulgación también contempla otras realizaciones "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" las realizaciones o elementos presentados en la presente, tanto si se exponen explícitamente como si no.

Para la enumeración de intervalos numéricos en la presente, se contempla explícitamente cada número intermedio con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo de 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

El término "anticuerpo madurado por afinidad" se usa en la presente para referirse a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR, que dan como resultado una mejora en la afinidad (es decir, K_D , k_d o k_a) del anticuerpo para un antígeno diana en comparación con un anticuerpo original, que no posee la alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. En la técnica se conocen una variedad de procedimientos para producir anticuerpos madurados por afinidad, incluyendo el cribado de una biblioteca combinatoria de anticuerpos que se ha preparado usando bio-presentación. Por ejemplo, Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante trasposición de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos marco se describe en Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). La mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectiva y en posiciones de contacto o hipermutación con un residuo de aminoácido potenciador de la actividad se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.914.128 B1.

"Anticuerpo" y "anticuerpos", como se usan en la presente, se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos mono-específicos (por ejemplo, que pueden ser monoclonales, o también pueden producirse por otros medios que no sean producirlos a partir de una célula germinal común), anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), anticuerpos de animales como, pero no limitados a, un ave (por ejemplo, un pato o un ganso), un tiburón, una ballena y un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, una cobaya, un gato, un perro, una rata, un ratón, etc.) o un primate no humano (por ejemplo, un mono, un chimpancé, etc.), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena sencilla ("scFv"), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, Fvs enlazados a disulfuro ("sdFv"), y anticuerpos anti-idiotípicos ("anti-Id"), anticuerpos de doble dominio, anticuerpos de doble dominio variable (DVD) o triple dominio variable (TVD) (las inmunoglobulinas de doble dominio variable y los métodos para elaborarlas se describen en Wu, C., et al., *Nature Biotechnology*, 25(11):1290-1297 (2007) y la Solicitud Internacional de PCT WO 2001/058956, o anticuerpos de dominio (dAbs) (por ejemplo, como los descritos en Holt et al., (2014) *Trends in Biotechnology* 21:484-490), e incluyendo anticuerpos de dominio único sdAbs que se producen de manera natural, por ejemplo, como en peces cartilaginosos y camélidos, o que son sintéticos, por ejemplo, nanocuerpos, VHH, u otra estructura de dominio), y fragmentos de unión a epítopos funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, concretamente, moléculas que contienen un sitio de unión a un analito. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Para simplificar, un anticuerpo contra un analito se denomina frecuentemente en la presente "anticuerpo antianalito" o simplemente "anticuerpo de analito" (por ejemplo, anticuerpo anti-UCH-L1 o anticuerpo contra UCH-L1).

"Fragmento de anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable. La porción no incluye los dominios constantes de cadena pesada (es decir, CH2, CH3 o CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, diacuerpos, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), polipéptidos de cadena sencilla que contienen sólo un dominio variable de cadena ligera, polipéptidos de cadena sencilla que contienen las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, polipéptidos de cadena sencilla que contienen sólo una región variable de cadena pesada y polipéptidos de cadena sencilla que contienen las tres CDR de la región variable de cadena pesada.

El "área bajo la curva" o "AUC" se refiere al área bajo una curva ROC. El AUC bajo una curva ROC es una medida de la precisión. Un AUC de 1 representa una prueba perfecta, mientras que un AUC de 0,5 representa una prueba insignificante. Un AUC preferida puede ser por lo menos aproximadamente 0,700, por lo menos aproximadamente 0,750, por lo menos aproximadamente 0,800, por lo menos aproximadamente 0,850, por lo menos aproximadamente 0,900, por lo menos aproximadamente 0,910, por lo menos aproximadamente 0,920, por lo menos aproximadamente 0,930, por lo menos aproximadamente 0,940, por lo menos aproximadamente 0,950, por lo menos aproximadamente 0,960, por lo menos aproximadamente 0,970, por lo menos aproximadamente 0,980, por lo menos aproximadamente 0,990, o por lo menos aproximadamente 0,995. "Perla" y "partícula" se usan indistintamente en la presente y se refieren a un soporte sólido sustancialmente esférico. Un ejemplo de perla o partícula es una micropartícula. Las micropartículas que pueden usarse en la presente pueden ser de cualquier tipo conocido en la técnica. Por ejemplo, la perla o partícula puede ser una perla magnética o una partícula magnética. Las perlas/partículas magnéticas pueden ser ferromagnéticas, ferrimagnéticas, paramagnéticas, superparamagnéticas o

ferrofluidicas. Los materiales ferromagnéticos ejemplares incluyen Fe, Co, Ni, Gd, Dy, CrO₂, MnAs, MnBi, EuO y NiO/Fe. Ejemplos de materiales ferrimagnéticos incluyen NiFe₂O₄, CoFe₂O₄, Fe₃O₄ (o FeO·Fe₂O₃). Las perlas pueden tener una parte de núcleo sólido que es magnético rodeado por una o más capas no magnéticas. Alternativamente, la parte magnética puede ser una capa alrededor de un núcleo no magnético. Las micropartículas pueden ser de cualquier tamaño que funcione en los métodos descritos en la presente, por ejemplo, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 nm, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nm, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nm. Las micropartículas pueden ser de cualquier tamaño que funcione en los métodos descritos en la presente, por ejemplo, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 nm, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nm, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nm.

"Proteína de unión" se usa en la presente para referirse a una proteína monomérica o multimérica que se une y forma un complejo con un compañero de unión como, por ejemplo, un polipéptido, un antígeno, un compuesto químico u otra molécula, o un sustrato de cualquier tipo. Una proteína de unión se une específicamente a un compañero de unión. Las proteínas de unión incluyen anticuerpos, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos y otras formas y derivados de los mismos como se conoce en la técnica y se describe en la presente a continuación, y otras moléculas que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno que se unen a una molécula de antígeno o a un sitio particular (epítipo) en la molécula de antígeno. Por consiguiente, una proteína de unión incluye, entre otros, un anticuerpo, una inmunoglobulina tetramérica, una molécula de IgG, una molécula de IgG1, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo madurado por afinidad y fragmentos de cualquiera de tales anticuerpos que conserven la capacidad de unirse a un antígeno.

"Anticuerpo biespecífico" se usa en la presente para referirse a un anticuerpo de longitud completa que se genera mediante la tecnología cuadroma (véase Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (véase Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)), o mediante enfoques botón en agujero o similares, que introducen mutaciones en la región Fc (véase Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), dando como resultado múltiples especies diferentes de inmunoglobulinas de las que sólo una es el anticuerpo biespecífico funcional. Un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítipo) en uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC), y se une a un antígeno (o epítipo) diferente en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). Según esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión al antígeno distintos (tanto en especificidad como en secuencias CDR), y es monovalente para cada antígeno al que se une.

"CDR" se usa en la presente para referirse a la "región determinante de la complementariedad" dentro de la secuencia variable de un anticuerpo. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera. Partiendo del extremo N-terminal de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denominan "CDR1", "CDR2" y "CDR3" para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR", como se usa en la presente, se refiere a un grupo de tres CDR que aparecen en una única región variable que se une al antígeno. Por lo tanto, un sitio de unión a antígeno puede incluir seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) puede denominarse "unidad de reconocimiento molecular". Los análisis cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo han demostrado que los residuos de aminoácidos de las CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en donde el contacto más extenso con el antígeno es con la CDR3 de la cadena pesada. Por tanto, las unidades de reconocimiento molecular pueden ser las principales responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno. En general, los residuos CDR están directa y sustancialmente implicados en la unión al antígeno.

Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con los diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no sólo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse "CDR de Kabat". Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); y Chothia et al., *Nature*, 342: 877-883 (1989)) descubrieron que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la estructura principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencias de aminoácidos. Estas subporciones se designaron como "L1", "L2" y "L3", o "H1", "H2" y "H3", donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse "CDR de Chothia", cuyos límites se solapan con las CDR de Kabat. Otros límites que definen las CDR que se solapan con las CDR de Kabat han sido descritos por Padlan, *FASEB J.*, 9: 133-139 (1995), y MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5): 732-745 (1996). Otras definiciones de límites de CDR más pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas de la presente, pero sin embargo se solaparán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o descubrimientos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR enteras no afectan significativamente a la unión a antígeno. Los métodos usados en la presente pueden utilizar las CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas realizaciones usan las CDR definidas por Kabat o Chothia.

"Coeficiente de variación" (CV), también conocido como "variabilidad relativa", es igual a la desviación

estándar de una distribución dividida por su media.

"Componente," "componentes," o "por lo menos un componente," se refieren de manera general a un anticuerpo de captura, una detección o conjugado un calibrador, un control, un panel de sensibilidad, un recipiente, un tampón, un diluyente, una sal, una enzima, un cofactor para una enzima, un reactivo de detección, un reactivo/solución de pretratamiento, un sustrato (por ejemplo, como solución), una solución de detención, y similares que pueden incluirse en un kit para el ensayo de una muestra de prueba, como una muestra de orina, sangre completa, suero o plasma de un paciente, de acuerdo con los métodos descritos en la presente y otros métodos conocidos en la técnica. Algunos componentes pueden estar en solución o liofilizados para su reconstitución para su uso en un ensayo.

"Exploración CT", como se usa en la presente, se refiere a una exploración de tomografía computarizada (CT). Una exploración CT combina una serie de imágenes de rayos X tomadas desde distintos ángulos y usa procesamiento informático para crear imágenes transversales, o cortes, de los huesos, vasos sanguíneos y tejidos blandos del interior del cuerpo. La exploración CT puede usar CT por rayos X, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT), tomografía axial computarizada (CAT) o tomografía asistida por ordenador. La exploración CT puede ser exploración CT convencional o exploración CT espiral/helicoidal. En una exploración por CT convencional, la exploración se realiza corte a corte y, después de cada corte, la exploración se detiene y desciende al siguiente corte, por ejemplo, desde la parte superior del abdomen hasta la pelvis. La CT convencional requiere que los pacientes contengan la respiración para evitar artefactos de movimiento. La exploración CT espiral/helicoidal es una exploración continua que se realiza en espiral y es un proceso mucho más rápido en el que las imágenes escaneadas son contiguas.

"Derivado" de un anticuerpo, como se usa en la presente, puede referirse a un anticuerpo que tiene una o más modificaciones en su secuencia de aminoácidos en comparación con un anticuerpo genuino u original, y que presenta una estructura de dominio modificada. El derivado puede seguir adoptando la configuración de dominio típica que se encuentra en los anticuerpos nativos, así como una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a dianas (antígenos) con especificidad. Ejemplos típicos de derivados de anticuerpos son anticuerpos acoplados a otros polipéptidos, dominios de anticuerpos reorganizados o fragmentos de anticuerpos. El derivado también puede comprender por lo menos un compuesto adicional, por ejemplo, un dominio proteico, dicho dominio proteico estando enlazado por enlaces covalentes o no covalentes. El enlace puede basarse en la fusión genética de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo puede estar enlazado preferiblemente por un conector flexible, ventajosamente un conector peptídico, en donde dicho conector peptídico comprende aminoácidos plurales, hidrófilos, unidos por péptidos, de una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal del dominio proteico adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo o viceversa. El anticuerpo puede estar enlazado a una molécula efectora que tenga una conformación adecuada para la actividad biológica o la unión selectiva a un soporte sólido, una sustancia biológicamente activa (por ejemplo, una citoquina u hormona de crecimiento), un agente químico, un péptido, una proteína o un fármaco, por ejemplo.

"Drogas de abuso" se usa en la presente para referirse a una o más sustancias adictivas (como una droga) tomadas por razones no médicas (como, por ejemplo, para efectos recreativos y/o de alteración de la mente). El abuso excesivo, el uso o la dependencia de dichas drogas de abuso se denomina a menudo "abuso de sustancias". Los ejemplos de drogas de abuso incluyen el alcohol, los barbitúricos, las benzodiacepinas, el cannabis, la cocaína, los alucinógenos (como la ketamina, la mescalina (peyote), la PCP, la psilocibina, la DMT y/o el LSD), la metacualona, los opiáceos, las anfetaminas (incluyendo las metanfetaminas), esteroides anabolizantes, inhalantes (concretamente, sustancias que contienen sustancias volátiles con propiedades psicoactivas como, por ejemplo, nitritos, pinturas en aerosol, líquidos de limpieza, rotuladores, pegamentos, etc.) y combinaciones de los mismos.

"Anticuerpo de especificidad dual" se usa en la presente para referirse a un anticuerpo de longitud completa que puede unirse a dos antígenos (o epítopos) diferentes en cada uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC) (véase la publicación de PCT WO 02/02773). Por consiguiente, una proteína de unión específica dual tiene dos brazos de unión a antígeno idénticos, con idéntica especificidad e idénticas secuencias de CDR, y es bivalente para cada antígeno al que se une.

"Dominio variable dual" se usa en la presente para referirse a dos o más sitios de unión a antígenos en una proteína de unión, que pueden ser proteínas de unión divalentes (dos sitios de unión a antígenos), tetravalentes (cuatro sitios de unión a antígenos) o multivalentes. Los DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno (o un epítopo específico), o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos (es decir, dos o más epítopos de la misma molécula de antígeno diana o dos o más epítopos de antígenos diana diferentes). Una proteína de unión a DVD preferida comprende dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera y se denomina "inmunoglobulina DVD" o "DVD-Ig". Dicha proteína de unión a DVD-Ig es, por tanto, tetramérica y recuerda a una molécula IgG, pero proporciona más sitios de unión a antígenos que una molécula IgG. Por tanto, cada mitad de una molécula de DVD-Ig tetramérica es reminiscente de una mitad de una molécula IgG y comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada y un polipéptido de DVD de cadena ligera, pero a diferencia de un par de cadenas pesada y ligera de una molécula de IgG que proporciona un único dominio de unión a antígeno, un par de cadenas pesada y ligera de una DVD-Ig proporciona dos o más sitios de unión a antígeno.

Cada sitio de unión a antígeno de una proteína de unión a DVD-Ig puede derivarse de un anticuerpo monoclonal donante ("parental") y, por lo tanto, comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) con un total de seis CDR implicadas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno. Por consiguiente, una proteína de unión a DVD-Ig que se une a dos epítomos diferentes (es decir, dos epítomos diferentes de dos moléculas de antígeno diferentes o dos epítomos diferentes de la misma molécula de antígeno) comprende un sitio de unión a antígeno derivado de un primer anticuerpo monoclonal parental y un sitio de unión a antígeno de un segundo anticuerpo monoclonal parental.

Una descripción del diseño, la expresión y la caracterización de moléculas de unión a DVD-Ig se proporciona en la Publicación de PCT N° WO 2007/024715, Patente de Estados Unidos N° 7.612.181, y Wu et al., *Nature Biotech*, 25: 1290-1297 (2007). Un ejemplo preferido de tales moléculas de DVD-Ig comprende una cadena pesada que comprende la fórmula estructural $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un conector con la condición de que no sea CH1, X2 es una región Fc, y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1; y una cadena ligera que comprende la fórmula estructural $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un conector con la condición de que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc; y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1. Tal DVD-Ig puede comprender dos de tales cadenas pesadas y dos de tales cadenas ligeras, en donde cada cadena comprende dominios variables enlazados en tándem sin una región constante intermedia entre las regiones variables, en donde una cadena pesada y una cadena ligera se asocian para formar sitios funcionales de unión a antígeno en tándem, y un par de cadenas pesadas y ligeras puede asociarse con otro par de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con cuatro sitios funcionales de unión a antígeno. En otro ejemplo, una molécula de DVD-Ig puede comprender cadenas pesadas y ligeras que comprenden cada una tres dominios variables (VD1, VD2, VD3) enlazados en tándem sin una región constante intermedia entre los dominios variables, en donde un par de cadenas pesadas y ligeras puede asociarse para formar tres sitios de unión a antígeno, y en donde un par de cadenas pesadas y ligeras puede asociarse con otro par de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con seis sitios de unión a antígeno.

En una realización preferida, una proteína de unión a DVD-Ig no sólo se une a las mismas moléculas diana unidas por sus anticuerpos monoclonales parentales, sino que también posee una o más propiedades deseables de uno o más de sus anticuerpos monoclonales parentales. Preferiblemente, dicha propiedad adicional es un parámetro de anticuerpo de uno o más de los anticuerpos monoclonales parentales. Los parámetros de anticuerpo que pueden aportarse a una proteína de unión a DVD-Ig de uno o más de sus anticuerpos monoclonales parentales incluyen, entre otros, especificidad de antígeno, afinidad de antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítipo, estabilidad de proteína, solubilidad de proteína, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada tisular y unión a antígeno ortólogo.

Una proteína de unión a DVD-Ig se une por lo menos a un epítipo de UCH-L1. Ejemplos no limitativos de una proteína de unión a DVD-Ig incluyen una proteína de unión a DVD-Ig que se une a uno o más epítomos de UCH-L1, una proteína de unión a DVD-Ig que se une a un epítipo de una UCH-L1 humana y a un epítipo de UCH-L1 de otra especie (por ejemplo, ratón), y una proteína de unión a DVD-Ig que se une a un epítipo de una UCH-L1 humana y a un epítipo de otra molécula diana.

"Intervalo dinámico" como se usa en la presente se refiere al intervalo a lo largo del cual la lectura de un ensayo es proporcional a la cantidad de molécula diana o analito presente en la muestra analizada. El intervalo dinámico puede ser el intervalo de linealidad de la curva estándar.

"Epítipo" o "epítomos" o "epítomos de interés" se refieren a un sitio o sitios de cualquier molécula que se reconocen y pueden unirse a un sitio o sitios complementarios de su compañero de unión específica. La molécula y el compañero de unión específica forman parte de un par de unión específica. Por ejemplo, un epítipo puede estar en un polipéptido, una proteína, un hapteno, un antígeno de carbohidrato (como, entre otros, glicolípidos, glicoproteínas o lipopolisacáridos) o un polisacárido. Su compañero de unión específica puede ser, entre otros, un anticuerpo.

"Ventana de detección ampliada", como se usa en la presente, se refiere al hecho de que los métodos mejorados descritos y/o reivindicados pueden llevarse a cabo en o bajo una variedad de escenarios clínicos en comparación con otros ensayos de UCH-L1. Por ejemplo, los métodos de la presente divulgación pueden llevarse a cabo en cualquier sujeto independientemente de factores seleccionados del grupo que consiste en la condición clínica del sujeto (por ejemplo, si hay o no afecciones comórbidas además del motivo de comprobación de UCH-L1, o si se está evaluando alguna situación clínica distinta de TBI), los valores de laboratorio del sujeto (por ejemplo, valores de laboratorio distintos de los niveles de UCH-L1, incluyendo, entre otros, los valores de las pruebas de laboratorio estándar que se realizan para evaluar el estado de salud general de un paciente, y los valores de pruebas más específicas que se realizan cuando se sospecha que un sujeto ha sufrido un accidente o ha estado expuesto a algún tipo de traumatismo, incluyendo, entre otros, los que pueden dar como resultado una lesión provocar un traumatismo craneoencefálico), la clasificación del sujeto como afectado por una TBI leve, moderada o grave, la presentación del

sujeto (por ejemplo, demostración o posesión) de niveles bajos o altos de UCH-L1, y la cadencia de cualquier suceso (por ejemplo, en relación con la prueba) en el que el sujeto pueda haber sufrido una lesión en la cabeza. La ventana de detección ampliada de los métodos reivindicados difiere de otros métodos conocidos en el estado de la técnica que pueden o requieren dilución, o alternativamente, pueden carecer de uno o más de los beneficios de los ensayos mejorados descritos en la presente (por ejemplo, medida de hasta 25.000 pg/ml, intervalo dinámico de 5 log, linealidad del ensayo sobre el intervalo dinámico, medida de UCH-L1 en un volumen menor de 20 microlitros de muestra, ventana de detección ampliada, etc.).

"Fragmento de unión a antígeno" o "fragmento Fab", como se usa en la presente, se refiere a un fragmento de un anticuerpo que se une a antígenos y que contiene un sitio de unión a antígeno, una cadena ligera completa y parte de una cadena pesada. Fab es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1. Fab se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. El dominio variable contiene el paratopo (el sitio de unión al antígeno), que comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad, en el extremo terminal amino del monómero. Cada brazo de la Y se une por tanto a un epítipo del antígeno. Los fragmentos Fab pueden generarse como se ha descrito en la técnica, por ejemplo, usando la enzima papaína, que puede usarse para escindir un monómero de inmunoglobulina en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc, o pueden producirse por medios recombinantes.

"Fragmento F(ab')₂" como se usa en la presente se refiere a anticuerpos generados por digestión con pepsina de anticuerpos de IgG completos para eliminar la mayor parte de la región Fc a la vez que se deja intacta parte de la región bisagra. Los fragmentos F(ab')₂ tienen dos porciones F(ab) de unión al antígeno enlazadas por enlaces disulfuro y, por lo tanto, son divalentes con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa. Los fragmentos de anticuerpos divalentes (fragmentos F(ab')₂) son más pequeños que las moléculas IgG completas y permiten una mejor penetración en el tejido, facilitando por tanto un mejor reconocimiento del antígeno en inmunohistoquímica. El uso de fragmentos F(ab')₂ también evita la unión inespecífica al receptor Fc en células vivas o a la proteína A/G. Los fragmentos F(ab')₂ pueden unirse y precipitar antígenos.

"Marco" (FR) o "Secuencia marco", como se usa en la presente, puede significar las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas (por ejemplo, véase más arriba), el significado de una secuencia marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, -L2, y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3, y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se sitúa entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como se denomina en otros casos, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Como se usa en la presente, una FR representa una de las cuatro subregiones, y FR representa dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco.

En la técnica se conocen secuencias de FR humanas de cadena pesada y cadena ligera que pueden usarse como secuencias marco "aceptoras" de cadena pesada y cadena ligera (o simplemente, secuencias "aceptoras") para humanizar un anticuerpo no humano usando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humanas se seleccionan entre las secuencias marco enumeradas en bases de datos disponibles públicamente como V-base (protocolo de transferencia de hipertexto://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) o en el sistema de información internacional ImMunoGeneTics® (IMGT®) (protocolo de transferencia de hipertexto://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/).

"Sitio de unión a antígeno funcional", como se usa en la presente, puede significar un sitio en una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de unión a antígeno del sitio de unión a antígeno puede no ser tan fuerte como la proteína de unión original, por ejemplo, el anticuerpo original, del que se deriva el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unión a antígeno debe ser medible usando cualquiera de los varios métodos conocidos para evaluar la unión de proteínas, por ejemplo, anticuerpos, a un antígeno. Además, en la presente la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de una proteína multivalente, por ejemplo, un anticuerpo multivalente, no tiene por qué ser cuantitativamente la misma.

"GFAP" se usa en la presente para describir la proteína ácida fibrilar glial. La GFAP es una proteína codificada por el gen GFAP en humanos y que puede producirse (por ejemplo, por medios recombinantes) en otras especies.

"Estado de GFAP" puede significar o el nivel o la cantidad de GFAP en un punto temporal (como con una única medida de GFAP), el nivel o la cantidad de GFAP asociados con la monitorización (como con una prueba repetida en un sujeto para identificar un aumento o una disminución de la cantidad de GFAP), el nivel o la cantidad de GFAP asociados con el tratamiento de una lesión cerebral traumática (ya sea una lesión cerebral primaria y/o una lesión cerebral secundaria) o combinaciones de los mismos.

"Escala de Coma de Glasgow" o "GCS", como se usa en la presente, se refiere a una escala de 15 puntos para estimar y categorizar los resultados de las lesiones cerebrales en función de la capacidad social general o la

dependencia de otros. La prueba mide la respuesta motora, la respuesta verbal y la respuesta de apertura ocular con estos valores: I. Respuesta motora (6- Obedece órdenes fluidamente; 5 - Se localiza ante estímulos nocivos; 4 - Se retira de estímulos nocivos; 3 - Flexión anormal, es decir, postura decorticada; 2 - Respuesta extensora, es decir, postura descerebrada; y 1- N o responde); II. Respuesta verbal (5 - Alerta y orientada; 4 - Habla confusa, aunque coherente; 3 - Palabras inadecuadas y frases confusas formadas por palabras; 2 - Sonidos incomprensibles; y 1 - Sin sonidos); y III. Apertura de los ojos (4 - Apertura espontánea de los ojos; 3 - Apertura de los ojos al hablar; 2 - Apertura de los ojos al sentir dolor; y 1 - Sin apertura de los ojos). La puntuación final se determina sumando los valores de I+II+III. La puntuación final puede clasificarse en cuatro posibles niveles de supervivencia, en los que un número menor indica una lesión más grave y un peor pronóstico: Leve (13-15); Discapacidad moderada (9-12) (Pérdida de conciencia de más de 30 minutos; Deficiencias físicas o cognitivas que pueden resolverse o no; y Beneficio de la rehabilitación); Discapacidad grave (3-8) (Coma: estado de inconsciencia. Sin respuesta significativa, sin actividades voluntarias); y Estado vegetativo (Menos de 3) (Ciclos de sueño-vigilia; Despertar, pero sin interacción con el entorno; Sin respuesta localizada al dolor). La lesión cerebral moderada se define como una lesión cerebral que provoca una pérdida de conciencia de 20 minutos a 6 horas y una Escala de Coma de Glasgow de 9 a 12. La lesión cerebral grave se define como una lesión cerebral que provoca una pérdida de conciencia de más de 6 horas y una Escala de Coma de Glasgow de 3 a 8.

"Escala de Resultados de Glasgow", como se usa en la presente, se refiere a una escala global de resultados funcionales que clasifica el estado del paciente en una de cinco categorías: Muerto, Estado vegetativo, Discapacidad grave, Discapacidad moderada o Buena recuperación.

"Escala de Resultados de Glasgow Ampliada" o "GOSE", como se usa indistintamente en la presente, proporciona una categorización más detallada en ocho categorías subdividiendo las categorías de discapacidad grave, discapacidad moderada y buena recuperación en una categoría inferior y otra superior, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

1	Muerte	D	
2	Estado Vegetativo	VX	Estado de inconsciencia únicamente con respuestas reflejas, pero con periodos de apertura de ojos espontánea.
3	Discapacidad grave menor	SD-	Paciente dependiente para apoyo diario por discapacidad mental o física, habitualmente una combinación de ambas. Si al paciente se le puede dejar solo más de 8 horas en casa es nivel superior de SD, si no es nivel de SD bajo.
4	Discapacidad grave superior	SD+	
5	Discapacidad moderada menor	MD-	Los pacientes tienen alguna discapacidad como afasia, hemiparesia o epilepsia y/o déficits de memoria o personalidad, pero son capaces de cuidar de sí mismos. Son independientes en casa, pero dependientes fuera. Si son capaces de volver al trabajo incluso con disposición especial es nivel superior de DM, si no, entonces es nivel bajo de DM.
6	Discapacidad moderada superior	MD+	
7	Buena recuperación menor	GR-	Reanudación de la vida normal con la capacidad para trabajar, aunque no se ha conseguido el estado anterior a la lesión. Algunos pacientes tienen déficits neurológicos o psicológicos menores. Si estos déficits no son incapacitantes entonces es nivel superior de GR, si son incapacitantes entonces se trata de un nivel menor de GR.
8	Buena recuperación superior	GR+	

"Anticuerpo humanizado" se usa en la presente para describir un anticuerpo que comprende secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en el que por lo menos una parte de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar a la humana", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo, que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en la presente, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98%, o por lo menos un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. En una realización, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una

porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena ligera, así como por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena pesada humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

Un anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y pueden seleccionarse dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Las regiones marco y las CDR de un anticuerpo humanizado no tienen por qué corresponder exactamente a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso pueden mutagenizarse mediante sustitución, inserción y/o delección de por lo menos un residuo de aminoácido de tal manera que la CDR o el residuo marco en ese sitio no corresponda ni al anticuerpo donante ni al marco consenso. En una realización preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Habitualmente, por lo menos el 80%, preferiblemente por lo menos el 85%, más preferiblemente por lo menos el 90%, y lo más preferible por lo menos el 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias FR y CDR parentales. Como se usa en la presente, el término "marco de consenso" se refiere a la región marco en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada por los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con más frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). Por tanto, una "secuencia de inmunoglobulina de consenso" puede comprender una "región o regiones marco de consenso" y/o una "CDR de consenso". En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, puede incluirse cualquiera de los dos en la secuencia de consenso. "Idéntico" o "identidad", como se usa en la presente en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o polinucleótidos puede significar que las secuencias tienen un porcentaje específico de residuos que son iguales en una región especificada. El porcentaje puede calcularse alineando óptimamente las dos secuencias, comparando las dos secuencias en la región especificada, determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. En los casos en que las dos secuencias tengan longitudes diferentes o la alineación produzca uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluya solo una única secuencia, los residuos de la secuencia única se incluirán en el denominador, pero no en el numerador del cálculo.

"Lesión en la cabeza" o "traumatismo craneoencefálico", como se usan indistintamente en la presente, se refiere a cualquier traumatismo en el cuero cabelludo, el cráneo o el cerebro. Tales lesiones pueden incluir sólo un pequeño golpe en el cráneo o pueden ser una lesión cerebral grave. Tales lesiones incluyen lesiones cerebrales primarias y/o lesiones cerebrales secundarias. Las lesiones cerebrales primarias se producen durante el traumatismo inicial y son el resultado del desplazamiento de las estructuras físicas del cerebro. Más específicamente, una lesión cerebral primaria es el daño físico al parénquima (tejido, vasos) que se produce durante el suceso traumático, dando como resultado el cizallamiento y la compresión del tejido cerebral circundante. Las lesiones cerebrales secundarias se producen después de la lesión primaria y pueden implicar una serie de procesos celulares. Más específicamente, una lesión cerebral secundaria se refiere a los cambios que evolucionan durante un periodo de tiempo (de horas a días) después de la lesión cerebral primaria. Incluye toda una cascada de cambios celulares, químicos, tisulares o vasculares en el cerebro que contribuyen a una destrucción adicional del tejido cerebral.

Una lesión en la cabeza puede ser cerrada o abierta (penetrante). Un traumatismo craneoencefálico cerrado se refiere a un traumatismo del cuero cabelludo, cráneo o cerebro en el que no hay penetración del cráneo por un objeto contundente. Un traumatismo craneoencefálico abierto se refiere a un traumatismo del cuero cabelludo, cráneo o cerebro en el que un objeto penetra en el cráneo. Una lesión en la cabeza puede deberse a una sacudida física de una persona, al impacto contundente de una fuerza mecánica externa o de otro tipo que provoque un traumatismo craneoencefálico cerrado o abierto (por ejemplo, accidente de vehículo como con un automóvil, avión, tren, etc.; golpe en la cabeza con un bate de béisbol o con un arma de fuego), accidente vascular cerebral (por ejemplo, derrame cerebral), una o más caídas (por ejemplo, en deportes u otras actividades), explosiones o estallidos (colectivamente, "lesiones por estallido") y otros tipos de traumatismos por objetos contundentes. Alternativamente, una lesión en la cabeza puede estar provocada por la ingestión y/o exposición a una sustancia química, toxina o una combinación de sustancia química y toxina. Ejemplos de tales sustancias químicas y/o toxinas incluyen incendios, mohos, amianto, pesticidas e insecticidas, disolventes orgánicos, pinturas, pegamentos, gases (como monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y cianuro), metales orgánicos (como metilmercurio, tetraetilo de plomo y estaño orgánico) y/o una o más drogas de abuso. Alternativamente, una lesión en la cabeza puede ser provocada como resultado de un sujeto que

padece una enfermedad autoinmune, un trastorno metabólico, un tumor cerebral, uno o más virus, meningitis, hidrocefalia, hipoxia o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, no es posible saber con certeza si se ha producido o ha tenido lugar algún suceso o lesión de este tipo. Por ejemplo, puede que no existan antecedentes de un paciente o sujeto, que el sujeto no pueda hablar, que el sujeto no sea consciente o no tenga información completa sobre los sucesos a los que estuvo expuesto, etc. Tales circunstancias se describen en la presente como que el sujeto "puede haber sufrido una lesión en la cabeza". En ciertas realizaciones de la presente, la lesión cerrada en la cabeza no incluye y excluye específicamente un accidente vascular cerebral, como un derrame cerebral.

"Polinucleótido aislado", como se usa en la presente, puede significar un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc o sintético, o una combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el polinucleótido aislado no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está enlazado operativamente a un polinucleótido con el que no está enlazado en la naturaleza; o no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

"Marcador" y "marcador detectable", como se usan en la presente, se refieren a una fracción unida a un anticuerpo o a un analito para hacer detectable la reacción entre el anticuerpo y el analito, y el anticuerpo o analito marcados de este modo se denomina "marcado detectablemente". Un marcador puede producir una señal detectable por medios visuales o instrumentales. Varios marcadores incluyen sustancias productoras de señales, como cromógenos, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos radiactivos y similares. Ejemplos representativos de marcadores incluyen fracciones que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y fracciones que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. En la presente se describen otros marcadores. A este respecto, la fracción en sí misma puede no ser detectable, pero puede volverse detectable al reaccionar con otra fracción. Se pretende que el uso del término "marcado detectablemente" abarque dicho marcado.

Puede usarse cualquier marcador detectable adecuado conocida en la técnica. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador radiactivo (como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm), un marcador enzimático (como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y similares), un marcador quimioluminiscente (como ésteres de acridinio, tioésteres o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridinio y similares), un marcador fluorescente (como la fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3',6'-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (por ejemplo, seleniuro de cadmio protegido con sulfuro de zinc), un marcador termométrico o un marcador de reacción en cadena de la inmuno-polimerasa. Una introducción a los marcadores, los procedimientos de marcado y la detección de marcadores puede encontrarse en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que es un manual y catálogo combinados publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg. En la FPIA puede usarse un marcador fluorescente (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 5,593,896, 5,573,904, 5,496,925, 5,359,093, y 5,352,803). Un compuesto de acridinio puede usarse como marcador detectable en un ensayo quimioluminiscente homogéneo (véase, por ejemplo, Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3917-3921 (2004); y Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003)).

En un aspecto, el compuesto de acridinio es una acridinio-9-carboxamida. Los métodos para preparar 9-carboxamidas de acridinio se describen en Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., *J. Org. Chem.* 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., *Tetrahedron* 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., *Bioconjugate Chem.* 11: 714-724 (2000); Mattingly et al., In *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Ratón, pp. 77-105 (2002); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003); y Patentes de Estados Unidos Nº 5,468,646, 5,543,524 y 5,783,699.

Otro ejemplo de compuesto de acridinio es un éster arílico de acridinio-9-carboxilato. Un ejemplo de éster arílico de acridinio-9-carboxilato de fórmula II es el fluorosulfonato de 10-metil-9-(fenoxycarbonil)acridinio (disponible de Cayman Chemical, Ann Arbor, Mich.). Los métodos para preparar ésteres arílicos de acridinio 9-carboxilato se describen en McCapra et al., *Photochem. Photobiol.* 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., *Luminescence* 15: 245-249 (2000); Razavi et al., *Luminescence* 15: 239-244 (2000); y la Patente de Estados Unidos Nº 5,241,070. Tales ésteres arílicos de acridinio-9-carboxilato son indicadores quimioluminiscentes eficientes del peróxido de hidrógeno producido en la oxidación de un analito por al menos una oxidasa en términos de la intensidad de la señal y/o la rapidez de la señal. El curso de la emisión quimioluminiscente para el éster arílico de acridinio-9-carboxilato se completa rápidamente, es decir, en menos de 1 segundo, mientras que la emisión quimioluminiscente de la acridinio-9-carboxamida se prolonga más de 2 segundos. Sin embargo, el éster arílico de acridinio-9-carboxilato pierde sus propiedades quimioluminiscentes en presencia de proteínas. Por lo tanto, su uso requiere la ausencia de proteínas durante la generación y detección de la señal. Los métodos para separar o eliminar las proteínas de la muestra son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, ultrafiltración, extracción, precipitación, diálisis, cromatografía y/o digestión (véase, por ejemplo, Wells, *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies*, Elsevier (2003)). La cantidad de proteína eliminada o separada de la muestra de prueba puede ser de aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el

55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 95%. En la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 11/697.835, presentada el 9 de abril de 2007, se exponen detalles adicionales sobre el éster arílico de acridinio-9-carboxilato y su uso. Los ésteres arílicos de acridinio-9-carboxilato pueden disolverse en cualquier disolvente adecuado, como N,N-dimetilformamida (DMF) anhidra desgasificada o colato sódico acuoso.

"Límite de muestra en blanco (LB)", como se usa en la presente, se refiere a la concentración aparente más alta de analito que se espera encontrar cuando se prueban réplicas de una muestra en blanco que no contiene analito.

"Límite de detección (LoD)" se refiere a la concentración más baja del mensurando (es decir, la cantidad que se pretende medir) que puede detectarse con un nivel de confianza especificado. El nivel de confianza es típicamente del 95%, con una probabilidad del 5% de una medición falsa negativa. El LoD es la concentración de analito más baja que es probable que se distinga de forma fiable del LoB y en la que la detección es factible. El LoD puede determinarse utilizando tanto el LoB medido como réplicas de pruebas de una muestra que se sabe que contiene una baja concentración de analito. El término LoD usado en la presente se basa en la definición del protocolo EP17-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ("Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline - Segunda Edición", EP17A2E, por James F. Pierson-Perry et al., Clinical and Laboratory Standards Institute, 1 de junio de 2012).

"Límite de cuantificación (LoQ)", como se usa en la presente, se refiere a la concentración más baja en la que el analito no sólo puede detectarse de manera fiable, sino en la que se cumplen algunos objetivos predefinidos de sesgo e imprecisión. El LoQ puede ser equivalente al LoD o podría estar a una concentración mucho mayor.

"Linealidad" se refiere a como de bien se aproxima a una línea recta el rendimiento real del método o ensayo en un intervalo operativo especificado. La linealidad puede medirse en términos de desviación, o no linealidad, de una línea recta ideal. Las "desviaciones de la linealidad" pueden expresarse en términos de porcentaje de la escala completa. En algunos de los métodos divulgados en la presente, se consigue una desviación de la linealidad (DL) de menos del 10% sobre el intervalo dinámico del ensayo. "Lineal" significa que hay menos de o igual a aproximadamente un 20%, aproximadamente un 19%, aproximadamente un 18%, aproximadamente un 17%, aproximadamente un 16%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 14%, aproximadamente un 13%, aproximadamente un 12%, aproximadamente un 11%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 9%, o aproximadamente un 8% de variación para o sobre un intervalo o valor ejemplar mencionado.

"Secuencia de enlace" o "secuencia peptídica de enlace" se refiere a una secuencia polipeptídica natural o artificial que está conectada a una o más secuencias polipeptídicas de interés (por ejemplo, de longitud completa, fragmentos, etc.). El término "conectado" se refiere a la unión de la secuencia de enlace a la secuencia polipeptídica de interés. Tales secuencias polipeptídicas se unen preferiblemente mediante uno o más enlaces peptídicos. Las secuencias de enlace pueden tener una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 aminoácidos. Preferiblemente, la longitud de la secuencia de enlace es de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 aminoácidos. Las secuencias de enlace naturales pueden modificarse mediante sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos para crear secuencias de enlace artificiales. Las secuencias de enlace pueden usarse para muchos propósitos, incluyendo en Fabs recombinantes. Las secuencias de enlace ejemplares incluyen, pero no se limitan a: (i) Etiquetas de histidina (His), como una etiqueta His 6X, que tiene una secuencia de aminoácidos de HHHHHH (SEQ ID NO:3), son útiles como secuencias de enlace para facilitar el aislamiento y purificación de polipéptidos y anticuerpos de interés; (ii) Los sitios de escisión de enteroquinasa, como las etiquetas His, se usan en el aislamiento y purificación de proteínas y anticuerpos de interés. A menudo, los sitios de escisión de la enteroquinasa se usan junto con las etiquetas His en el aislamiento y purificación de proteínas y anticuerpos de interés. En la técnica se conocen varios sitios de escisión de enteroquinasa. Ejemplos de sitios de escisión de enteroquinasa incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de aminoácidos de DDDDK (SEQ ID NO:4) y derivados de la misma (por ejemplo, ADDDDK (SEQ ID NO:5), etc.); (iii) Pueden usarse secuencias de todo tipo para enlazar o conectar las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de fragmentos de región variable de cadena sencilla. Ejemplos de otras secuencias de enlace pueden encontrarse en Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988); Huston et al., *PNAS USA* 85: 5879-5883 (1988); y McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554 (1990). Las secuencias de enlace también pueden modificarse para funciones adicionales, como la fijación de fármacos o la fijación a soportes sólidos. En el contexto de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, puede contener una secuencia de enlace, como una etiqueta His, un sitio de escisión de enteroquinasa, o ambos.

"Anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente anticuerpos

"quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la biología deseada.

"Imagenología por resonancia magnética" o "MRI", usadas indistintamente en la presente, se refieren a una técnica de imagenología médica usada en radiología para obtener imágenes de la anatomía y los procesos fisiológicos del cuerpo, tanto en la salud como en la enfermedad. La MRI es una forma de imagenología médica que mide la respuesta de los núcleos atómicos de los tejidos corporales a las ondas de radio de alta frecuencia cuando se colocan en un campo magnético fuerte, y que produce imágenes de los órganos internos. Los escáneres de MRI, que se basan en la ciencia de la resonancia magnética nuclear (NMR), usan campos magnéticos fuertes, ondas de radio y gradientes de campo para generar imágenes del interior del cuerpo.

"Proteína de unión multivalente" se usa en la presente para referirse a una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígenos (también denominados en la presente "dominios de unión a antígenos"). Una proteína de unión multivalente se manipula preferiblemente para que tenga tres o más sitios de unión a antígenos, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión que puede unirse a dos o más dianas relacionadas o no, incluyendo una proteína de unión capaz de unirse a dos o más epítomos diferentes de la misma molécula diana.

"Valor de corte predeterminado" y "nivel predeterminado", como se usan en la presente, se refieren a un valor de corte del ensayo que se usa para evaluar los resultados de la eficacia diagnóstica, pronóstica o terapéutica mediante la comparación de los resultados del ensayo con el valor de corte/nivel predeterminado, donde el valor de corte/nivel predeterminado ya se ha vinculado o asociado con varios parámetros clínicos (por ejemplo, presencia de enfermedad, estadio de la enfermedad, gravedad de la enfermedad, progresión, no progresión o mejora de la enfermedad, etc.). La divulgación proporciona niveles predeterminados ejemplares. Sin embargo, es bien sabido que los valores de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, condiciones de reacción, pureza de la muestra, etc.). Además, está dentro de la capacidad habitual de un experto en la técnica adaptar la presente divulgación para otros inmunoensayos para obtener valores de corte específicos del inmunoensayo para esos otros inmunoensayos basándose en la descripción proporcionada por la presente divulgación. Mientras que el valor exacto del valor de corte/nivel predeterminado puede variar entre ensayos, las correlaciones descritas en la presente deberían ser de aplicación general.

"Dispositivo para el punto de atención" se refiere a un dispositivo usado para realizar pruebas de diagnóstico médico en o cerca del punto de atención (es decir, fuera de un laboratorio), en el momento y lugar en que se atiende al paciente (como en un hospital, una consulta médica, un centro de urgencias u otro centro de atención médica, el domicilio de un paciente, una residencia de ancianos y/o un centro de cuidados de larga duración y/o de cuidados paliativos). Los ejemplos de dispositivos de punto de atención incluyen los producidos por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL.) (por ejemplo, i-STAT e i-STAT Alinity), Universal Biosensors (Rowville, Australia) (véase el documento US 2006/0134713), Axis-Shield PoC AS (Oslo, Noruega) y Clinical Lab Products (Los Ángeles, USA).

"Reactivos de control de calidad" en el contexto de los inmunoensayos y kits descritos en la presente incluyen, entre otros, calibradores, controles y paneles de sensibilidad. Típicamente se usa un "calibrador" o "estándar" (por ejemplo, uno o más, como una pluralidad) para establecer curvas de calibración (estándar) para la interpolación de la concentración de un analito, como un anticuerpo o un analito. Alternativamente, puede usarse un único calibrador, que esté cerca de un valor de corte, nivel de referencia o nivel de control positivo/negativo predeterminado (por ejemplo, niveles "bajo", "medio" o "alto"). Pueden usarse múltiples calibradores (es decir, más de un calibrador o una cantidad variable de calibradores) conjuntamente para formar un "panel de sensibilidad".

Una curva "característica operativa del receptor" o curva "ROC" es una representación gráfica que ilustra el rendimiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. Por ejemplo, una curva ROC puede ser un gráfico de la tasa de verdaderos positivos frente a la tasa de falsos positivos para los distintos puntos de valor de corte posibles de una prueba diagnóstica. Se crea trazando la fracción de verdaderos positivos de los positivos (TPR=tasa de verdaderos positivos) frente a la fracción de falsos positivos de los negativos (FPR=tasa de falsos positivos), en varios ajustes de umbral. La TPR también se conoce como sensibilidad, y la FPR es uno menos la especificidad o tasa de verdaderos negativos. La curva ROC muestra el equilibrio entre sensibilidad y especificidad (cualquier aumento de la sensibilidad irá acompañado de una disminución de la especificidad); cuanto más se acerque la curva al borde izquierdo y luego al borde superior del espacio ROC, más precisa será la prueba; cuanto más se acerque la curva a la diagonal de 45 grados del espacio ROC, menos precisa será la prueba; la pendiente de la línea tangente en un punto de valor de corte da la razón de verosimilitud (LR) para ese valor de la prueba; y el área bajo la curva es una medida de la precisión de la prueba.

"Anticuerpo recombinante" y "anticuerpos recombinantes" se refieren a anticuerpos preparados mediante uno o más pasos, incluyendo la clonación de secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de uno o más

anticuerpos monoclonales en un vector de expresión apropiado mediante técnicas recombinantes y la posterior expresión del anticuerpo en una célula huésped apropiada. Los términos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales producidos recombinantemente, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos, anticuerpos bifuncionales, Abs heteroconjugados, DVD-Ig@s, y otros anticuerpos como los descritos en (i) la presente. (Las inmunoglobulinas de dominio variable dual y los métodos para elaborarlas se describen en Wu, C., et al., *Nature Biotechnology*, 25:1290-1297 (2007)). El término "anticuerpo bifuncional", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que comprende un primer brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico y un segundo brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico diferente, es decir, los anticuerpos bifuncionales tienen una especificidad dual.

"Nivel de referencia", como se usa en la presente, se refiere a un valor de corte del ensayo que se usa para evaluar la eficacia diagnóstica, pronóstica o terapéutica y que se ha vinculado o se asocia en la presente con varios parámetros clínicos (por ejemplo, presencia de enfermedad, estadio de la enfermedad, gravedad de la enfermedad, progresión, no progresión o mejora de la enfermedad, etc.). Esta divulgación proporciona niveles de referencia ejemplares. Sin embargo, es bien sabido que los niveles de referencia pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, condiciones de reacción, pureza de la muestra, etc.) y que los ensayos pueden compararse y estandarizarse. Además, está dentro de la capacidad ordinaria de un experto en la técnica adaptar la presente divulgación a otros inmunoensayos para obtener niveles de referencia específicos del inmunoensayo para esos otros inmunoensayos basándose en la descripción proporcionada por la presente divulgación. Mientras que el valor preciso del nivel de referencia puede variar entre los ensayos, los descubrimientos descritos en la presente deben ser generalmente aplicables y capaces de ser extrapolados a otros ensayos.

La "evaluación del riesgo", "clasificación del riesgo", "identificación del riesgo" o "estratificación del riesgo" de los sujetos (por ejemplo, pacientes), como se usa en la presente, se refiere a la evaluación de factores, incluyendo los biomarcadores, para predecir el riesgo de aparición de acontecimientos futuros, incluyendo la aparición de la enfermedad o la progresión de la enfermedad, de tal manera que las decisiones de tratamiento relativas al sujeto puedan tomarse sobre una base más informada.

"Muestra", "muestra de prueba", "espécimen", "muestra de un sujeto" y "muestra de paciente", como se usan en la presente, pueden ser intercambiables y pueden ser una muestra de sangre, como sangre completa, tejido, orina, suero, plasma, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, células o tejido placentarios, células endoteliales, leucocitos o monocitos. La muestra puede usarse directamente tal como se obtiene de un paciente o puede pretratarse, por ejemplo, mediante filtración, destilación, extracción, concentración, centrifugación, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos, y similares, para modificar el carácter de la muestra de alguna de las maneras analizadas en la presente o de cualquier otra manera conocida en la técnica.

Para obtener una muestra pueden utilizarse una variedad de tipos de células, tejidos o fluidos corporales. Dichos tipos de células, tejidos y fluidos pueden incluir secciones de tejidos como muestras de biopsias y autopsias, secciones congeladas tomadas con propósitos histológicos, sangre (como sangre completa), plasma, suero, glóbulos rojos, plaquetas, líquido intersticial, líquido cefalorraquídeo, etc. Los tipos de células y tejidos también pueden incluir líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, un líquido recogido por un tejido o tipo de célula puede obtenerse extrayendo una muestra de células de un humano y de un animal no humano, pero también puede lograrse usando células aisladas previamente (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o con otro propósito). También pueden usarse tejidos de archivo, como los que tienen un historial de tratamientos o resultados. Puede no ser necesario el aislamiento y/o purificación de proteínas o nucleótidos.

La "sensibilidad" de un ensayo, como se usa en la presente, se refiere a la proporción de sujetos para los que el resultado es positivo que se identifican correctamente como positivos.

La "especificidad" de un ensayo, como se usa en la presente, se refiere a la proporción de sujetos para los que el resultado es negativo que se identifican correctamente como negativos.

"Serie de composiciones de calibración" se refiere a una pluralidad de composiciones que comprenden una concentración conocida de UCH-L1, en donde cada una de las composiciones difiere de las demás composiciones en la serie por la concentración de UCH-L1.

Como se usa en la presente, el término "detección de moléculas individuales" se refiere a la detección y/o medición de una molécula individual de un analito en una muestra de prueba a niveles muy bajos de concentración (como niveles de pg/ml o femtogramo/ml). En la técnica se conocen una variedad de analizadores o dispositivos de moléculas individuales e incluyen dispositivos de nanoporos y nanopocillos. Ejemplos de dispositivos de nanoporos se describen en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2016/161402. Los ejemplos de dispositivos de nanopocillos se describen en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2016/161400.

"Fase sólida" o "soporte sólido", usados indistintamente en la presente, se refiere a cualquier material que

pueda usarse para fijar y/o atraer e inmovilizar (1) uno o más agentes de captura o compañeros de unión específicos de captura, o (2) uno o más agentes de detección o compañeros de unión específicos de detección. La fase sólida puede elegirse por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar un agente de captura. Alternativamente, la fase sólida puede tener adherido un agente de enlace que tenga la capacidad de atraer e inmovilizar (1) el agente de captura o el compañero de unión específica de captura, o (2) el agente de detección o el compañero de unión específica de detección. Por ejemplo, el agente de enlace puede incluir una sustancia cargada con carga opuesta a la del propio agente de captura (por ejemplo, compañero de unión específica de captura) o agente de detección (por ejemplo, compañero de unión específica de detección) o a una sustancia cargada conjugada con el (1) agente de captura o compañero de unión específica de captura o (2) agente de detección o compañero de unión específica de detección. En general, el agente de enlace puede ser cualquier compañero de unión (preferiblemente específico) que esté inmovilizado en (unido a) la fase sólida y que tenga la capacidad de inmovilizar el (1) agente de captura o compañero de unión específica de captura, o (2) agente de detección o compañero de unión específica de detección mediante una reacción de unión. El agente de enlace permite la unión indirecta del agente de captura a un material de fase sólida antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo. Por ejemplo, la fase sólida puede ser de plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, vidrio o silicio, incluyendo, por ejemplo, un tubo de ensayo, un pocillo de microtitulación, una lámina, una perla, una micropartícula, un chip y otras configuraciones conocidas por los expertos en la técnica.

"Unión específica" o "se une específicamente", como se usa en la presente, puede referirse a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, en donde la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

Un "compañero de unión específica" es un miembro de un par de unión específica. Un par de unión específica comprende dos moléculas diferentes, que se unen específicamente entre sí por medios químicos o físicos. Por lo tanto, además de los pares de unión específica de antígenos y anticuerpos de los inmunoensayos comunes, otros pares de unión específica pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), carbohidratos y lectinas, secuencias complementarias de nucleótidos, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, enzimas e inhibidores enzimáticos, y similares. Además, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de unión específica originales, por ejemplo, un analito-análogo. Los miembros de unión específica inmunorreactivos incluyen antígenos, fragmentos de antígenos y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, así como complejos y fragmentos de los mismos, ya estén aislados o se hayan producido recombinantemente.

"Sujeto" y "paciente" como se usan en la presente se refieren indistintamente a cualquier vertebrado, incluyendo, entre otros, un mamífero (por ejemplo, vacas, cerdos, camellos, llamas, caballos, cabras, conejos, ovejas, hámsteres, cobayas, gatos, perros, ratas y ratones, un primate no humano (por ejemplo, un mono como monos cynomolgous o rhesus, chimpancés, etc.) y un humano). En algunas realizaciones, el sujeto puede ser humano o no humano. El sujeto o paciente se puede estar sometiendo a otras formas de tratamiento. En algunas realizaciones, cuando el sujeto es un humano, el sujeto no incluye a ningún humano que haya sufrido un accidente cerebrovascular (por ejemplo, un derrame cerebral). En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto ha sufrido una lesión en la cabeza. En algunas realizaciones, se sabe que el sujeto ha sufrido una lesión en la cabeza. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre TBI leve, moderada o grave. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre TBI leve. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre TBI moderada. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre TBI grave.

"Tratar", "que trata" o "tratamiento" se usan indistintamente en la presente para describir la reversión, el alivio o la inhibición del progreso de una enfermedad y/o lesión, o de uno o más síntomas de dicha enfermedad, a los que se aplica dicho término. Dependiendo de la condición del sujeto, el término también se refiere a la prevención de una enfermedad, e incluye la prevención de la aparición de una enfermedad, o la prevención de los síntomas asociados con una enfermedad. Un tratamiento puede realizarse de forma aguda o crónica. El término también se refiere a reducir la gravedad de una enfermedad o de los síntomas asociados a dicha enfermedad antes de padecer la enfermedad. Dicha prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad antes de padecerla se refiere a la administración de una composición farmacéutica a un sujeto que no padece la enfermedad en el momento de la administración. "Prevenir" también se refiere a prevenir la recurrencia de una enfermedad o de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. "Tratamiento" y "terapéuticamente" se refieren al acto de tratar, como se ha definido "tratar" con anterioridad. "Lesión cerebral traumática" o "TBI", como se usan indistintamente en la presente, se refiere a una lesión compleja con un espectro amplio de síntomas y discapacidades. En la mayoría de los casos, la TBI es un acontecimiento agudo similar a otras lesiones. Las TBI pueden clasificarse como "leves", "moderadas" o "graves". Las causas de las TBI son diversas e incluyen, por ejemplo, el zarandeo físico por una persona, un accidente de coche, heridas por armas de fuego, accidentes vasculares cerebrales (por ejemplo, derrames cerebrales), caídas, explosiones o estallidos y otros tipos de traumatismos por objeto contundente. Otras causas de TBI incluyen la ingestión y/o

exposición a una o más sustancias químicas o toxinas (como incendios, mohos, amianto, pesticidas e insecticidas, disolventes orgánicos, pinturas, pegamentos, gases (como monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y cianuro), metales orgánicos (como metilmercurio, tetraetilo de plomo y estaño orgánico), una o más drogas de abuso o combinaciones de las mismas). Alternativamente, la TBI puede producirse en sujetos que padecen una enfermedad autoinmune, un trastorno metabólico, un tumor cerebral, hipoxia, uno o más virus, meningitis, hidrocefalia o combinaciones de los mismos. Los adultos jóvenes y los ancianos son los grupos de edad con mayor riesgo de TBI. En ciertas realizaciones de la presente, la lesión cerebral traumática o TBI no incluye y excluye específicamente los accidentes vasculares cerebrales, como los derrames cerebrales.

"TBI leve", como se usa en la presente, se refiere a una lesión cerebral en la que la pérdida de consciencia es breve y habitualmente de unos pocos segundos o minutos y/o la confusión y desorientación es inferior a 1 hora. La TBI leve también se denomina conmoción cerebral, traumatismo craneoencefálico leve, TBI menor, lesión cerebral menor y traumatismo craneoencefálico menor. Aunque las exploraciones por MRI y CT suelen ser normales, el individuo con TBI leve puede tener problemas cognitivos como dolor de cabeza, dificultad para pensar, problemas de memoria, déficit de atención, cambios de humor y frustración.

La TBI leve es la más prevalente y a menudo se pasa por alto en el momento de la lesión inicial. Típicamente, un sujeto tiene un número en la escala de coma de Glasgow entre 13-15 (como 13-15 o 14-15). El quince por ciento (15%) de las personas con TBI leve tienen síntomas que duran 3 meses o más. La TBI leve se define como el resultado de un movimiento contundente de la cabeza o un impacto que provoca un breve cambio en el estado mental (confusión, desorientación o pérdida de memoria) o pérdida de conciencia durante menos de 30 minutos. Los síntomas comunes de una TBI leve se incluyen fatiga, dolores de cabeza, alteraciones visuales, pérdida de memoria, falta de atención/concentración, alteraciones del sueño, mareos/pérdida de equilibrio, irritabilidad-alteraciones emocionales, sentimientos de depresión y convulsiones. Otros síntomas asociados a la TBI leve incluyen náuseas, pérdida del olfato, sensibilidad a la luz y los sonidos, cambios de humor, pérdida o confusión y/o lentitud de pensamiento.

"TBI moderada", como se usa en la presente, se refiere a una lesión cerebral en la que la pérdida de consciencia y/o la confusión y desorientación se encuentran entre 1 y 24 horas y el sujeto tiene un número en la escala de coma de Glasgow entre 9-12. El individuo con TBI moderada tiene resultados anormales en los resultados de imagenología cerebral. "TBI grave", como se usa en la presente, se refiere a una lesión cerebral en la que la pérdida de consciencia es de más de 24 horas y la pérdida de memoria después de la lesión o la lesión penetrante de cráneo dura más de 24 horas y el sujeto tiene un número de la escala de coma de Glasgow entre 3-8. Los déficits varían desde el deterioro de las funciones cognitivas de nivel superior hasta estados comatosos. Los supervivientes pueden tener una función limitada de brazos o piernas, habla o lenguaje anormales, pérdida de la capacidad de pensar o problemas emocionales. Los individuos con lesiones graves pueden quedar en estados de falta de respuesta a largo plazo. Para muchas personas con TBI grave, a menudo es necesaria la rehabilitación a largo plazo para maximizar la función y la independencia.

Los síntomas comunes de las TBI de moderadas a graves incluyen déficits cognitivos incluyendo dificultades de atención, concentración, distracción, memoria, velocidad de procesamiento, confusión, perseveración, impulsividad, procesamiento del lenguaje y/o "funciones ejecutivas", no comprensión de la palabra hablada (afasia receptiva), dificultad para hablar y ser comprendido (afasia expresiva), hablar arrastrando las palabras, hablar muy deprisa o muy despacio, problemas para leer, problemas para escribir, dificultades para interpretar el tacto, la temperatura, el movimiento, la posición de las extremidades y la finura, discriminación, la integración o formación de patrones de las impresiones sensoriales en datos psicológicamente significativos, pérdida parcial o total de la visión, debilidad de los músculos oculares y visión doble (diplopía), visión borrosa, problemas para juzgar la distancia, movimientos involuntarios de los ojos (nistagmo), intolerancia a la luz (fotofobia), audición, como disminución o pérdida de la audición, zumbidos en los oídos (tinnitus), aumento de la sensibilidad a los sonidos, pérdida o disminución del sentido del olfato (anosmia), pérdida o disminución del sentido del gusto, las convulsiones asociadas a la epilepsia que pueden ser de varios tipos e implicar alteraciones de la conciencia, la percepción sensorial o los movimientos motores, el control del intestino y la vejiga, trastornos del sueño, pérdida de resistencia, cambios en el apetito, regulación de la temperatura corporal, dificultades menstruales, comportamientos dependientes, capacidad emocional, falta de motivación, irritabilidad, agresividad, depresión, desinhibición o negación/falta de conciencia.

"UCH-L1" se usa en la presente para describir la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1. La UCH-L1 es una proteína codificada por el gen de UCH-L1 en humanos, y que puede producirse (por ejemplo, por medios recombinantes, en otras especies).

"Estado de UCH-L1" puede significar o el nivel o la cantidad de UCH-L1 en un punto temporal (como con una única medida de UCH-L1), el nivel o la cantidad de UCH-L1 asociada con la monitorización (como con una prueba repetida en un sujeto para identificar un aumento o una disminución de la cantidad de UCH-L1), el nivel o la cantidad de UCH-L1 asociada con el tratamiento de una lesión cerebral traumática (ya sea una lesión cerebral primaria y/o una lesión cerebral secundaria) o combinaciones de las mismas.

"Variante" se usa en la presente para describir un péptido o polipéptido que difiere en la secuencia de

aminoácidos por la inserción, delección o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que conserva por lo menos una actividad biológica. Ejemplos representativos de "actividad biológica" incluyen la capacidad de unirse a un anticuerpo específico o de promover una respuesta inmunitaria. Variante también se usa en la presente para describir una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que conserva por lo menos una actividad biológica. Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, la sustitución de un aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofiliicidad, grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en la técnica como algo que típicamente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. En la técnica se sabe que los aminoácidos con índices hidropáticos similares pueden sustituirse y seguir conservando la función proteica. En un aspecto, se sustituyen aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofiliicidad de los aminoácidos también puede usarse para revelar sustituciones que resultarían en proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofiliicidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofiliicidad media local de ese péptido, una medida útil que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Patente de Estados Unidos N° 4,554,101. La sustitución de aminoácidos con valores de hidrofiliicidad similares puede dar como resultado que los péptidos conserven la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones pueden realizarse con aminoácidos que tengan valores de hidrofiliicidad dentro de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliicidad de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. En consonancia con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y en particular de las cadenas laterales de esos aminoácidos, como revelan la hidrofobicidad, la hidrofiliicidad, la carga, el tamaño y otras propiedades. "Variante" también puede usarse para referirse a un fragmento antigénicamente reactivo de un anticuerpo anti-UCH-L1 que difiere del fragmento correspondiente del anticuerpo anti-UCH-L1 en la secuencia de aminoácidos, pero que sigue siendo antigénicamente reactivo y puede competir con el fragmento correspondiente del anticuerpo anti-UCH-L1 para unirse a UCH-L1. "Variante" también puede usarse para describir un polipéptido o un fragmento del mismo que se ha procesado de manera diferente, por ejemplo, mediante proteólisis, fosforilación u otra modificación postraduccional, pero que conserva su reactividad antigénica.

"Vector" se usa en la presente para describir una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de cadena doble en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN al genoma viral. Ciertos vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, los vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y los vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, los vectores no episómicos de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en las células huésped y, por tanto, replicarse junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están enlazados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. "Plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más usada. Sin embargo, pueden usarse otras formas de vectores de expresión, como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes. A este respecto, en el contexto de la presente divulgación también pueden usarse las versiones de ARN de los vectores (incluyendo los vectores virales de ARN).

A menos que se definan de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán el significado entendido comúnmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cualquier nomenclatura empleada en relación con, y con las técnicas de, el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente son las que se conocen y usan habitualmente en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros; no obstante, en caso de cualquier ambigüedad latente, prevalecerán las definiciones proporcionadas en la presente sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán los singulares.

2. Métodos basados en el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1)

La presente divulgación describe métodos para evaluar el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) usando un inmunoensayo mejorado para ayudar rápidamente en el diagnóstico de una lesión cerebral traumática (TBI), monitorizar la progresión y predecir el resultado en sujetos que lo necesiten (incluyendo aquellos sujetos que reciben tratamiento para la TBI, así como aquellos sujetos que no reciben tratamiento para la TBI). El método se realiza usando un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica que se unen cada uno específicamente a UCH-L1 y forman primeros complejos que incluyen el primer miembro de unión específica-UCH-L1-segundo miembro de unión específica. En algunas realizaciones, el segundo miembro de unión específica está marcado con un marcador detectable. En algunas realizaciones, el inmunoensayo se lleva a cabo en

un dispositivo de punto de atención.

El inmunoensayo mejorado puede usarse para determinar la UCH-L1 tanto a niveles bajos como a niveles más altos de UCH-L1, proporcionando así un medio para determinar la cantidad de UCH-L1 en una muestra sobre un intervalo de concentraciones ampliado o más amplio sin necesidad de diluir o concentrar la muestra biológica. El inmunoensayo proporciona un ensayo más versátil y sensible para evaluar la lesión cerebral traumática. El inmunoensayo divulgado proporciona una detección sérica sensible de UCH-L1 y un ensayo estandarizado que puede usarse para evaluar la TBI, como la TBI leve. El inmunoensayo permite la medición de menos o igual a 25.000 pg/ml de UCH-L1 en una muestra biológica y no requiere dilución de la muestra biológica. El inmunoensayo también mantiene la linealidad del ensayo sobre el intervalo dinámico del ensayo. En algunas realizaciones, el inmunoensayo tiene un intervalo dinámico de 5 log y mantiene la linealidad del ensayo sobre el intervalo dinámico. En otras realizaciones más, los niveles bajos y altos de UCH-L1 que pueden evaluarse en una muestra biológica están dentro del intervalo dinámico del ensayo sin necesidad de diluir o concentrar la muestra biológica. En otras realizaciones más, el inmunoensayo es capaz de medir una cantidad de UCH-L1 que es menor o igual a 5 pg/ml en un volumen de menos de 20 microlitros de muestra de prueba. En otras realizaciones más, el inmunoensayo: (1) es capaz de medir una cantidad de UCH-L1 que es menor o igual a 25.000 pg/ml en un volumen de menos de 20 microlitros de muestra de prueba; (2) tiene un intervalo dinámico de 5 log; y (3) es lineal sobre el intervalo dinámico.

El intervalo aumentado de concentraciones de UCH-L1 que puede medirse con el inmunoensayo divulgado proporciona un ensayo más preciso y sensible para ayudar a diagnosticar y distinguir una lesión cerebral traumática en un paciente. Así, el inmunoensayo divulgado puede usarse para medir o evaluar concentraciones aumentadas o disminuidas de UCH-L1 a niveles bajos de UCH-L1 en una muestra no diluida en comparación con una muestra de control o calibradora y, por tanto, usarse para identificar TBI en un paciente. El uso del inmunoensayo UCH-L1 puede proporcionar una ayuda precisa en el diagnóstico y posterior tratamiento de pacientes con lesión cerebral traumática. Además, el inmunoensayo divulgado proporciona una ventana de detección ampliada.

En algunas realizaciones, los intervalos sobre los que puede determinarse la UCH-L1 tienen por lo menos aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 100%, aproximadamente el 110%, aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130%, aproximadamente el 140%, aproximadamente el 150%, aproximadamente el 160%, aproximadamente el 170%, aproximadamente el 180%, aproximadamente el 190%, aproximadamente el 200%, aproximadamente el 210%, aproximadamente el 220%, aproximadamente el 230%, aproximadamente el 240%, aproximadamente el 250%, aproximadamente el 260%, aproximadamente el 270%, aproximadamente el 280%, aproximadamente el 290%, aproximadamente el 300%, aproximadamente el 400%, o aproximadamente el 500% de tamaño de intervalo mejorado en comparación con otros inmunoensayos de UCH-L1 disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, pueden determinarse, medirse o evaluarse intervalos de aproximadamente 0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 0.0001 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 0.001 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 0.01 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 0.1 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 0.5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 1.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 2.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 3.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 4.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 5.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 6.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 7.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 8.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 9.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 10.0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 110 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 120 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 130 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 140 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 0.0001 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 0.001 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 0.01 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 0.1 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 0.5 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 1.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 2.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 3.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 4.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 5.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 6.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 7.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 8.0 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de

[illegible]

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 3 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 8 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 12

pg/ml a aproximadamente 900 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 6.400 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 165 pg/ml a aproximadamente 18.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml.

Algunos instrumentos (como, por ejemplo, el instrumento ARCHITECT® de Abbott Laboratories, y otros instrumentos básicos de laboratorio) distintos de un dispositivo de punto de atención pueden ser capaces de medir niveles de UCH-L1 en una muestra biológica mayores o superiores a 25.000 pg/ml. El uso de los métodos descritos en la presente puede proporcionar uno o más de los beneficios descritos en la presente en dichos dispositivos (por ejemplo, medición de hasta 25.000 pg/ml, intervalo dinámico de 5 log, linealidad del ensayo sobre el intervalo dinámico, medida de UCH-L1 en un volumen de menos de 20 microlitros de muestra, ventana de detección ampliada, etc.).

Otros métodos de detección incluyen el uso o pueden adaptarse para su uso en un dispositivo de nanoporos o un dispositivo de nanopocillos, por ejemplo, para la detección de moléculas individuales. Los ejemplos de dispositivos de nanoporos se describen en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2016/161402. Ejemplos de dispositivos de nanopocillos se describen en la Publicación Internacional de Patente N° WO 2016/161400. Para la detección de moléculas individuales también pueden emplearse otros dispositivos y métodos apropiados.

a. Métodos de evaluación del estado UCH-L1 como medida de la lesión cerebral traumática

En una realización, los métodos descritos en la presente pueden usarse para evaluar el estado de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) de un sujeto como medida de lesión cerebral traumática. El método incluye los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica con un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica, en donde el primer miembro de unión específica y el segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1 produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden primer miembro de unión específica-UCH-L1-segundo miembro de unión específica, en donde el segundo miembro de unión específica comprende un marcador detectable; y b) evaluar una señal de uno o más primeros complejos, en donde la presencia de una señal detectable del marcador detectable indica que UCH-L1 está presente en la muestra y la cantidad de señal detectable del marcador detectable indica la cantidad de UCH-L1 presente en la muestra, de tal manera que la presencia y/o cantidad de señal detectable del marcador detectable puede emplearse para evaluar el estado de UCH-L1 de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática. El método (i) puede usarse para determinar niveles de hasta 25.000 pg/ml de UCH-L1, (ii) no requiere dilución de la muestra biológica, y (iii) se lleva a cabo usando un dispositivo de punto de atención.

En una realización, los métodos descritos en la presente pueden usarse para evaluar el estado de la proteína ácida fibrilar glial (UCH-L1) de un sujeto como medida de lesión cerebral traumática en una muestra biológica obtenida de un sujeto humano. Dicho sujeto puede haber sufrido una lesión en la cabeza o se sabe que ha sufrido una lesión en la cabeza. El método comprende los pasos de: (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, con: (1) un anticuerpo de captura que está inmovilizado sobre un soporte sólido y que se une a un epítipo de la UCH-L1 humana para formar un complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1, y (2) un anticuerpo de detección que incluye un marcador detectable y que se une a un epítipo de la UCH-L1 humana que no está unido por el anticuerpo de captura, para formar un complejo antígeno de UCH-L1-anticuerpo de detección, de tal manera que se forme un complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-anticuerpo de detección, en donde el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son anticuerpos monoclonales, (b) determinar el nivel de UCH-L1 en la muestra biológica basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-anticuerpo de detección. El método es capaz de cuantificar el nivel de UCH-L1 en un intervalo dinámico de 5 pg/ml a 25.000 pg/ml con una precisión de menos del 10% de CV y con menos del 10% de desviación de la linealidad (DL) alcanzada en el intervalo dinámico.

En una realización, los métodos descritos en la presente pueden usarse para medir el estado de la proteína del ácido fibrilar glial (UCH-L1) como una medida de lesión cerebral traumática en un sujeto que puede haber sufrido una lesión en la cabeza o se sabe que ha sufrido una lesión en la cabeza. El método comprende los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto, ya sea simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, con un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica, en donde el primer miembro de unión específica y el segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1 produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden primer miembro de unión específica-UCH-

L1-segundo miembro de unión específica, en donde el segundo miembro de unión específica comprende un marcador detectable, en donde el primer miembro de unión específica está inmovilizado en un soporte sólido; b) detectar una señal de uno o más primeros complejos, en donde la presencia de una señal detectable procedente del marcador detectable indica que UCH-L1 está presente en la muestra, y c) medir la cantidad de señal detectable del marcador detectable indica la cantidad de UCH-L1 presente en la muestra, de tal manera que la cantidad de señal detectable del marcador detectable puede emplearse para evaluar el estado de UCH-L1 de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática. Dicho ensayo es capaz de determinar el nivel de UCH-L1 a través de un intervalo dinámico de 20 pg/ml a 25.000 pg/ml con una precisión de menos del 10% de CV y con menos del 10% de desviación de la linealidad (DL) lograda sobre el intervalo dinámico en un volumen de menos de 20 microlitros de muestra de prueba.

En algunas realizaciones, el método puede usarse para determinar niveles de UCH-L1 de aproximadamente 10,0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, o de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml. En algunas realizaciones, el método puede usarse para determinar niveles de UCH-L1 seleccionados del grupo que consiste en de aproximadamente 10,0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de 150 pg/ml a 25.000 pg/ml, de 100 pg/ml a 25.000 pg/ml, de 125 pg/ml a 25.000 pg/ml, y de 150 pg/ml a 25.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, pueden detectarse niveles de por lo menos 0,5 pg/ml, 0,10 pg/ml, 0,50 pg/ml, 1 pg/ml, 5 pg/ml, 10 pg/ml, 15 pg/ml, 20 pg/ml, 31 pg/ml, 32 pg/ml, 33 pg/ml, 34 pg/ml, 35 pg/ml, 40 pg/ml, 50 pg/ml, 60 pg/ml, 70 pg/ml, 80 pg/ml, 90 pg/ml, o 100 pg/ml de UCH-L1 (o fragmento de UCH-L1) en una muestra biológica. En algunas realizaciones, pueden detectarse niveles de menos de 50.000 pg/ml, 40.000 pg/ml, 30.000 pg/ml o 25.000 pg/ml de UCH-L1 (o fragmento de UCH-L1) en una muestra biológica.

En algunas realizaciones, pueden detectarse niveles de por lo menos aproximadamente 10.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 15.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 20.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 25.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 30.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 35.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 40.000 pg/ml, por lo menos aproximadamente 45.000 pg/ml, o por lo menos aproximadamente 50.000 pg/ml de UCH-L1 (o fragmento de UCH-L1) en una muestra biológica.

En algunas realizaciones, el ensayo puede tener un límite inferior de detección (LOD) de aproximadamente 10 pg/ml, aproximadamente 15 pg/ml, aproximadamente 20 pg/ml, aproximadamente 25 pg/ml, aproximadamente 30 pg/ml, aproximadamente 40 pg/ml, o aproximadamente 50 pg/ml.

En algunas realizaciones, el ensayo puede tener menos del 10% de desviación de la linealidad (DL) sobre un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml. Por ejemplo, el ensayo puede tener menos del 10%, menos del 9%, menos del 8%, menos del 7%, menos del 6%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,5% de desviación de la linealidad sobre un intervalo de aproximadamente 3 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 8 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 900 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 13.660 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 900 pg/ml, un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 6.400 pg/ml, o un intervalo de aproximadamente 165 pg/ml a aproximadamente 18.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, el método tiene un intervalo de cuantificación de UCH-L1 de 20 pg/ml a 25.000 pg/ml con un coeficiente de variación (CV) del 20%. En algunas realizaciones, el método tiene un intervalo de detección de UCH-L1 de 20 pg/ml a 25.000 pg/ml con un coeficiente de variación (CV) del 20%.

En algunas realizaciones, el primer miembro de unión específica está inmovilizado en un soporte sólido. En

algunas realizaciones, el segundo miembro de unión específica está inmovilizado en un soporte sólido. En algunas realizaciones, el primer miembro de unión específica es un anticuerpo contra UCH-L1 como se describe a continuación. En algunas realizaciones, el segundo miembro de unión específica es un anticuerpo contra UCH-L1 como se describe a continuación. En algunas realizaciones, cada uno del primer miembro de unión específica y del segundo miembro de unión específica es un anticuerpo contra UCH-L1.

En algunas realizaciones, la muestra biológica está diluida o no diluida. La muestra biológica puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 23 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 22 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 18 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 17 microlitros, de aproximadamente 1 a aproximadamente 16 microlitros, de aproximadamente 15 microlitros o de aproximadamente 1 microlitro, de aproximadamente 2 microlitros, de aproximadamente 3 microlitros, de aproximadamente 4 microlitros, de aproximadamente 5 microlitros, de aproximadamente 6 microlitros, de aproximadamente 7 microlitros, de aproximadamente 8 microlitros, de aproximadamente 9 microlitros, de aproximadamente 10 microlitros, de aproximadamente 11 microlitros, de aproximadamente 12 microlitros, de aproximadamente 13 microlitros, de aproximadamente 14 microlitros, de aproximadamente 15 microlitros, de aproximadamente 16 microlitros, de aproximadamente 17 microlitros, de aproximadamente 18 microlitros, de aproximadamente 19 microlitros, de aproximadamente 20 microlitros, de aproximadamente 21 microlitros, de aproximadamente 22 microlitros, de aproximadamente 23 microlitros, de aproximadamente 24 microlitros o de aproximadamente 25 microlitros. En algunas realizaciones, la muestra biológica es de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 microlitros o menos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 microlitros o menos.

En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto ha sufrido una lesión en la cabeza. En algunas realizaciones, se sabe que el sujeto ha sufrido una lesión en la cabeza. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre una TBI leve, moderada o grave. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre una TBI leve. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre una TBI moderada. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto sufre una TBI grave.

En algunas realizaciones, no se conoce el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra biológica y cuando ha sufrido una lesión el sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene en el plazo de aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 55 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 13 meses, aproximadamente 14 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 16 meses, aproximadamente 17 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 19 meses, aproximadamente 20 meses, aproximadamente 21 meses, aproximadamente 22 meses, aproximadamente 23 meses, aproximadamente 24 meses, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años o aproximadamente 10 años después de que el sujeto sufra una lesión. Por ejemplo, la lesión puede ser una lesión en la cabeza. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene en el plazo de aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 55 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas,

aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 13 meses, aproximadamente 14 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 16 meses, aproximadamente 17 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 19 meses, aproximadamente 20 meses, aproximadamente 21 meses, aproximadamente 22 meses, aproximadamente 23 meses, aproximadamente 24 meses, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años o aproximadamente 10 años después de que el sujeto haya ingerido o haya estado expuesto a una sustancia química, una toxina o una combinación de una sustancia química o una toxina. Ejemplos de tales sustancias químicas y/o toxinas incluyen, incendios, mohos, amianto, pesticidas e insecticidas, disolventes orgánicos, pinturas, pegamentos, gases (como monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y cianuro), metales orgánicos (como metilmercurio, tetraetilo de plomo y estaño orgánico) y/o una o más drogas de abuso. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un sujeto que padece una enfermedad, como una enfermedad autoinmune, un trastorno metabólico, un tumor cerebral, hipoxia, uno o más virus, meningitis, hidrocefalia o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo o para confirmar la aparición de una lesión cerebral traumática o la ausencia de lesión cerebral traumática. El método puede realizarse en aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 7 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 9 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 11 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 13 minutos, aproximadamente 14 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 16 minutos, aproximadamente 17 minutos, aproximadamente 18 minutos, aproximadamente 19 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, etc.

b. Métodos para proporcionar ayuda en el diagnóstico de un sujeto que tiene lesión cerebral traumática

En otra realización, los métodos descritos en la presente pueden usarse para proporcionar una ayuda en el diagnóstico de un sujeto que tiene una lesión cerebral traumática determinando los niveles de UCH-L1 en un sujeto. El método puede usarse para detectar o evaluar una lesión cerebral traumática en un sujeto usando los anticuerpos anti-UCH-L1 descritos a continuación, o fragmentos de anticuerpos de los mismos. El método incluye los pasos de (a) obtener una muestra biológica de un sujeto, (b) determinar el nivel de UCH-L1 en la muestra biológica usando anticuerpos anti-UCH-L1, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, (c) comparar el nivel de UCH-L1 en la muestra biológica con un nivel de referencia de UCH-L1, (d) identificar que el sujeto tiene lesión cerebral traumática si el nivel de UCH-L1 en la muestra biológica es mayor que el nivel de referencia de UCH-L1, y (e) administrar un régimen de tratamiento al sujeto que se ha identificado que tiene lesión cerebral traumática.

Al medir y evaluar la UCH-L1, el método permite diagnosticar más enfermedades con mayor precisión y posteriormente tratarlas con más éxito, en comparación con otros inmunoensayos de UCH-L1 disponibles en el mercado. El método puede adaptarse para su uso en un sistema automatizado o semiautomatizado.

En general, puede emplearse un nivel predeterminado como punto de referencia con el que evaluar los resultados obtenidos al analizar una muestra de prueba para UCH-L1. Por lo general, al realizar dicha comparación, el nivel predeterminado se obtiene ejecutando un ensayo particular un número suficiente de veces y en condiciones adecuadas, de tal manera que pueda establecerse un vínculo o asociación de la presencia, cantidad o concentración

del análisis con una etapa o un criterio de valoración particular de la ITC o con un indicio concreto. Típicamente, el nivel predeterminado se obtiene con ensayos de sujetos (o poblaciones de sujetos) de referencia. La UCH-L1 medida puede incluir fragmentos de UCH-L1 de la misma, productos de degradación de la misma y/o productos de escisión enzimática de la misma.

El nivel de referencia en este método puede ser el nivel de UCH-L1 en un paciente que tiene lesión cerebral traumática. En algunas realizaciones, el nivel de referencia se encuentra dentro del intervalo dinámico del método descrito en la presente. En algunas realizaciones, el intervalo dinámico es de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 10,0 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, o de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml. En algunas realizaciones, niveles superiores o iguales a 5 pg/ml, 10 pg/ml, 20 pg/ml, 30 pg/ml, 40 pg/ml, 50 pg/ml, 60 pg/ml, 70 pg/ml, 80 pg/ml, 90 pg/ml, 100 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml, 5000 pg/ml, 10000 pg/ml, o 50000 pg/ml en suero de UCH-L1 identifican que el sujeto tiene una lesión cerebral traumática. Opcionalmente, en algunos casos, niveles superiores o iguales a 100000 pg/ml, 500000 pg/ml, 1000000 pg/ml, 150000 pg/ml, 200000 pg/ml, o 500000 pg/ml en suero de UCH-L1 identifican que el sujeto tiene una lesión cerebral traumática. En algunas realizaciones, niveles superiores o iguales a 5 pg/ml, 10 pg/ml, 20 pg/ml, 30 pg/ml, 40 pg/ml, 50 pg/ml, 60 pg/ml, 70 pg/ml, 80 pg/ml, 90 pg/ml, 100 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml, 5000 pg/ml, 10000 pg/ml, o 50000 pg/ml en plasma de UCH-L1 identifican que el sujeto tiene una lesión cerebral traumática. Opcionalmente, en algunos casos, niveles superiores o iguales a 100000 pg/ml, 500000 pg/ml, 1000000 pg/ml, 150000 pg/ml, 200000 pg/ml, o 500000 pg/ml en plasma de UCH-L1 identifican que el sujeto tiene una lesión cerebral traumática.

c. Métodos para predecir si un sujeto que ha sufrido una lesión cerebral traumática es candidato a terapia o tratamiento.

En otra realización más, los métodos descritos en la presente también pueden usarse para predecir si un sujeto que ha sufrido previamente una TBI es candidato a terapia determinando los niveles de UCH-L1 en un sujeto usando los anticuerpos anti-UCH-L1 descritos a continuación, o fragmentos de anticuerpos de los mismos. Por tanto, en realizaciones particulares, la divulgación también proporciona un método para determinar si un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, lesiones cerebrales traumáticas, analizadas en la presente y conocidas en la técnica, es candidato para terapia o tratamiento. En general, el sujeto es por lo menos uno que: (i) ha sufrido una lesión en la cabeza; (ii) ha ingerido y/o ha estado expuesto a uno o más productos químicos y/o toxinas; (iii) padece una enfermedad autoinmune, un trastorno metabólico, un tumor cerebral, hipoxia, uno o más virus, meningitis, hidrocefalia o padece cualquier combinación de los mismos o (iv) cualquier combinación de (i)-(iii); o, que se le haya diagnosticado realmente que padece o está en riesgo de padecer una TBI (como, por ejemplo, sujetos que padecen una enfermedad autoinmune, un trastorno metabólico, un tumor cerebral, hipoxia, uno o más virus, meningitis, hidrocefalia o combinaciones de los mismos), y/o que demuestre una concentración o cantidad desfavorables (es decir, clínicamente indeseables) de UCH-L1 o fragmento de UCH-L1, como se describe en la presente.

Específicamente, dicho método puede comprender los pasos de: (a) determinar la concentración o cantidad en una muestra de prueba de un sujeto de UCH-L1 usando los métodos descritos en la presente, o métodos conocidos en la técnica; y (b) comparar la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a) con un nivel predeterminado, en donde, si la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a) es favorable con respecto a un nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto no es candidato a terapia o tratamiento. Sin embargo, si la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a) es desfavorable con respecto al nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto es un candidato para terapia o tratamiento como se analiza en la presente en la sección f y como se conoce en la técnica.

d. Métodos para monitorizar la progresión de la lesión cerebral traumática en un sujeto

En otra realización más, los métodos descritos en la presente también pueden usarse para monitorizar la progresión de una enfermedad y/o lesión, como una lesión cerebral traumática, en un sujeto determinando los niveles de UCH-L1 en un sujeto usando los anticuerpos anti-UCH-L1 descritos a continuación, o fragmentos de anticuerpos de los mismos. De manera óptima, el método incluye los pasos de (a) determinar la concentración o cantidad de UCH-L1 en una muestra de prueba de un sujeto usando los anticuerpos anti-UCH-L1 descritos a continuación, o fragmentos de los mismos, (b) determinar la concentración o cantidad de UCH-L1 en una muestra de prueba posterior de un sujeto usando los anticuerpos anti-UCH-L1 descritos a continuación, o fragmentos de los mismos y (c) comparar la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (b) con la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a), en donde si la concentración o cantidad determinada en el paso (b) no cambia o es desfavorable cuando se compara con la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado o empeorado. En comparación, si la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (b) es favorable en comparación con la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha cesado, retrocedido o mejorado.

Opcionalmente, el método comprende además comparar la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada

en el paso (b), por ejemplo, con un nivel predeterminado. Además, opcionalmente el método comprende tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas durante un periodo de tiempo si la comparación muestra que la concentración o cantidad de UCH-L1 como se ha determinado en el paso (b), por ejemplo, está alterada desfavorablemente con respecto al nivel predeterminado.

5 AÚN MÁS, los métodos pueden usarse para monitorizar el tratamiento en un sujeto que recibe tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas. Específicamente, tales métodos implican proporcionar una primera muestra de prueba de un sujeto antes de que al sujeto se le hayan administrado una o más composiciones farmacéuticas. A continuación, se determina la concentración o cantidad de UCH-L1 en una primera muestra de prueba de un sujeto (por ejemplo, usando los métodos descritos en la presente o como se sabe en la técnica). Una vez se ha determinado la concentración o cantidad de UCH-L1, opcionalmente se compara la concentración o cantidad de UCH-L1 con un nivel predeterminado. Si la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en la primera muestra de prueba es menor que el nivel predeterminado, entonces al sujeto no se le trata con una o más composiciones farmacéuticas o, alternativamente, al sujeto se le puede tratar con una o más composiciones farmacéuticas. Si la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en la primera muestra de prueba es mayor que el nivel predeterminado, entonces al sujeto se le trata con una o más composiciones farmacéuticas durante un periodo de tiempo o, alternativamente, al sujeto no se le trata con una o más composiciones farmacéuticas. El periodo de tiempo durante el que se trata al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas puede ser determinado por un experto en la técnica (por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferiblemente de aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).

25 Durante el curso del tratamiento con las una o más composiciones farmacéuticas, se obtienen del sujeto la segunda y posteriores muestras de prueba. El número de muestras de prueba y el momento en el que se obtienen dichas muestras de prueba del sujeto no son críticos. Por ejemplo, una segunda muestra de prueba podría obtenerse siete (7) días después de que al sujeto se le hayan administrado por primera vez las una o más composiciones farmacéuticas, una tercera muestra de prueba podría obtenerse dos (2) semanas después de que al sujeto se le hayan administrado por primera vez las una o más composiciones farmacéuticas, una cuarta muestra de prueba podría obtenerse tres (3) semanas después de que al sujeto se le hayan administrado por primera vez las una o más composiciones farmacéuticas, una quinta muestra de prueba podría obtenerse cuatro (4) semanas después de que al sujeto se le hayan administrado por primera vez las una o más composiciones farmacéuticas, etc.

Una vez que se ha obtenido cada segunda muestra de prueba o posterior del sujeto, se determina la concentración o cantidad de UCH-L1 en la segunda o posterior muestra de prueba (por ejemplo, usando los métodos descritos en la presente o que se conocen en la técnica). La concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en cada una de la segunda y posteriores muestras de prueba se compara entonces con la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en la primera muestra de prueba (por ejemplo, la muestra de prueba que se comparó originalmente de manera opcional con el nivel predeterminado). Si la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (c) es favorable en comparación con la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad del sujeto ha cesado, retrocedido o mejorado, y se puede seguir administrando al sujeto las una o más composiciones farmacéuticas del paso (b). Sin embargo, si la concentración o cantidad determinada en el paso (c) no ha cambiado o es desfavorable en comparación con la concentración o cantidad de UCH-L1 determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado o empeorado, y al sujeto se le puede tratar con una concentración más alta de las una o más composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en el paso (b) o se puede tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas que sean diferentes de las una o más composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en el paso (b). Específicamente, al sujeto se le puede tratar con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de las una o más composiciones farmacéuticas que el sujeto había recibido previamente para disminuir o reducir el nivel de UCH-L1 de dicho sujeto.

50 En general, para los ensayos en los que se pueden repetir las pruebas (por ejemplo, la monitorización de la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento), se obtiene una segunda o posteriores muestra de prueba en un periodo de tiempo después de que se haya obtenido la primera muestra de prueba del sujeto. Específicamente, una segunda muestra de prueba del sujeto puede obtenerse minutos, horas, días, semanas o años después de que se haya obtenido la primera muestra de prueba del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de prueba puede obtenerse del sujeto en un periodo de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7

semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2,5 años, aproximadamente 3,0 años, aproximadamente 3,5 años, aproximadamente 4,0 años, aproximadamente 4,5 años, aproximadamente 5,0 años, aproximadamente 5,5 años, aproximadamente 6,0 años, aproximadamente 6,5 años, aproximadamente 7,0 años, aproximadamente 7,5 años, aproximadamente 8,0 años, aproximadamente 8,5 años, aproximadamente 9,0 años, aproximadamente 9,5 años, o aproximadamente 10.0 años después de que se haya obtenido la primera muestra de prueba del sujeto.

Quando se usa para monitorizar la progresión de la enfermedad, el ensayo anterior puede usarse para monitorizar la progresión de la enfermedad en sujetos que padecen afecciones agudas. Las afecciones agudas, también conocidas como afecciones de cuidados críticos, se refieren a enfermedades agudas potencialmente mortales u otras afecciones médicas críticas que afectan, por ejemplo, al sistema cardiovascular o al sistema excretor. Típicamente, las condiciones de cuidados críticos se refieren a aquellas condiciones que requieren intervención médica aguda en un entorno hospitalario (incluyendo, pero no limitado a, la sala de emergencias, unidad de cuidados intensivos, centro de trauma u otro entorno de atención de emergencia) o administración por un paramédico u otro personal médico de campo. Para los cuidados críticos, la repetición de la monitorización se realiza generalmente en el plazo de un periodo de tiempo más corto, concretamente, minutos, horas o días (por ejemplo, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 7 días), y el ensayo inicial también se realiza de igual manera generalmente en un marco temporal más corto, por ejemplo, de aproximadamente minutos, horas o días después de la aparición de la enfermedad o afección.

Los ensayos también pueden usarse para monitorizar la progresión de la enfermedad en sujetos que padecen afecciones crónicas o no agudas. Afecciones no críticas o afecciones no agudas se refieren a afecciones distintas de las enfermedades agudas potencialmente mortales u otras afecciones médicas críticas que afectan, por ejemplo, al sistema cardiovascular y/o al sistema excretor. Típicamente, las afecciones no agudas incluyen las de duración crónica o a largo plazo. Para las afecciones no agudas, la monitorización repetida generalmente se realiza con un marco temporal más largo, por ejemplo, de horas, días, semanas, meses o años (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas,

aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2,5 años, aproximadamente 3,0 años, aproximadamente 3,5 años, aproximadamente 4,0 años, aproximadamente 4,5 años, aproximadamente 5,0 años, aproximadamente 5,5 años, aproximadamente 6,0 años, aproximadamente 6,5 años, aproximadamente 7,0 años, aproximadamente 7,5 años, aproximadamente 8,0 años, aproximadamente 8,5 años, aproximadamente 9,0 años, aproximadamente 9,5 años o aproximadamente 10,0 años), y el ensayo inicial de igual manera se realiza generalmente en un plazo más largo, por ejemplo, de aproximadamente horas, días, meses o años después de la aparición de la enfermedad o afección.

Además, los ensayos anteriores pueden realizarse usando una primera muestra de prueba obtenida de un sujeto, donde la primera muestra de prueba se obtiene de una fuente, como orina, sangre completa, suero o plasma. Opcionalmente, los ensayos anteriores pueden repetirse usando una segunda muestra de prueba obtenida del sujeto, donde la segunda muestra de prueba se obtiene de otra fuente. Por ejemplo, si la primera muestra de prueba se obtuvo de orina, la segunda muestra de prueba puede obtenerse de sangre completa, suero o plasma. Los resultados obtenidos de los ensayos con la primera y la segunda muestra pueden compararse. La comparación puede usarse para evaluar el estado de una enfermedad o afección en el sujeto.

En particular, con respecto a un nivel predeterminado empleado para monitorizar la progresión de la enfermedad y/o el tratamiento o para determinar el riesgo de que un sujeto desarrolle una lesión cerebral traumática, la cantidad o concentración de UCH-L1 o fragmento de UCH-L1 puede ser "inalterada", "favorable" (o "alterada favorablemente") o "desfavorable" (o "alterada desfavorablemente"). "Elevada" o "aumentada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es más alta o mayor que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado), o que es más alta o mayor que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o de referencia). El término "disminuida" o "reducida" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra de prueba que es más baja o menor que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o que es más baja o menor que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de referencia). El término "alterada" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra que está alterada (aumentada o disminuida) sobre un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o sobre otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de referencia).

El nivel o intervalo típico o normal para UCH-L1 se define de acuerdo con la práctica habitual. Puede considerarse que se ha producido una alteración o un nivel alterado cuando se produce un cambio neto en comparación con el nivel o intervalo típico o normal, o el nivel o intervalo de referencia que no puede explicarse por un error experimental o una variación de la muestra. Por tanto, el nivel medido en una muestra particular se comparará con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares de un sujeto denominado normal. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo sin enfermedad o trastorno detectable, y un paciente o población "normal" (a veces denominado "de control") es/son unos que no presentan enfermedades o trastornos detectables, respectivamente, por ejemplo. Un "sujeto aparentemente normal" es aquel en el que no se ha evaluado o se está evaluando la UCH-L1. Se dice que el nivel de un analito es "elevado" cuando el analito es normalmente indetectable (por ejemplo, el nivel normal es cero, o se encuentra dentro de un intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 percentiles de poblaciones normales), pero se detecta en una muestra de prueba, así como cuando el analito está presente en la muestra de prueba a un nivel más alto que el normal. Por tanto, entre otras cosas, la divulgación proporciona un método de cribado de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una lesión cerebral traumática.

e. Otros factores

Los métodos de ayuda en el diagnóstico, pronóstico, y/o evaluación, como se ha descrito anteriormente, pueden incluir además el uso de otros factores para ayudar en el diagnóstico, así como en el pronóstico, y en la evaluación. En algunas realizaciones, la lesión cerebral traumática puede diagnosticarse usando la Escala de Coma de Glasgow o la Escala de Resultados de Glasgow Ampliada (GOSE). También pueden usarse otras pruebas, escalas o índices solos o en combinación con la Escala de Coma de Glasgow. Un ejemplo es la Escala de Ranchos Los Amigos. La Escala de Ranchos Los Amigos mide los niveles de conciencia, cognición, comportamiento e interacción con el entorno. La Escala Ranchos Los Amigos incluye: Nivel I: Sin Respuesta; Nivel II: Respuesta generalizada; Nivel III: Respuesta localizada; Nivel IV: Confuso-agitado; Nivel V: Confuso-inapropiado; Nivel VI: Confuso-apropiado; Nivel VII: Automático-apropiado; y Nivel VIII: Propósito-apropiado.

f. Tratamiento médico de sujetos que padecen lesión cerebral traumática

El sujeto al que se ha identificado o se ha evaluado en los métodos descritos anteriormente que tiene una lesión cerebral traumática, como una lesión cerebral traumática leve o una lesión cerebral traumática de moderada a grave, puede tratarse usando técnicas médicas conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, el método incluye además tratar al sujeto humano al que se ha evaluado que tiene una lesión cerebral traumática con un tratamiento de

lesión cerebral traumática, como cualquier tratamiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de la lesión cerebral traumática puede adoptar una variedad de formas dependiendo de la gravedad de la lesión en la cabeza. Por ejemplo, para los sujetos que padecen TBI leve, el tratamiento puede incluir uno o más de reposo, abstención de realizar actividades físicas, como deportes, evitar la luz o llevar gafas de sol cuando estén a la luz, medicación para aliviar el dolor de cabeza o la migraña, medicación contra las náuseas, etc. El tratamiento de los pacientes que padecen TBI grave puede incluir la administración de uno o varios medicamentos apropiados (como, por ejemplo, diuréticos, medicamentos anticonvulsivos, medicamentos para sedar y provocar un coma inducido por fármacos, u otros medicamentos farmacéuticos o biofarmacéuticos (conocidos o que se desarrollen en el futuro para el tratamiento de la TBI), uno o varios procedimientos quirúrgicos (como, por ejemplo, extirpación de un hematoma, reparación de una fractura craneal, craniectomía descompresiva, etc.) y una o varias terapias (como, por ejemplo, una o más de rehabilitación, terapia cognitivo-conductual, control de la ira, asesoramiento psicológico, etc.).

g. Monitorización de sujetos que padecen lesión cerebral traumática

El sujeto que se ha identificado o evaluado en los métodos descritos anteriormente que tiene una lesión cerebral traumática, como una lesión cerebral traumática leve o una lesión cerebral traumática de moderada a grave, puede ser monitorizado usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el paciente que padece una lesión cerebral traumática, como una lesión cerebral traumática leve o una lesión cerebral traumática grave, puede ser monitorizado con exploración CT o MRI.

3. Anticuerpos contra UCH-L1

Los métodos descritos en la presente pueden usar un anticuerpo aislado que se une específicamente a la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 ("UCH-L1") (o fragmentos de la misma), denominado "anticuerpo contra UCH-L1". Los anticuerpos contra UCH-L1 pueden usarse para evaluar el estado de UCH-L1 como medida de lesión cerebral traumática, detectar la presencia de UCH-L1 en una muestra biológica, cuantificar la cantidad de UCH-L1 presente en una muestra biológica, o detectar la presencia y cuantificar la cantidad de UCH-L1 en una muestra biológica.

a. Ubiquitina Carboxi-Terminal Hidrolasa L1 (UCH-L1)

La ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 ("UCH-L1"), también conocida como "ubiquitina C-terminal hidrolasa", es una enzima de desubiquitinación. La UCH-L1 es miembro de una familia de genes cuyos productos hidrolizan pequeños aductos C-terminales de ubiquitina para generar el monómero de ubiquitina. La expresión de UCH-L1 es altamente específica de las neuronas y de las células del sistema neuroendocrino difuso y sus tumores. Está abundantemente presente en todas las neuronas (representa el 1-2% de la proteína cerebral total), se expresa específicamente en neuronas y testículo/ovario. La tríada catalítica de la UCH-L1 contiene una cisteína en la posición 90, un aspartato en la posición 176 y una histidina en la posición 161 que son responsables de su actividad hidrolasa.

La UCH-L1 humana puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQLKPMEINPEMLNKVLSRLGVAGQWRFVDVLGLEEESLGSPAPACALLLL
FPLTAQHENFRKKQIEELKGQEVSPKVYFMKQTIGNSCGTIGLIHAVANNQDKLGFEDGS
VLKQFLSETEKMSPEDRAKCFEKNEAIAAHDAVAQEGQCRVDDKVNFHFILFNNVDG
HLYELDGRMPFPVNHGASSEDTLKDAAKVCREFTEREQGEVRFSAVALCKAA (SEQ
ID NO: 1).

La UCH-L1 humana puede ser un fragmento o variante de la SEQ ID NO: 1. El fragmento de UCH-L1 puede tener entre 5 y 225 aminoácidos, entre 10 y 225 aminoácidos, entre 50 y 225 aminoácidos, entre 60 y 225 aminoácidos, entre 65 y 225 aminoácidos, entre 100 y 225 aminoácidos, entre 150 y 225 aminoácidos, entre 100 y 175 aminoácidos, o entre 175 y 225 aminoácidos de longitud. El fragmento puede comprender un número contiguo de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

b. Anticuerpo de reconocimiento de UCH-L1

El anticuerpo es un anticuerpo que se une a UCH-L1, un fragmento del mismo, un epítipo de UCH-L1 o una variante del mismo. El anticuerpo puede ser un fragmento del anticuerpo anti-UCH-L1 o una variante o un derivado del mismo. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano o un fragmento de anticuerpo, como un fragmento Fab, o una mezcla de los mismos. Los fragmentos o derivados de anticuerpos pueden comprender fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv. Los derivados de anticuerpos pueden producirse mediante peptidomiméticos. Además, las técnicas descritas para la

producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla.

Los anticuerpos anti-UCH-L1 pueden ser anticuerpos quiméricos anti-UCH-L1 o anticuerpos humanizados anti-UCH-L1. En una realización, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una realización, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico comprenden una única región Fab enlazada a una región Fc.

Los anticuerpos humanos pueden derivarse de la tecnología de presentación en fagos o de ratones transgénicos que expresen genes de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humano puede generarse como resultado de una respuesta inmunitaria humana in vivo y aislarse. Véase, por ejemplo, Funaro et al., BMC Biotechnology, 2008(8):85. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser un producto del repertorio humano y no animal. Al ser de origen humano, pueden minimizarse los riesgos de reactividad contra autoantígenos. Alternativamente, para seleccionar y aislar anticuerpos humanos anti-UCH-L1 pueden usarse bibliotecas de levadura estándar y tecnologías de visualización. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos humanos anti-UCH-L1 pueden usarse bibliotecas de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) humanos sin tratamiento previo. Para expresar anticuerpos humanos pueden usarse animales transgénicos.

Los anticuerpos humanizados pueden ser moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado teniendo una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana.

El anticuerpo se distingue de los anticuerpos conocidos en que posee una función o funciones biológicas diferentes a las conocidas en la técnica.

(1) Epítipo

El anticuerpo puede unirse inmuno-específicamente a UCH-L1 (SEQ ID NO: 1), un fragmento de la misma o a una variante de la misma. El anticuerpo puede reconocer inmuno-específicamente y unirse a por lo menos tres aminoácidos, por lo menos cuatro aminoácidos, por lo menos cinco aminoácidos, por lo menos seis aminoácidos, por lo menos siete aminoácidos, por lo menos ocho aminoácidos, por lo menos nueve aminoácidos, o por lo menos diez aminoácidos dentro de una región epitópica. El anticuerpo puede reconocer inmuno-específicamente y unirse a un epítipo que tenga por lo menos tres aminoácidos contiguos, por lo menos cuatro aminoácidos contiguos, por lo menos cinco aminoácidos contiguos, por lo menos seis aminoácidos contiguos, por lo menos siete aminoácidos contiguos, por lo menos ocho aminoácidos contiguos, por lo menos nueve aminoácidos contiguos o por lo menos diez aminoácidos contiguos de una región epitópica.

c. Preparación/producción de anticuerpos

Los anticuerpos pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, incluyendo las bien conocidas por los expertos en la técnica. En general, los anticuerpos pueden producirse mediante técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, o mediante transfección de genes de anticuerpos, cadenas pesadas y/o cadenas ligeras en huéspedes celulares bacterianos o de mamíferos adecuados, para permitir la producción de anticuerpos, en donde los anticuerpos pueden ser recombinantes. Se pretende que las varias formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, transfección DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferiblemente en células huésped de mamíferos, porque dichas células eucariotas (y en particular las células de mamíferos) tienen más probabilidades que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunológicamente activo.

Las células huésped de mamífero ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980)), usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que están creciendo las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Las células huésped también pueden usarse para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que pueden realizarse variaciones del procedimiento anterior. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o de la cadena pesada de un anticuerpo. También puede usarse tecnología de ADN recombinante

para eliminar parte o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo (es decir, se une a UCH-L1 humana) y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de la UCH-L1 humana mediante la reticulación de un anticuerpo a un segundo anticuerpo por métodos de reticulación químicos estándar.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos están enlazados operativamente a elementos reguladores del potenciador CMV/promotor AdMLP para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo se usan técnicas estándar de biología molecular. Además, el método de sintetizar un anticuerpo recombinante puede consistir en cultivar una célula huésped en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice un anticuerpo recombinante. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

Los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Tales líneas celulares pueden producirse a partir de células del bazo obtenidas de un animal inmunizado. El animal puede inmunizarse con UCH-L1 o un fragmento y/o variante del mismo. El péptido usado para inmunizar al animal puede comprender aminoácidos que codifican Fc humano, por ejemplo, la región cristalizable del fragmento o la región de la cola del anticuerpo humano. A continuación, las células del bazo pueden immortalizarse mediante, por ejemplo, fusión con un compañero de fusión de células de mieloma. Pueden emplearse una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos minutos y, a continuación, sembrarse en placas a baja densidad en un medio selectivo que favorezca el crecimiento de las células híbridas, pero no de las células de mieloma. Una de tales técnicas usa la selección por hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Otra técnica incluye la electrofusión. Después de que haya pasado un tiempo suficiente, habitualmente de 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y se prueban sus sobrenadantes de cultivo para determinar la actividad de unión contra el polipéptido. Pueden usarse hibridomas de alta reactividad y especificidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los sobrenadantes de colonias de hibridoma en crecimiento. Además, para mejorar el rendimiento pueden emplearse varias técnicas, como la inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden recogerse luego del líquido de ascitis o de la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, como la cromatografía, la filtración en gel, la precipitación y la extracción. La cromatografía de afinidad es un ejemplo de un método que puede usarse en un proceso para purificar los anticuerpos.

La enzima proteolítica papaína escinde preferiblemente moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión al antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento F(ab')₂, que comprende ambos sitios de unión al antígeno.

El fragmento Fv puede producirse por escisión proteolítica preferencial de una IgM y, en raras ocasiones, de moléculas de inmunoglobulina de IgG o IgA. El fragmento Fv puede derivarse usando técnicas recombinantes. El fragmento Fv incluye un heterodímero no covalente VH:VL que incluye un sitio de unión a antígeno que conserva gran parte de las capacidades de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo nativa.

El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado puede comprender un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de cadena pesada y de cadena ligera, interpuestas respectivamente entre un conjunto marco ("FR") de cadena pesada y de cadena ligera que proporcionan soporte a las CDR y definen la relación espacial de las CDR entre sí. El conjunto de CDR puede contener tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera.

Pueden usarse otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, entre otros, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes a partir de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no limitado a, una biblioteca de bacteriófagos, ribosomas, oligonucleótidos, ARN, ADNc, levaduras o similares); por ejemplo, como las disponibles de varios proveedores comerciales como Cambridge

Antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Escocia, Reino Unido) BioInvent (Lund, Suecia), usando métodos conocidos en la técnica. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4,704,692; 5,723,323; 5,763,192; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862. Los métodos alternativos se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen et al. (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Sandhu et al. (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118; Eren et al. (1998) *Immunol.* 93:154-161) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, la presentación de ribosomas (Hanes et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) *Proc. Acad. Sci. USA*, 95:14130-14135); tecnologías de producción de anticuerpos de célula única (por ejemplo, el método de anticuerpos linfocitarios seleccionados ("SLAM") (Patente de Estados Unidos. N° 5.627.052, Wen et al. (1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcook et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848); microgotas de gel y citometría de flujo (Powell et al. (1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; Kenny et al. (1995) *Bio/Technol.* 13:787-790); selección de células B (Steenbakkers et al. (1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134 (1994)).

Un anticuerpo madurado por afinidad puede producirse mediante cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992) que describe la maduración por afinidad mediante la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos marco se describe en Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). La mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectiva y en posiciones de contacto o hipermutación con un residuo de aminoácido potenciador de la actividad se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.914.128 B1.

También pueden prepararse variantes de anticuerpos mediante la administración de un polinucleótido que codifique un anticuerpo a un huésped adecuado, por ejemplo, para obtener animales o mamíferos transgénicos, como cabras, vacas, caballos, ovejas y similares, que producen dichos anticuerpos en su leche. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; y 5,304,489.

También pueden prepararse variantes de anticuerpos mediante la administración de un polinucleótido para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, pero no limitadas al tabaco, el maíz y la lenteja de agua) que produzcan dichos anticuerpos, porciones específicas o variantes en las partes de la planta o en las células cultivadas a partir de ellas. Por ejemplo, Cramer et al. (1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 y las referencias citadas en el mismo, describen la producción de hojas de tabaco transgénico que expresan grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. El maíz transgénico se ha usado para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* (1999) 464:127-147 y las referencias citadas en el mismo. También se han producido variantes de anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluyendo fragmentos de anticuerpos, como los anticuerpos de cadena sencilla (scFv), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 y las referencias citadas en el mismo. Por tanto, los anticuerpos también pueden producirse usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos.

Los derivados de anticuerpos pueden producirse, por ejemplo, añadiendo secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, la afinidad, la constante de asociación, la constante de disociación, la avidéz, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica adecuada. Generalmente, parte o la totalidad de las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante se sustituyen por aminoácidos humanos o de otro tipo.

Los fragmentos pequeños de anticuerpo pueden ser diacuerpos que tienen dos sitios de unión a antígeno, en donde los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH VL). Véanse, por ejemplo, la EP 404.097; la WO 93/11161; y Hollinger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448. Al usar un conector demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Véase también, la Patente de Estados Unidos N° 6,632,926 de Chen et al. que divulga variantes de anticuerpos que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo original y una afinidad de unión para un antígeno diana que es por lo menos dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo original por el antígeno.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo lineal. El procedimiento para elaborar un anticuerpo lineal es conocido en la técnica y se describe en Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062. Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos conocidos que incluyen, entre otros, la purificación de proteína A, la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción de ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía de fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de hidroxipatita y la cromatografía de lectinas. También puede usarse la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación.

Puede ser útil marcar detectablemente el anticuerpo. En la técnica se conocen los métodos para conjugar anticuerpos con estos agentes. A título meramente ilustrativo, los anticuerpos pueden marcarse con una fracción detectable, como un átomo radiactivo, un cromóforo, un fluoróforo o similares. Tales anticuerpos marcados pueden usarse para técnicas de diagnóstico, ya sea in vivo o en una muestra de prueba aislada. Pueden enlazarse a una citoquina, a un ligando o a otro anticuerpo. Los agentes adecuados para el acoplamiento a anticuerpos con el fin de conseguir un efecto antitumoral incluyen las citoquinas, como la interleucina 2 (IL-2) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF); los fotosensibilizadores, para su uso en terapia fotodinámica, incluyendo el tetrasulfonato de ftalocianina de aluminio (III), la hematoporfirina y la ftalocianina; radionucleidos, como yodo-131 (131I), itrio-90 (90Y), bismuto-212 (212Bi), bismuto-213 (213Bi), tecnecio-99m (99mTc), renio-186 (186Re) y renio-188 (188Re); antibióticos, como doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, metotrexato, daunomicina, neocarzinostatina y carboplatino; toxinas bacterianas, vegetales y de otro tipo, como la toxina diftérica, la exotoxina A de *Pseudomonas*, la enterotoxina A estafilocócica, la toxina abrina A, la ricina A (ricina A desglucosilada y ricina A nativa), la toxina TGF-alfa, la citotoxina de la cobra china (naja naja atra) y la gelonina (una toxina vegetal); proteínas inactivadoras de ribosomas de plantas, bacterias y hongos, como la restrictocina (una proteína inactivadora de ribosomas producida por *Aspergillus restrictus*), la saporina (una proteína inactivadora de ribosomas de *Saponaria officinalis*) y la RNasa; inhibidores de la tirosina quinasa; ly207702 (un nucleósido de purina difluorado); liposomas que contienen agentes antiúricos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, plásmidos que codifican para toxinas, metotrexato, etc.); y otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, como F(ab).

A continuación, se describe con más detalle la producción de anticuerpos mediante el uso de la tecnología del hibridoma, el método de anticuerpos linfocitarios seleccionados (SLAM), los animales transgénicos y las bibliotecas de anticuerpos recombinantes.

(1) Anticuerpos monoclonales anti-UCH-L1 usando tecnología de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma, incluyendo las conocidas en la técnica y que se enseñan, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, segunda edición, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., *In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, (Elsevier, N.Y., 1981). También cabe señalar que el término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente, no se limita a los anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no al método por el que se produce.

Los métodos de generación de anticuerpos monoclonales, así como los anticuerpos producidos por el método, pueden comprender el cultivo de una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo usado en la invención en donde, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un animal, por ejemplo, una rata o un ratón, inmunizado con UCH-L1 con células de mieloma y, a continuación, cribando los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a UCH-L1. Brevemente, las ratas pueden inmunizarse con un antígeno de UCH-L1. En una realización preferida, el antígeno de UCH-L1 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramyl dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulen al huésped para que secrete factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el programa de inmunización incluirá dos o más administraciones del polipéptido, repartidas a lo largo de varias semanas; sin embargo, también puede usarse una única administración del polipéptido.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno de UCH-L1, pueden obtenerse del animal anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos. Se obtiene del animal un suero que contiene anticuerpos anti-UCH-L1 desangrándolo o sacrificándolo. El suero puede usarse tal como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina a partir del suero o pueden purificarse los anticuerpos anti-UCH-L1 a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidos de esta manera son policlonales, por lo que tienen una serie heterogénea de propiedades.

Una vez que se ha detectado una respuesta inmunitaria, por ejemplo, anticuerpos específicos para el antígeno de UCH-L1 en el suero de la rata, se recoge el bazo de la rata y se aíslan los esplenocitos. A continuación,

los esplenocitos se fusionan mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., EE.UU.). Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. A continuación, los clones de hibridoma se analizan mediante métodos conocidos en la técnica para detectar células que secreten anticuerpos capaces de unirse a UCH-L1. El líquido de ascitis, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, puede generarse inmunizando ratas con clones de hibridoma positivos.

En otra realización, pueden prepararse hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, se sacrifica al animal y las células B esplénicas se fusionan con células de mieloma inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección de antibióticos, los hibridomas se criban usando UCH-L1, o una porción de la misma, o una célula que exprese UCH-L1. En una realización preferida, el cribado inicial se realiza usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de cribado ELISA se proporciona en la Publicación de PCT N° WO 00/37504.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-UCH-L1 se seleccionan, se clonan y se someten a cribado adicional para determinar las características deseables, incluyendo el crecimiento robusto del hibridoma, la producción elevada de anticuerpos y las características deseables de los anticuerpos. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse in vivo en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmunitario, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular in vitro. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de rata. En otra realización, los hibridomas se producen en una especie no humana, no rata, como ratones, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra realización preferida más, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma humano no secretor se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-UCH-L1.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden producirse por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas como papaína (para producir dos fragmentos Fab idénticos) o pepsina (para producir un fragmento F(ab')₂). Un fragmento F(ab')₂ de una molécula de IgG conserva los dos sitios de unión a antígeno de la molécula de IgG más grande ("original"), incluyendo ambas cadenas ligeras (que contienen las regiones de cadena ligera variable y cadena ligera constante), los dominios CH1 de las cadenas pesadas y una región bisagra formadora de disulfuro de la molécula IgG original. Por consiguiente, un fragmento F(ab')₂ sigue siendo capaz de reticular moléculas de antígeno como la molécula IgG original.

(2) Anticuerpos monoclonales anti-UCH-L1 usando SLAM

Alternativamente, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento conocido en la técnica como método de anticuerpos linfocitarios seleccionados (SLAM), tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5,627,052; la Publicación de PCT N° WO 92/02551; y Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7843-7848 (1996). En este método, las células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de cualquiera de los animales inmunizados, se criban usando un ensayo de placa hemolítica específica de antígeno, en donde el antígeno de UCH-L1, una subunidad de UCH-L1, o un fragmento del mismo, se acopla a glóbulos rojos de oveja usando un conector, como biotina, y se usa para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para UCH-L1. Después de la identificación de las células secretoras de anticuerpos de interés, los ADNc de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se rescatan de las células mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) y estas regiones variables pueden expresarse luego, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células huésped de mamífero, como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados in vivo, pueden someterse luego a análisis y selección adicionales in vitro, por ejemplo, mediante la selección de las células transfectadas para aislar células que expresen anticuerpos frente a UCH-L1. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse además in vitro, por ejemplo, mediante un método de maduración por afinidad in vitro. Véase, por ejemplo, la Publicación de PCT N° WO 97/29131 y la Publicación de PCT N° WO 00/56772.

(3) Anticuerpos monoclonales anti-UCH-L1 usando animales transgénicos

Alternativamente, los anticuerpos se producen inmunizando un animal no humano que comprende parte, o la totalidad, del locus de inmunoglobulina humana con un antígeno de UCH-L1. En una realización, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE®, una cepa de ratón manipulada que comprende fragmentos grandes del locus de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green et al., *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994) y las Patentes de Estados Unidos N° 5,916,771; 5,939,598; 5,985,615; 5,998,209; 6,075,181; 6,091,001; 6,114,598; y 6,130,364. Véanse también las Publicaciones de PCT N° WO 91/10741; WO

94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; y WO 00/37504. El ratón transgénico XENOMOUSE® produce un repertorio humano adulto de anticuerpos totalmente humanos y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE® contiene aproximadamente el 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos YAC con configuración de línea germinal de tamaño megabase de los loci de cadena pesada y x de cadena ligera humanos. Véase Mendez et al., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998).

(4) Anticuerpos monoclonales anti-UCH-L1 usando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

Para elaborar los anticuerpos usados en la invención también pueden usarse métodos in vitro, en donde se criba una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de unión a UCH-L1 deseada. Los métodos para dicho cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5,223,409 (Ladner et al.); Publicación de PCT Nº WO 92/18619 (Kang et al.); Publicación de PCT Nº WO 91/17271 (Dower et al.); Publicación de PCT Nº WO 92/20791 (Winter et al.); Publicación de PCT Nº WO 92/15679 (Markland et al.); Publicación de PCT Nº WO 93/01288 (Breitling et al.); Publicación de PCT Nº WO 92/01047 (McCafferty et al.); Publicación de PCT Nº WO 92/09690 (Garrard et al.); Fuchs et al, *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2003/0186374; y Publicación de PCT Nº WO 97/29131.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto inmunizado con UCH-L1, o una porción de UCH-L1. Alternativamente, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto no tratado previamente, es decir, que no haya sido inmunizado con UCH-L1, como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no haya sido inmunizado con UCH-L1 humana. Los anticuerpos usados en la invención se seleccionan por cribado de la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende UCH-L1 humana para seleccionar de este modo los anticuerpos que reconocen UCH-L1. Los métodos para llevar a cabo dicho cribado y selección son bien conocidos en la técnica, como los descritos en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos usados en la invención que tienen afinidades de unión particulares para UCH-L1, como los que se disocian de UCH-L1 humana con una constante de velocidad de K_{off} particular, puede usarse el método conocido en la técnica de resonancia de plasmones de superficie para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de velocidad de K_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos usados en la invención que tienen una actividad neutralizante particular para hUCH-L1, como los que tienen una IC_{50} particular, pueden usarse métodos estándar conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de UCH-L1.

En un aspecto, la invención usa un anticuerpo aislado, o a una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a la UCH-L1 humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En varias realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos también pueden generarse usando varios métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan en la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. Tales fagos pueden usarse para mostrar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizados por disulfuro fusionados recombinantemente a la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para elaborar los anticuerpos incluyen los divulgados en Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene*, 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994); Publicación de PCT Nº WO 92/01047; Publicaciones de PCT Nº WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de Estados Unidos Nº 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de los fagos, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe con detalle a continuación. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir

recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica como los descritos en la publicación de PCT N° WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6): 864-869 (1992); Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34 (1995); y Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988). Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 4,946,778 y 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science*, 240: 1038-1041 (1988).

Como alternativa al cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fagos, a la identificación de anticuerpos usados en la invención pueden aplicársele otras metodologías conocidas en la técnica para el cribado de bibliotecas combinatorias grandes. Un tipo de sistema de expresión alternativo es aquel en el que la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones ARN-proteína, como se describe en la Publicación de PCT N° WO 98/31700 (Szostak y Roberts), y en Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302 (1997). En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína que codifica mediante la traducción in vitro de ARNm sintéticos que llevan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por tanto, puede enriquecerse un ARNm específico a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o proteína codificados, por ejemplo, anticuerpo, o porción del mismo, como la unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de doble especificidad. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas del cribado de dichas bibliotecas pueden expresarse mediante medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células huésped de mamífero) y, además, pueden someterse a una maduración por afinidad adicional mediante rondas adicionales de cribado de fusiones ARNm-péptido en las que se han introducido mutaciones en la secuencia o secuencias originalmente seleccionadas, o mediante otros métodos para la maduración por afinidad in vitro de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo preferido de esta metodología es la tecnología de presentación PROfusion.

En otro enfoque, los anticuerpos también pueden generarse usando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura y presentarlos en la superficie de la levadura. En particular, dicha levadura puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de presentación en levadura que pueden usarse para elaborar los anticuerpos incluyen los divulgados en la Patente de Estados Unidos N° 6,699,658 (Wittrup et al.).

d. Producción de anticuerpos contra UCH-L1 recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión a partir de células huésped, en donde el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Se pretende que las varias formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, transfección DEAE-dextrano, y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos usados en la invención en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferible en células huésped de mamífero, porque tales células eucariotas (y en particular las células de mamífero) tienen más probabilidades que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

Las células huésped de mamífero ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes usados en la invención incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Las células huésped también pueden usarse para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que en el procedimiento anterior pueden realizarse variaciones. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique fragmentos funcionales o de la cadena ligera y/o de la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo usado en la invención (es decir, se une a la UCH-L1 humana) y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de la UCH-L1 humana

mediante la reticulación de un anticuerpo usado en la invención a un segundo anticuerpo por métodos químicos estándar de reticulación.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, usado en la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo están cada uno enlazados operativamente a elementos reguladores del potenciador de CMV/promotor de AdMLP para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que hayan sido transfectadas con el vector mediante selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo se usan técnicas estándar de biología molecular. Además, la presente divulgación describe un método para sintetizar un anticuerpo recombinante usado en la invención cultivando una célula huésped de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

(1) Anticuerpo humanizado

El anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o porción del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. El anticuerpo humanizado puede ser de un anticuerpo de una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana.

Como se usa en la presente, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. De acuerdo con un aspecto, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena pesada humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de una cadena pesada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgG 1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y para optimizar las funciones efectoras deseadas pueden seleccionarse dominios constantes particulares usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen por qué corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco de consenso pueden ser mutagenizados por sustitución, inserción y/o delección de por lo menos un residuo de aminoácidos de tal manera que el residuo de CDR o marco en ese sitio no se corresponda ni con el anticuerpo donante ni con el marco de consenso. En una realización, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Habitualmente, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán con los de las secuencias FR y CDR parentales. Como se usa en la presente, el término "marco de consenso" se refiere a la región marco en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Como se usa en la presente, el término "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con mayor frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que aparece más frecuentemente en esa posición en la familia. Si hay dos aminoácidos que aparecen con la misma frecuencia, en la secuencia de consenso puede incluirse cualquiera de ellos.

El anticuerpo humanizado puede diseñarse para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia anticuerpos antihumanos de roedores, lo que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esas

moléculas en receptores humanos. El anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo desde una fuente no humana. Estos residuos no humanos se denominan a menudo residuos "de importación", que típicamente se toman de un dominio variable. La humanización puede realizarse sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo humano en el que algunos residuos de la región hipervariable, y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización o manipulación de anticuerpos de la presente divulgación puede realizarse usando cualquier método conocido, como, por ejemplo, pero no limitado a, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; y 4,816,567.

El anticuerpo humanizado puede conservar una alta afinidad por la UCH-L1 y otras propiedades biológicas favorables. El anticuerpo humanizado puede prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse los residuos de FR a partir de las secuencias receptoras e importadoras de tal manera que se logren las características deseadas del anticuerpo, como una afinidad aumentada por la UCH-L1. En general, los residuos de la región hipervariable pueden estar directa y sustancialmente implicados en la influencia de la unión al antígeno.

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos (también denominados en la presente "anticuerpos completamente humanos"). Por ejemplo, es posible aislar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas mediante PROfusión y/o tecnologías relacionadas con levadura. También es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpos (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Los anticuerpos humanizados o totalmente humanos pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5,770,429; 5,833,985; 5,837,243; 5,922,845; 6,017,517; 6,096,311; 6,111,166; 6,270,765; 6,303,755; 6,365,116; 6,410,690; 6,682,928; y 6,984,720.

e. Anticuerpos Anti-UCH-L1

Los anticuerpos anti-UCH-L1 pueden generarse usando las técnicas descritas anteriormente, así como usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-UCH-L1 puede ser un anticuerpo contra UCH-L1 no conjugado, como los anticuerpos UCH-L1 disponibles en United State Biological (Número de Catálogo: 031320), Cell Signaling Technology (Número de Catálogo: 3524), Sigma-Aldrich (Número de Catálogo: HPA005993), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Números de Catálogo: sc-58593 o sc-58594), R&D Systems (Número de Catálogo: MAB6007), Novus Biologicals (Número de Catálogo: NB600-1160), Biorbyt (Número de Catálogo: orb33715), Enzo Life Sciences, Inc. (Número de Catálogo: ADI-905-520-1), Bio-Rad (Número de Catálogo: VMA00004), BioVision (Número de Catálogo: 6130-50), Abcam (Números de Catálogo: ab75275 o ab104938), Invitrogen Antibodies (Números de Catálogo: 480012), ThermoFisher Scientific (Números de Catálogo: MA1-46079, MA5-17235, MA1-90008, o MA1-83428), EMD Millipore (Número de Catálogo: MABN48), o Sino Biological Inc. (Número de catálogo: 50690-R011). El anticuerpo anti-UCH-L1 puede conjugarse con un fluoróforo, como los anticuerpos contra UCH-L1 conjugados disponibles en BioVision (Número de catálogo: 6960-25) o Aviva Systems Biology (Números de catálogo: OAAF01904-FITC).

4. Combinaciones de UCH-L1 con otros biomarcadores

Como se explicará con más detalle a continuación, los anticuerpos descritos en la presente pueden usarse en una variedad de métodos para detectar y medir niveles y concentraciones de UCH-L1 en combinación con uno o más biomarcadores o inmunoensayos específicos de la enfermedad. La presente divulgación contempla que la combinación de UCH-L1 con uno o más biomarcadores o inmunoensayos específicos para la enfermedad puede proporcionar una mayor discriminación entre controles sanos e individuos con enfermedad en comparación con la medición de UCH-L1 sola. Por ejemplo, la medición de un panel de UCH-L1 y biomarcadores adicionales de lesión cerebral traumática puede proporcionar una mayor discriminación entre controles sanos e individuos con enfermedad en comparación con un panel de UCH-L1 solo. La combinación de UCH-L1 con por lo menos uno o más biomarcadores

puede proporcionar una mayor discriminación entre controles sanos e individuos con lesión cerebral traumática. Los ejemplos de los uno o más biomarcadores incluyen la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la proteína B de unión al calcio S100 (S100b), la proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP), la aldolasa C (ALDOC), la fosfoproteína astrocítica 15 (PEA15), glutamina sintetasa (GS), cadena de cristalina B (CRYAB), enolasa específica de neuronas (NSE), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Tau, P-tau, proteína c reactiva (CRP), apolipoproteína A-I (ApoA1) y NFL. Tales ensayos de panel pueden llevarse a cabo opcionalmente comparando ensayos independientes, (por ejemplo, ensayos singleplex). Alternativamente, los métodos descritos en la presente pueden realizarse usando ensayos multiplex. Tales métodos multiplex pueden incluir opcionalmente uno o más (o alternativamente dos o más) miembros de unión específica para detectar uno o más (o alternativamente dos o más) analitos diana en la muestra en un ensayo multiplex. Cada uno de los uno o más (o alternativamente dos o más) miembros de unión específica se une opcionalmente a un analito diana diferente y cada miembro de unión específica se conjuga con un compuesto generador de señal o sustrato generador de señal diferente. Por ejemplo, un primer miembro de unión específica se une a un primer analito diana, un segundo miembro de unión específica se une a un segundo analito diana, un tercer miembro de unión específica se une a un tercer analito diana, etc. y el primer miembro de unión específica se marca con un primer compuesto generador de señales o un primer sustrato generador de señales, el segundo miembro de unión específica se marca con un segundo compuesto generador de señales o un segundo sustrato generador de señales, el tercer miembro de unión específica se marca con un tercer compuesto generador de señales o un tercer sustrato generador de señales, etc. En algunas realizaciones, una primera condición provoca la activación, la escisión o la liberación del primer compuesto generador de señales o del primer sustrato generador de señales si el primer miembro de unión específica está marcado con un compuesto generador de señales o un primer sustrato generador de señales, una segunda condición provoca la activación, escisión o liberación del segundo compuesto generador de señales o del segundo sustrato generador de señales si el segundo miembro de unión específica está marcado con un compuesto generador de señales o con un sustrato generador de señales, una tercera condición provoca la activación, escisión o liberación del tercer compuesto generador de señales o del tercer sustrato generador de señales si el tercer miembro de unión específica está marcado con un compuesto generador de señales o con un sustrato generador de señales, etc. En algunas realizaciones, las condiciones de la muestra pueden cambiarse en varios momentos durante el ensayo, permitiendo la detección del primer compuesto generador de señales o primer sustrato generador de señales, el segundo compuesto generador de señales o segundo sustrato generador de señales, el tercer compuesto generador de señales o tercer sustrato generador de señales, etc., detectando de este modo los uno o más (o alternativamente dos o más) analitos diana. En algunas realizaciones, los uno o más (o alternativamente dos o más) compuestos generadores de señales o sustratos generadores de señales activados o escindidos se detectan simultáneamente. En algunas realizaciones, los uno o más (o alternativamente dos o más) compuestos generadores de señales activados o escindidos o sustratos generadores de señales se detectan consecutivamente. En algunas realizaciones, los uno o más (o alternativamente dos o más) compuestos generadores de señales o sustratos generadores de señales activados o escindidos generan una señal detectable diferente, como una señal de fluorescencia de longitud de onda diferente.

Alternativamente, cada uno de los uno o más (o alternativamente dos o más) miembros de unión específica se une a un analito diana diferente y cada miembro de unión específica se conjuga con un soporte sólido diferente, por ejemplo, como una perla de fluoróforo diferente. Por ejemplo, un primer miembro de unión específica se une a un primer analito diana, un segundo miembro de unión específica se une a un segundo analito diana, un tercer miembro de unión específica se une a un tercer analito diana, etc., el primer miembro de unión específica está marcado con un primer compuesto generador de señales o un primer sustrato generador de señales, el segundo miembro de unión específica está marcado con un segundo compuesto generador de señales o un segundo sustrato generador de señales, el tercer miembro de unión específica está marcado con un tercer compuesto generador de señales o un tercer sustrato generador de señales, etc., y el primer miembro de unión específica se inmoviliza en un primer soporte sólido, el segundo miembro de unión específica se inmoviliza en un segundo soporte sólido, el tercer miembro de unión específica se inmoviliza en un tercer soporte sólido, etc. En algunas realizaciones, los uno o más (o alternativamente dos o más) compuestos generadores de señales activados o escindidos o sustratos generadores de señales generan una señal detectable diferente, como una señal de longitud de onda o fluorescencia diferente, y los diferentes soportes sólidos se detectan simultánea o consecutivamente.

En algunas realizaciones, un primer miembro de unión específica se une a un primer analito diana, un segundo miembro de unión específica se une a un segundo analito diana, un tercer miembro de unión específica se une a un tercer analito diana, etc., el primer miembro de unión específica, el segundo miembro de unión específica, el tercer miembro de unión específica, etc. están marcados con un compuesto generador de señales o un sustrato generador de señales, y el primer miembro de unión específica se inmoviliza en un primer soporte sólido, el segundo miembro de unión específica se inmoviliza en un segundo soporte sólido, el tercer miembro de unión específica se inmoviliza en un tercer soporte sólido, etc. En algunas realizaciones, los compuestos generadores de señales activados o escindidos o los sustratos generadores de señales generan una señal detectable, como una señal de longitud de onda o fluorescencia diferente, y los diferentes soportes sólidos se detectan simultánea o consecutivamente.

5. métodos basados en el estado de UCH-L1 y el estado de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

La presente divulgación se refiere a un método de evaluación del estado de la proteína del ácido fibrilar glial (GFAP) y UCH-L1 de un sujeto como medida de lesión cerebral traumática. El método incluye los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica, simultánea o secuencialmente, con: (i) un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica, en donde el primer miembro de unión específica y el segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a GFAP; y (ii) un tercer miembro de unión específica y un cuarto miembro de unión específica, en donde el tercer miembro de unión específica y el cuarto miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1 produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden primer miembro de unión específica-GFAP-segundo miembro de unión específica y uno o más segundos complejos que comprenden tercer miembro de unión específica-UCH-L1-cuarto miembro de unión específica, en donde el segundo miembro de unión específica y el cuarto miembro de unión específica comprenden un primer marcador detectable y un segundo marcador detectable, respectivamente; y b) evaluar una señal de los uno o más primeros y segundos complejos, en donde (i) la presencia de una primera señal detectable del primer marcador detectable indica que hay GFAP en la muestra y la cantidad de primera señal detectable del primer marcador detectable indica la cantidad de GFAP presente en la muestra, de tal manera que la presencia y/o cantidad de la primera señal detectable del primer marcador detectable puede emplearse para evaluar el estado de GFAP de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática y (ii) la presencia de una segunda señal detectable del segundo marcador detectable indica que hay UCH-L1 en la muestra y la cantidad de segunda señal detectable del segundo marcador detectable indica la cantidad de UCH-L1 presente en la muestra, de tal manera que la presencia y/o la cantidad de la segunda señal detectable del segundo marcador detectable puede emplearse para evaluar el estado de UCH-L1 de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática. El método (i) puede usarse para determinar niveles de hasta 50.000 pg/ml de GFAP y 25.000 pg/ml de UCH-L1, (ii) no requiere dilución de la muestra biológica, y (iii) se lleva a cabo usando un dispositivo de punto de atención.

La presente divulgación también se refiere a un método de medición de GFAP y UCH-L1 en una muestra biológica de un sujeto que puede haber sufrido una lesión en la cabeza. El método incluye (a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto, (b) poner en contacto la muestra biológica con, o simultánea o secuencialmente, en cualquier orden (1) (i) un anticuerpo de captura, que se une a un epítipo en GFAP o fragmento de GFAP para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de GFAP, y (ii) un anticuerpo de detección que incluye un marcador detectable y se une a un epítipo de GFAP al que no se ha unido el anticuerpo de captura, para formar un complejo antígeno de GFAP-anticuerpo de detección, y (2) (i) un anticuerpo de captura, que se une a un epítipo de UCH-L1 o fragmento de UCH-L1 para formar un complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1 y (ii) un anticuerpo de detección que incluye un marcador detectable y se une a un epítipo de UCH-L1 al que no se ha unido el anticuerpo de captura, para formar un complejo antígeno de UCH-L1-anticuerpo de detección, y (c) determinar la cantidad o concentración de GFAP y UCH-L1 en la muestra biológica basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo anticuerpo de captura-antígeno de GFAP-anticuerpo de detección y el complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-detección. El método puede usarse para determinar niveles de GFAP en una cantidad de menos de o igual a 50.000 pg/ml y de UCH-L1 en una cantidad de menos de o igual a 25.000 pg/ml. El método tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal sobre dicho intervalo dinámico.

La presente divulgación se refiere a un método para evaluar el estado de GFAP y UCH-L1 de un sujeto como medida de lesión cerebral traumática en donde dicho sujeto puede haber sufrido una lesión en la cabeza. El método incluye el paso de: detectar por lo menos dos biomarcadores en una muestra biológica de dicho sujeto en donde por lo menos dos de los biomarcadores son GFAP y UCH-L1. El método (i) puede usarse para determinar niveles de GFAP en una cantidad menor o igual a 50.000 pg/ml y niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, (ii) tiene un intervalo dinámico de 5 log, y (iii) es lineal sobre el intervalo dinámico.

La presente divulgación se refiere a un método para evaluar el estado de GFAP y UCH-L1 como una medida de lesión cerebral traumática en un sujeto que puede haber sufrido una lesión en la cabeza. El método incluye los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica, ya sea simultánea o secuencialmente, con: (i) un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica, en donde el primer miembro de unión específica y el segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a GFAP; y (ii) un tercer miembro de unión específica y un cuarto miembro de unión específica, en donde el tercer miembro de unión específica y el cuarto miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1 produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden primer miembro de unión específica-GFAP-segundo miembro de unión específica y uno o más segundos complejos que comprenden tercer miembro de unión específica-UCH-L1-cuarto miembro de unión específica, en donde el segundo miembro de unión específica y el cuarto miembro de unión específica comprenden un primer marcador detectable y un segundo marcador detectable, respectivamente; y b) evaluar una señal de los uno o más primeros y segundos complejos, en donde (i) la presencia de una primera señal detectable del primer marcador detectable indica que hay GFAP en la muestra y la cantidad de primera señal detectable del primer marcador detectable indica la cantidad de GFAP presente en la muestra, de tal manera que puede emplearse la presencia y/o cantidad de la primera señal detectable del primer marcador detectable para evaluar el estado de GFAP de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática y (ii) la presencia de una segunda señal detectable del segundo marcador detectable indica que hay UCH-L1 en la muestra y la cantidad de segunda señal detectable del segundo marcador detectable indica la cantidad de UCH-L1 presente en la muestra, de tal manera que puede emplearse la presencia y/o la cantidad de segunda señal detectable del segundo marcador detectable para

evaluar el estado de UCH-L1 de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática. El método puede usarse para determinar los niveles de GFAP en una cantidad menor o igual a 50.000 pg/ml y los niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, y en donde dicho método tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal sobre dicho intervalo dinámico.

La presente divulgación se refiere a un método para medir el estado de GFAP y UCH-L1 como UNA medida de lesión cerebral traumática en un sujeto que puede haber sufrido una lesión en la cabeza. El método incluye los pasos de: a) poner en contacto una muestra biológica, ya sea simultánea o secuencialmente, con: (i) un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica, en donde el primer miembro de unión específica y el segundo miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a GFAP; y (ii) un tercer miembro de unión específica y un cuarto miembro de unión específica, en donde el tercer miembro de unión específica y el cuarto miembro de unión específica se unen cada uno específicamente a UCH-L1, produciendo de este modo uno o más primeros complejos que comprenden el primer miembro de unión específica-GFAP-segundo miembro de unión específica y uno o más segundos complejos que comprenden el tercer miembro de unión específica-UCH-L1-cuarto miembro de unión específica, en donde el segundo miembro de unión específica y el cuarto miembro de unión específica comprenden un primer marcador detectable y un segundo marcador detectable, respectivamente; b) detectar una señal de los uno o más primeros y segundos complejos, donde la presencia de una primera señal detectable del primer marcador detectable indica que hay GFAP en la muestra y la presencia de la segunda señal detectable del segundo marcador detectable indica que hay UCH-L1 en la muestra; y c) medir la cantidad de (i) la primera señal detectable del primer marcador detectable indica la cantidad de GFAP presente en la muestra y (ii) la segunda señal detectable del segundo marcador detectable indica la cantidad de UCH-L1 presente en la muestra, de tal manera que la cantidad de la primera señal detectable del primer marcador detectable y la cantidad de la segunda señal detectable del segundo marcador detectable pueden emplearse para evaluar el estado de GFAP y UCH-L1 de dicho sujeto como medida de lesión cerebral traumática. El ensayo es capaz de determinar una cantidad de GFAP menor o igual a 50.000 pg/ml y una cantidad de UCH-L1 menor o igual a 25.000 pg/ml en un volumen de aproximadamente 20 microlitros de muestra de prueba, en donde dicho ensayo tiene un intervalo dinámico de 5 log, y es lineal sobre dicho intervalo dinámico.

Los métodos mencionados anteriormente basados en el estado de UCH-L1 y GFAP pueden realizarse en un formato multiplex. Los métodos para realizar formatos multiplex son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, los métodos mencionados anteriormente pueden llevarse a cabo como ensayos separados de un único biomarcador (es decir, no en formato multiplex).

Los métodos mencionados anteriormente basados en el estado de UCH-L1 y el estado de GFAP pueden detectar niveles de GFAP seleccionados del grupo que consiste en de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 15 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 35 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, y de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo seleccionado de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml, y de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP.

Los métodos mencionados anteriormente basados en el estado de UCH-L1 y el estado de GFAP pueden detectar niveles de UCH-L1 seleccionados del grupo que consiste en de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 16 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 35 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 20.000 pg/ml, de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 15.000 pg/ml y de aproximadamente 175 pg/ml a aproximadamente 10.000 pg/ml.

En algunas realizaciones, pueden determinarse, medirse o evaluarse un intervalo seleccionado de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 25 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 30 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml, y de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP y puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 5 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP y puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP y puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 12 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

En algunas realizaciones, puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 50.000 pg/ml de GFAP y puede determinarse, medirse o evaluarse un intervalo de aproximadamente 20 pg/ml a aproximadamente 25.000 pg/ml de UCH-L1.

6. Anticuerpos contra GFAP

Los métodos descritos en la presente pueden usar un anticuerpo aislado que se une específicamente a GFAP, denominado "anticuerpo contra GFAP". Los anticuerpos contra GFAP pueden usarse para evaluar el estado de GFAP como medida de lesión cerebral traumática, detectar la presencia de GFAP en una muestra biológica, cuantificar la cantidad de GFAP presente en una muestra biológica, o detectar la presencia y cuantificar la cantidad de GFAP en una muestra biológica.

a. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína filamentosa intracitoplasmática de 50 kDa que constituye una parte del citoesqueleto de los astrocitos, y ha demostrado ser el marcador más específico de las células de origen astrocítico. La proteína GFAP está codificada por el gen GFAP en humanos. La GFAP es el principal filamento intermedio de los astrocitos maduros. En el dominio de bastón central de la molécula, la GFAP comparte una homología estructural considerable con los demás filamentos intermedios. La GFAP interviene en la motilidad y

la forma de los astrocitos proporcionando estabilidad estructural a los procesos astrocíticos. La proteína ácida fibrilar glial y sus productos de degradación (GFAP-BDP) son proteínas específicas del cerebro que se liberan en la sangre como parte de la respuesta fisiopatológica tras una lesión cerebral traumática (TBI). Tras una lesión en el SNC humano provocada por un traumatismo, trastornos genéticos o sustancias químicas, los astrocitos proliferan y muestran una hipertrofia extensa del cuerpo y los procesos celulares, y la GFAP aumenta de forma marcada. Por el contrario, con el aumento de la enfermedad maligna de los astrocitos, se produce una pérdida progresiva de la producción de GFAP. La GFAP también puede detectarse en células de Schwann, células de la glía entérica, neoplasias de las glándulas salivales, carcinomas renales metastásicos, cartílago epiglótico, pituitarios, oligodendrocitos inmaduros, meningiomas papilares y células mioepiteliales de la mama.

El GFAP humano puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLRLARMPPPLPTRVDFS
LAGALNAGFKETRASERAEMMELNDRFASYIEKVRFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTK
LADVYQAEELRELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLATVRQKLQDETNLRLAENNL
AAYRQEADEATLARLDLERKIESLEEEIRFLRKIHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAKP
DLTAALKEIRTQYEAMASSNMHEAEWYRSKFADLTDAARNAEELLRQAKHEANDYR
RQLQSLTCDLESRLGTNESLERQMREQEERHVRVAAASYQEALARLEEEGQSLKDEMAR
HLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLERGEENRITIPVQTFSLNLQIRETSLDTKSVSEGLHK
RNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVM (SEQ ID NO: 2).

La GFAP humana puede ser un fragmento o variante de la SEQ ID NO: 2. El fragmento de GFAP puede tener una longitud de entre 5 y 400 aminoácidos, entre 10 y 400 aminoácidos, entre 50 y 400 aminoácidos, entre 60 y 400 aminoácidos, entre 65 y 400 aminoácidos, entre 100 y 400 aminoácidos, entre 150 y 400 aminoácidos, entre 100 y 300 aminoácidos, o entre 200 y 300 aminoácidos. El fragmento puede comprender un número contiguo de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. El fragmento o variante de GFAP humana de SEQ ID NO: 2 puede ser un producto de descomposición de GFAP (BDP). El BDP de GFAP puede ser de 38 kDa, 42 kDa (más débil 41 kDa), 47 kDa (más débil 45 kDa); 25 kDa (más débil 23 kDa); 19 kDa, o 20 kDa.

b. Anticuerpo de reconocimiento de GFAP

El anticuerpo es un anticuerpo que se une a GFAP, a un fragmento de la misma, a un epítipo de GFAP o a una variante de la misma. El anticuerpo puede ser un fragmento del anticuerpo anti-GFAP o una variante o un derivado del mismo. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano o un fragmento de anticuerpo, como un fragmento Fab, o una mezcla de los mismos. Los fragmentos o derivados de anticuerpos pueden comprender fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv. Los derivados de anticuerpos pueden producirse mediante peptidomiméticos. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla.

Los anticuerpos anti-GFAP pueden ser un anticuerpo anti-GFAP quimérico o un anticuerpo anti-GFAP humanizado. En una realización, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una realización, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico comprenden una única región Fab enlazada a una región Fc.

Los anticuerpos humanos pueden derivarse de la tecnología de presentación en fagos o de ratones transgénicos que expresen genes de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humano puede generarse como resultado de una respuesta inmunitaria humana in vivo y aislarse. Véase, por ejemplo, Funaro et al., BMC Biotechnology, 2008(8):85. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser un producto del repertorio humano y no animal. Al ser de origen humano, pueden minimizarse los riesgos de reactividad contra autoantígenos. Alternativamente, pueden usarse bibliotecas de presentación y tecnologías de presentación en levadura estándar para seleccionar y aislar anticuerpos anti-GFAP humanos. Por ejemplo, pueden usarse bibliotecas de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) humanos sin tratamiento previo para seleccionar anticuerpos anti-GFAP humanos. Pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanos.

Los anticuerpos humanizados pueden ser moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana.

El anticuerpo se distingue de los anticuerpos conocidos en que posee una función o funciones biológicas diferentes de las conocidas en la técnica.

5 (1) Epítipo

El anticuerpo puede unirse inmunoespecíficamente a GFAP (SEQ ID NO: 2), a un fragmento de la misma o a una variante de la misma. El anticuerpo puede reconocer inmunoespecíficamente y unirse a por lo menos tres aminoácidos, por lo menos cuatro aminoácidos, por lo menos cinco aminoácidos, por lo menos seis aminoácidos, por lo menos siete aminoácidos, por lo menos ocho aminoácidos, por lo menos nueve aminoácidos, o por lo menos diez aminoácidos dentro de una región epitópica. El anticuerpo puede reconocer inmunoespecíficamente y unirse a un epítipo que tenga por lo menos tres aminoácidos contiguos, por lo menos cuatro aminoácidos contiguos, por lo menos cinco aminoácidos contiguos, por lo menos seis aminoácidos contiguos, por lo menos siete aminoácidos contiguos, por lo menos ocho aminoácidos contiguos, por lo menos nueve aminoácidos contiguos o por lo menos diez aminoácidos contiguos de una región epitópica.

c. Anticuerpos anti-GFAP

Los anticuerpos anti-GFAP pueden generarse usando las técnicas descritas anteriormente, así como usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GFAP puede ser un anticuerpo contra GFAP no conjugado, como los anticuerpos contra GFAP disponibles en Dako (Número de Catálogo: M0761), ThermoFisher Scientific (Números de Catálogo: MA5-12023, A-21282, 13-0300, MA1-19170, MA1-19395, MA5-15086, MA5-16367, MA1-35377, MA1-06701 o MA1-20035), AbCam (números de catálogo: ab10062, ab4648, ab68428, ab33922, ab207165, ab190288, ab115898 o ab21837), EMD Millipore (Números de catálogo: FCMAB257P, MAB360, MAB3402, 04-1031, 04-1062, MAB5628), Santa Cruz (Números de Catálogo: sc-166481, sc-166458, sc-58766, sc-56395, sc-51908, sc-135921, sc-71143, sc-65343, o sc-33673), Sigma-Aldrich (Números de Catálogo: G3893 o G6171) o Sino Biological Inc. (Número de catálogo: 100140-R012-50). El anticuerpo anti-GFAP puede conjugarse con un fluoróforo, como los anticuerpos contra GFAP conjugados disponibles de ThermoFisher Scientific (Números de Catálogo: A-21295 o A-21294), EMD Millipore (Números de Catálogo: MAB3402X, MAB3402B, MAB3402C, o MAB3402C3) o AbCam (Números de Catálogo: ab49874 o ab194325).

7. Mejora de un método de evaluación del estado de UCH-L1 de un sujeto como medida de la lesión cerebral traumática

En otra realización más, la presente divulgación se dirige a una mejora de un método para evaluar el estado de UCH-L1 de un sujeto como medida de lesión cerebral traumática mediante la evaluación de la presencia o cantidad de UCH-L1 en una muestra biológica. La mejora es que el método permite que el ensayo mida hasta 25.000 pg/ml de UCH-L1 y no requiere dilución de la muestra biológica. En algunas realizaciones, si UCH-L1 es el único biomarcador que se está evaluando, la mejora incluye además usar el método con un dispositivo de punto de atención. El método se realiza usando un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica que se unen específicamente a UCH-L1 y forman los primeros complejos que incluyen el primer miembro de unión específica-UCH-L1-segundo miembro de unión específica. En algunas realizaciones, el segundo miembro de unión específica está marcado cada uno con un marcador detectable.

Otros métodos de detección incluyen el uso o pueden adaptarse para su uso en un dispositivo de nanoporos o un dispositivo de nanopocillos, por ejemplo, para la detección de moléculas individuales. Ejemplos de dispositivos de nanoporos se describen en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2016/161402. Ejemplos de dispositivos de nanopocillos se describen en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2016/161400. También pueden emplearse otros dispositivos y métodos apropiados para la detección de moléculas individuales.

8. Variaciones de los métodos

Los métodos divulgados para determinar la presencia o la cantidad de analito de interés (UCH-L1) presente en una muestra pueden ser los descritos en la presente. Los métodos también pueden adaptarse en función de otros métodos para analizar analitos. Los ejemplos de variantes bien conocidas incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo, como inmunoensayo tipo sándwich (por ejemplo, inmunoensayos monoclonales-monoclonales en sándwich, inmunoensayos monoclonales-policlonales en sándwich, incluyendo la detección enzimática (inmunoensayo enzimático [EIA] o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas [ELISA]), inmunoensayo de inhibición competitiva (por ejemplo, directo e inverso), técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT), un ensayo de unión competitiva, transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), ensayo de detección de anticuerpos en un solo paso, ensayo homogéneo, ensayo heterogéneo, ensayo de captura al vuelo, etc.

a. Inmunoensayo

El analito de interés, y/o péptidos de fragmentos del mismo (por ejemplo, UCH-L1, y/o péptidos o fragmentos

del mismo, es decir, fragmentos de UCH-L1), pueden analizarse usando anticuerpos de UCH-L1 en un inmunoensayo. La presencia o cantidad de analito (por ejemplo, UCH-L1) puede determinarse usando anticuerpos y detectando la unión específica al analito (por ejemplo, UCH-L1). Por ejemplo, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, puede unirse específicamente al analito (por ejemplo, UCH-L1). Si se desea, pueden usarse uno o más de los anticuerpos en combinación con uno o más anticuerpos monoclonales/policlonales disponibles comercialmente. Tales anticuerpos están disponibles de empresas como R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) y Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA).

La presencia o cantidad de analito (por ejemplo, UCH-L1) presente en una muestra corporal puede determinarse fácilmente mediante un inmunoensayo, como el inmunoensayo tipo sándwich (por ejemplo, inmunoanálisis monoclonal-monoclonal en sándwich, inmunoanálisis monoclonal-policlonal en sándwich, incluyendo la detección de radioisótopos (radioinmunoanálisis [RIA]) y la detección enzimática (inmunoanálisis enzimático [EIA] o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas [ELISA] [por ejemplo, Quantikine ELISA assays, R&D Systems, Minneapolis, MN]). Un ejemplo de dispositivo de punto de atención que puede usarse es el i-STAT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Otros métodos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes, en particular uno que emplee el analizador automatizado ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Otros métodos incluyen, por ejemplo, espectrometría de masas, e inmunohistoquímica (por ejemplo, con secciones de biopsias de tejido), usando anticuerpos antianalito (por ejemplo, anti-UCH-L1) (monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados, humanos, etc.) o fragmentos de anticuerpos de los mismos contra el analito (por ejemplo, UCH-L1). Otros métodos de detección incluyen los descritos en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6,143,576; 6,113,855; 6,019,944; 5,985,579; 5,947,124; 5,939,272; 5,922,615; 5,885,527; 5,851,776; 5,824,799; 5,679,526; 5,525,524; y 5,480,792. La unión inmunológica específica del anticuerpo al analito (por ejemplo, UCH-L1) puede detectarse mediante marcadores directos, como etiquetas fluorescentes o luminiscentes, metales y radionúclidos unidos al anticuerpo o mediante marcadores indirectos, como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

Al inmunoensayo puede incorporarse el uso de anticuerpos inmovilizados o fragmentos de anticuerpos de los mismos. Los anticuerpos pueden inmovilizarse en una variedad de soportes, como partículas de matriz magnética o cromatográfica, la superficie de una placa de ensayo (como pocillos de microtitulación), trozos de un material de sustrato sólido, y similares. Puede prepararse una tira de ensayo recubriendo el anticuerpo o la pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. A continuación, esta tira puede sumergirse en la muestra biológica de prueba y procesarse rápidamente a través de lavados y pasos de detección para generar una señal medible, como una mancha coloreada.

Puede usarse un formato homogéneo. Por ejemplo, después de obtener la muestra de prueba de un sujeto, se prepara una mezcla. La mezcla contiene la muestra de prueba que se está evaluando para el analito (por ejemplo, UCH-L1), un primer compañero de unión específica y un segundo compañero de unión específica. El orden en el que se añaden la muestra de prueba, el primer compañero de unión específica y el segundo compañero de unión específica para formar la mezcla no es crítico. La muestra de prueba se pone en contacto simultáneamente con el primer compañero de unión específica y el segundo compañero de unión específica. En algunas realizaciones, el primer compañero de unión específica y cualquier UCH-L1 contenido en la muestra de prueba pueden formar un complejo primer compañero de unión específica-analito (por ejemplo, UCH-L1)-antígeno y el segundo compañero de unión específica puede formar un complejo primer compañero de unión específica-analito de interés (por ejemplo, UCH-L1)-segundo compañero de unión específica. En algunas realizaciones, el segundo compañero de unión específica y cualquier UCH-L1 contenida en la muestra de prueba pueden formar un complejo segundo compañero de unión específica-analito (por ejemplo, UCH-L1)-antígeno y el primer compañero de unión específica puede formar un complejo primer compañero de unión específica-analito de interés (por ejemplo, UCH-L1)-segundo compañero de unión específica. El primer compañero de unión específica puede ser un anticuerpo antianalito (por ejemplo, anticuerpo anti-UCH-L1 que se une a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos tres (3) aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1). El segundo compañero de unión específica puede ser un anticuerpo antianalito (por ejemplo, anticuerpo anti-UCH-L1 que se une a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos tres (3) aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1). Además, el segundo compañero de unión específica está marcado con o contiene un marcador detectable como se ha descrito con anterioridad.

Puede usarse un formato heterogéneo. Por ejemplo, después de haber obtenido la muestra de prueba de un sujeto, se prepara una primera mezcla. La mezcla contiene la muestra de prueba que se está evaluando para el analito (por ejemplo, UCH-L1) y un primer compañero de unión específica, en donde el primer compañero de unión específica y cualquier UCH-L1 contenido en la muestra de prueba forman un complejo de primer compañero de unión específica-analito (por ejemplo, UCH-L1)-antígeno. El primer compañero de unión específica puede ser un anticuerpo antianalito (por ejemplo, anticuerpo anti-UCH-L1 que se une a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos tres (3) aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1). El orden en el que se añaden la muestra de prueba y el primer compañero de unión específica para formar la mezcla no es crítico.

El primer compañero de unión específica puede inmovilizarse en una fase sólida. La fase sólida usada en el inmunoensayo (para el primer compañero de unión específica y, opcionalmente, el segundo compañero de unión

específica) puede ser cualquier fase sólida conocida en la técnica, como, por ejemplo, una partícula magnética, una perla, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula de andamiaje, una película, un papel de filtro, un disco y un chip. En las realizaciones en las que la fase sólida es una perla, la perla puede ser una perla magnética o una partícula magnética. Las perlas/partículas magnéticas pueden ser ferromagnéticas, ferrimagnéticas, paramagnéticas, superparamagnéticas o ferrofluídicas. Los materiales ferromagnéticos ejemplares incluyen Fe, Co, Ni, Gd, Dy, CrO₂, MnAs, MnBi, EuO y NiO/Fe. Ejemplos de materiales ferrimagnéticos incluyen NiFe₂O₄, CoFe₂O₄, Fe₃O₄ (o FeO·Fe₂O₃). Las perlas pueden tener una parte de núcleo sólido que es magnético que está rodeado de una o varias capas no magnéticas. Alternativamente, la parte magnética puede ser una capa alrededor de un núcleo no magnético. El soporte sólido sobre el que se inmoviliza el primer miembro de unión específica puede almacenarse en seco o en un líquido. Las perlas magnéticas pueden someterse a un campo magnético antes o después de entrar en contacto con la muestra con una perla magnética en la que está inmovilizado el primer miembro de unión específica.

Después de que se haya formado la mezcla que contiene el complejo primer compañero de unión específica-analito (por ejemplo, UCH-L1)-antígeno, cualquier analito no unido (por ejemplo, UCH-L1) se elimina del complejo usando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, el analito no unido (por ejemplo, UCH-L1) puede eliminarse mediante lavado. Sin embargo, lo deseable es que el primer compañero de unión específica esté presente en exceso de cualquier analito (por ejemplo, UCH-L1) presente en la muestra de prueba, de tal manera que el primer compañero de unión específica se una a todo el analito (por ejemplo, UCH-L1) presente en la muestra de prueba.

Después de eliminar cualquier analito no unido (por ejemplo, UCH-L1), se añade un segundo compañero de unión específica a la mezcla para formar un complejo de primer compañero de unión específica-analito de interés (por ejemplo, UCH-L1)-segundo compañero de unión específica. El segundo compañero de unión específica puede ser un anticuerpo antianalito (por ejemplo, anticuerpo anti-UCH-L1 que se une a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos tres (3) aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1). Además, el segundo compañero de unión específica está marcado con o contiene un marcador detectable como se ha descrito anteriormente.

El uso de anticuerpos inmovilizados o fragmentos de anticuerpos de los mismos puede incorporarse al inmunoensayo. Los anticuerpos pueden inmovilizarse en una variedad de soportes, como partículas de matriz magnética o cromatográfica (como una perla magnética), partículas de látex o partículas de látex modificadas en superficie, polímero o película de polímero, plástico o película de plástico, sustrato plano, la superficie de una placa de ensayo (como pocillos de microtitulación), trozos de un material de sustrato sólido, y similares. Una tira de ensayo puede prepararse recubriendo el anticuerpo o la pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. A continuación, esta tira puede sumergirse en la muestra biológica de prueba y procesarse rápidamente a través de lavados y pasos de detección para generar una señal medible, como una mancha coloreada.

(1) Inmunoensayo tipo sándwich

Un inmunoensayo tipo sándwich mide la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos (es decir, por lo menos un anticuerpo de captura) y un anticuerpo de detección (es decir, por lo menos un anticuerpo de detección). El anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección se unen a diferentes epítipos del antígeno, por ejemplo, el analito de interés como UCH-L1. Deseablemente, la unión del anticuerpo de captura a un epítipo no interfiere con la unión del anticuerpo de detección a un epítipo. Como anticuerpos de captura y detección en el inmunoensayo tipo sándwich pueden usarse anticuerpos monoclonales o policlonales.

Generalmente, se emplean por lo menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el analito (por ejemplo, UCH-L1) en una muestra de prueba. Más específicamente, los por lo menos dos anticuerpos se unen a ciertos epítipos del analito (por ejemplo, UCH-L1) formando un complejo inmunitario que se denomina "sándwich". Para capturar el analito (por ejemplo, UCH-L1) en la muestra de prueba pueden usarse uno o más anticuerpos (estos anticuerpos se denominan frecuentemente anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y se usan uno o más anticuerpos para unir un marcador detectable (concretamente, cuantificable) al sándwich (estos anticuerpos se denominan frecuentemente anticuerpo de "detección" o anticuerpos de "detección"). En un ensayo tipo sándwich, la unión de un anticuerpo a su epítipo no se ve disminuida por la unión de cualquier otro anticuerpo del ensayo a su epítipo respectivo. Los anticuerpos se seleccionan de tal manera que uno o más primeros anticuerpos puestos en contacto con una muestra de prueba que se sospecha que contiene analito (por ejemplo, UCH-L1) no se unan a todo o parte de un epítipo que es reconocido por segundos o posteriores anticuerpos, interfiriendo de este modo con la capacidad de los uno o más segundos anticuerpos de detección de unirse al analito (por ejemplo, UCH-L1).

En dicho inmunoensayo los anticuerpos pueden usarse como un primer anticuerpo. El anticuerpo se une inmuno-específicamente a epítipos en el analito (por ejemplo, UCH-L1). Además de los anticuerpos de la presente divulgación, dicho inmunoensayo puede comprender un segundo anticuerpo que se une inmuno-específicamente a epítipos que no son reconocidos por o a los que no se une el primer anticuerpo.

Una muestra de prueba sospechosa de contener analito (por ejemplo, UCH-L1) puede ponerse en contacto

con por lo menos un primer anticuerpo (o anticuerpos) de captura y por lo menos un segundo anticuerpo de detección, ya sea simultánea o secuencialmente. En el formato de ensayo tipo sándwich, una muestra de prueba de la que se sospecha que contiene analito (por ejemplo, UCH-L1) se pone primero en contacto con por lo menos un primer anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítipo particular en condiciones que permiten la formación de un primer complejo de anticuerpo-antígeno de analito (por ejemplo, UCH-L1). Si se usa más de un anticuerpo de captura, se forma un primer complejo de anticuerpo de captura múltiple-antígeno de UCH-L1. En un ensayo tipo sándwich, los anticuerpos, preferiblemente, el por lo menos un anticuerpo de captura, se utilizan en cantidades molares en exceso de la cantidad máxima de analito (por ejemplo, UCH-L1) esperada en la muestra de prueba. Por ejemplo, pueden usarse de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por ml de tampón de recubrimiento de micropartículas.

(a) Anticuerpo de captura anti-UCH-L1

Opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra de prueba con por lo menos un primer anticuerpo de captura, el por lo menos un primer anticuerpo de captura puede unirse a un soporte sólido que facilite la separación del primer complejo anticuerpo-analito (por ejemplo, UCH-L1) de la muestra de prueba. Puede usarse cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, soportes sólidos elaborados de materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o perlas (como una micropartícula). El anticuerpo (o anticuerpos) puede unirse al soporte sólido por adsorción, por unión covalente usando un agente de acoplamiento químico o por otros medios conocidos en la técnica, siempre que dicha unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo de unirse al analito (por ejemplo, UCH-L1). Además, si es necesario, el soporte sólido puede derivatizarse para permitir la reactividad con varios grupos funcionales del anticuerpo. Dicha derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento como, entre otros, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Después se incuba la muestra de prueba que se sospecha que tiene analito (por ejemplo, UCH-L1) para permitir la formación de un primer complejo anticuerpo de captura (o anticuerpo múltiple)-analito (por ejemplo, UCH-L1). La incubación puede llevarse a cabo a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a una temperatura de aproximadamente 2° C a aproximadamente 45° C, y durante un periodo de por lo menos aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, de aproximadamente 2-6 minutos, de aproximadamente 7-12 minutos, de aproximadamente 5-15 minutos, o de aproximadamente 3-4 minutos.

(b) Anticuerpo de detección

Después de la formación del complejo primer/múltiple anticuerpo de captura-analito (por ejemplo, UCH-L1), el complejo se pone en contacto con por lo menos un segundo anticuerpo de detección (en condiciones que permitan la formación de un complejo primer/múltiple anticuerpo-antígeno de analito (por ejemplo, UCH-L1)-segundo anticuerpo). En algunas realizaciones, la muestra de prueba se pone en contacto con el anticuerpo de detección simultáneamente con el anticuerpo de captura. Si el complejo de primer anticuerpo-analito (por ejemplo, UCH-L1) se pone en contacto con más de un anticuerpo de detección, entonces se forma un complejo de primer/múltiples anticuerpos de captura-analito (por ejemplo, UCH-L1)-múltiple anticuerpo de detección. Al igual que con el primer anticuerpo, cuando el por lo menos segundo (y posteriores) anticuerpo se pone en contacto con el complejo primer anticuerpo-analito (por ejemplo, UCH-L1), se requiere un periodo de incubación en condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación del complejo primer/múltiple anticuerpo-analito (por ejemplo, UCH-L1)-segundo/múltiple anticuerpo. Preferiblemente, por lo menos un segundo anticuerpo contiene un marcador detectable. El marcador detectable puede unirse por lo menos a un segundo anticuerpo antes, simultáneamente o después de la formación del complejo primer/múltiple anticuerpo-analito (por ejemplo, UCH-L1)-segundo/múltiple anticuerpo. Puede usarse cualquier marcador detectable conocido en la técnica.

Los ensayos quimioluminiscentes pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67 (2006). Aunque puede usarse cualquier formato de ensayo adecuado, un quimioluminómetro de microplacas (Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN) permite el ensayo de múltiples muestras de pequeños volúmenes rápidamente. El quimioluminómetro puede equiparse con múltiples inyectores de reactivos usando microplacas de poliestireno negro de 96 pocillos (Costar N°3792). Cada muestra puede añadirse en un pocillo separado, seguido de la adición simultánea/secuencial de otros reactivos según se determine por el tipo de ensayo empleado. Deseablemente, se evita la formación de pseudobases en soluciones neutras o básicas que empleen un éster arílico de acridinio, por ejemplo, mediante acidificación. La respuesta quimioluminiscente se registra pocillo por pocillo. A este respecto, el tiempo de registro de la respuesta quimioluminiscente dependerá, en parte, del retardo entre la adición de los reactivos y el acridinio particular empleado.

El orden en que se añaden la muestra de prueba y el compañero o compañeros de unión específica para formar la mezcla para el ensayo quimioluminiscente no es crítico. Si el primer compañero de unión específica está marcado de manera detectable con un compuesto de acridinio, se forman complejos de primer compañero de unión específica-antígeno de UCH-L1 marcados detectablemente. Alternativamente, si se usa un segundo compañero de unión específica y el segundo compañero de unión específica está marcado detectablemente con un compuesto de acridinio, se forman complejos de primer compañero de unión específica-analito (por ejemplo, UCH-L1)-segundo

compañero de unión específica marcados detectablemente. Cualquier compañero de unión específica no unido, ya esté marcado o no marcado, puede eliminarse de la mezcla usando cualquier técnica conocida en la técnica, como el lavado.

5 El peróxido de hidrógeno puede generarse in situ en la mezcla o proporcionarse o suministrarse a la mezcla antes, simultáneamente o después de la adición de un compuesto de acridinio anteriormente descrito. El peróxido de hidrógeno puede generarse in situ de varias maneras, como será evidente para un experto en la técnica.

10 Alternativamente, puede añadirse simplemente una fuente de peróxido de hidrógeno a la mezcla. Por ejemplo, la fuente de peróxido de hidrógeno puede ser uno o más tampones u otras soluciones que se sabe que contienen peróxido de hidrógeno. A este respecto, simplemente puede añadirse una solución de peróxido de hidrógeno.

15 Tras la adición simultánea o posterior de por lo menos una solución básica a la muestra, se genera una señal detectable, concretamente, una señal quimioluminiscente, indicativa de la presencia de UCH-L1. La solución básica contiene por lo menos una base y tiene un pH mayor o igual de 10, preferiblemente mayor o igual de 12. Los ejemplos de soluciones básicas incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio y bicarbonato de calcio. La cantidad de solución básica añadida a la muestra depende de la concentración de la solución básica. Sobre la base de la concentración de la solución básica usada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de solución básica que debe añadirse a la muestra. Pueden emplearse otros marcadores distintos de los marcadores quimioluminiscentes. Por ejemplo, pueden emplearse marcadores enzimáticos (incluyendo, entre otras, la fosfatasa alcalina).

25 La señal quimioluminiscente, u otra señal, que se genera puede detectarse usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica. Sobre la base de la intensidad de la señal generada, puede cuantificarse la cantidad de analito de interés (por ejemplo, UCH-L1) en la muestra. Específicamente, la cantidad de analito (por ejemplo, UCH-L1) en la muestra es proporcional a la intensidad de la señal generada. La cantidad de analito (por ejemplo, UCH-L1) presente puede cuantificarse comparando la cantidad de luz generada con una curva estándar para el analito (por ejemplo, UCH-L1) o por comparación con un estándar de referencia. La curva estándar puede generarse usando diluciones en serie o soluciones de concentraciones conocidas de analito (por ejemplo, UCH-L1) mediante espectroscopia de masas, métodos gravimétricos y otras técnicas conocidas en la técnica.

35 (2) Ensayo de inhibición competitiva directa

En un formato competitivo directo, se usa una alícuota de analito de interés marcado (por ejemplo, analito que tiene un marcador fluorescente, una etiqueta unida con un conector escindible, etc.) de concentración conocida para competir con el analito de interés en una muestra de prueba para unirse al analito del anticuerpo de interés.

40 En un ensayo de competición directa, un compañero de unión específica inmovilizado (como un anticuerpo) puede ponerse en contacto secuencial o simultáneamente con la muestra de prueba y un analito de interés marcado, un fragmento de analito de interés o una variante de analito de interés del mismo. El analito del péptido de interés, el analito del fragmento de interés o el analito de la variante de interés pueden marcarse con cualquier marcador detectable, incluyendo un marcador detectable compuesto por una etiqueta unida con un conector escindible. En este ensayo, el anticuerpo puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Alternativamente, el anticuerpo puede acoplarse a un anticuerpo, como un anticuerpo antiespecie, que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, como una micropartícula o un sustrato planar.

50 El analito de interés marcado, la muestra de prueba y el anticuerpo se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo tipo sándwich. Entonces pueden generarse dos especies diferentes de complejos anticuerpo-analito de interés. Específicamente, uno de los complejos anticuerpo-analito de interés generados contiene un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente, etc.) mientras que el otro complejo anticuerpo-analito de interés no contiene un marcador detectable. El complejo anticuerpo-analito de interés puede separarse, aunque no tiene por qué, del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación del marcador detectable. Independientemente de si el complejo anticuerpo-analito de interés se separa del resto de la muestra de prueba, luego se cuantifica la cantidad de marcador detectable en el complejo anticuerpo-analito de interés. A continuación, puede determinarse la concentración de analito de interés (como analito de interés asociado a membrana, analito de interés soluble, fragmentos de analito de interés soluble, variantes de analito de interés (analito de interés asociado a membrana o soluble) o cualquier combinación de los mismos) en la muestra de prueba, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

(3) Ensayo de inhibición competitiva inversa

65 En un ensayo de competición inversa, un analito de interés inmovilizado puede ponerse en contacto o secuencial o simultáneamente con una muestra de prueba y por lo menos un anticuerpo marcado.

El analito de interés puede unirse a un soporte sólido, como los soportes sólidos analizados anteriormente en relación con el formato de ensayo tipo sándwich.

El analito de interés inmovilizado, la muestra de prueba y por lo menos un anticuerpo marcado se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo tipo sándwich. A continuación, se generan dos especies diferentes de complejos de analito de interés-anticuerpo. Específicamente, uno de los complejos analito de interés-anticuerpo generados está inmovilizado y contiene un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente, etc.), mientras que el otro complejo analito de interés-anticuerpo no está inmovilizado y contiene un marcador detectable. El complejo analito de interés no inmovilizado-anticuerpo y el resto de la muestra de prueba se retiran de la presencia del complejo analito de interés inmovilizado-anticuerpo mediante técnicas conocidas en la técnica, como el lavado. Una vez se ha eliminado el complejo analito de interés no inmovilizado-anticuerpo, se cuantifica la cantidad de marcador detectable en el complejo analito de interés inmovilizado-anticuerpo después de la escisión de la etiqueta. La concentración de analito de interés en la muestra de prueba puede determinarse comparando la cantidad de marcador detectable como se ha descrito anteriormente.

(4) Inmunoensayo de un paso o ensayo de "captura sobre la marcha"

En un inmunoensayo de captura sobre la marcha, se recubre previamente un sustrato sólido con un agente de inmovilización. El agente de captura, el analito y el agente de detección se añaden juntos al sustrato sólido, seguido de un paso de lavado previo a la detección. El agente de captura puede unir el analito y comprende un ligando para un agente de inmovilización. El agente de captura y los agentes de detección pueden ser anticuerpos o cualquier otra fracción capaz de capturar o detectar como se describe en la presente o se conoce en la técnica. El ligando puede comprender una etiqueta peptídica y un agente de inmovilización puede comprender un anticuerpo anti-etiqueta peptídica. Alternativamente, el ligando y el agente de inmovilización pueden ser cualquier par de agentes capaces de unirse entre sí para ser empleados en un ensayo de captura sobre la marcha (por ejemplo, un par de unión específica y otros como se conoce en la técnica). Puede medirse más de un analito. En algunas realizaciones, el sustrato sólido puede estar recubierto con un antígeno y el analito a analizar es un anticuerpo.

En algunas otras realizaciones, en un inmunoensayo de un solo paso o "captura sobre la marcha", se usa un soporte sólido (como una micropartícula) previamente recubierto con un agente de inmovilización (como biotina, estreptavidina, etc.) y por lo menos un primer miembro de unión específica y un segundo miembro de unión específica (que funcionan como reactivos de captura y detección, respectivamente). El primer miembro de unión específica comprende un ligando para el agente de inmovilización (por ejemplo, si el agente de inmovilización en el soporte sólido es estreptavidina, el ligando en el primer miembro de unión específica puede ser biotina) y también se une al analito de interés. El segundo miembro de unión específica comprende un marcador detectable y se une a un analito de interés. El soporte sólido y el primero y el segundo miembros de unión específica pueden añadirse a una muestra de prueba (ya sea secuencial o simultáneamente). El ligando del primer miembro de unión específica se une al agente de inmovilización del soporte sólido para formar un complejo soporte sólido/primer miembro de unión específica. Cualquier analito de interés presente en la muestra se une al complejo soporte sólido/primer miembro de unión específica para formar un complejo soporte sólido/primer miembro de unión específica/analito. El segundo miembro de unión específica se une al complejo soporte sólido/primer miembro de unión específica/analito y se detecta el marcador detectable. Antes de la detección puede emplearse un paso de lavado opcional. En ciertas realizaciones, en un ensayo de un solo paso puede medirse más de un analito. En ciertas otras realizaciones, pueden emplearse más de dos miembros de unión específica. En ciertas otras realizaciones, pueden añadirse múltiples marcadores detectables. En ciertas otras realizaciones, pueden detectarse múltiples analitos de interés, o medir, determinar o evaluar sus cantidades, niveles o concentraciones.

El uso de un ensayo de captura sobre la marcha puede realizarse en una variedad de formatos, como se describe en la presente, y se conoce en la técnica. Por ejemplo, el formato puede ser un ensayo tipo sándwich como el descrito anteriormente, pero alternativamente puede ser un ensayo de competición, puede emplear un único miembro de unión específica o usar otras variaciones conocidas.

9. Muestras

a. Prueba o muestra biológica

Como se usan en la presente, "muestra", "muestra de prueba", "muestra biológica" se refieren a la muestra de fluido que contiene o se sospecha que contiene UCH-L1. La muestra puede derivarse de cualquier fuente adecuada. En algunos casos, la muestra puede comprender un líquido, un sólido particulado fluido o una suspensión fluida de partículas sólidas. En algunos casos, la muestra puede procesarse antes del análisis descrito en la presente. Por ejemplo, la muestra puede separarse o purificarse de su fuente antes del análisis; sin embargo, en ciertas realizaciones, puede analizarse directamente una muestra no procesada que contenga el analito. La fuente de la molécula de analito puede ser sintética (por ejemplo, producida en un laboratorio), el medio ambiente (por ejemplo, el aire, el suelo, muestras de fluidos, por ejemplo, suministros de agua, etc.), un animal, por ejemplo, un mamífero, una

planta, o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo particular, la fuente de un analito es una sustancia corporal humana (por ejemplo, fluido corporal, sangre como sangre completa, suero, plasma, orina, saliva, sudor, esputo, semen, moco, líquido lagrimal, líquido linfático, líquido amniótico, líquido intersticial, lavado pulmonar, líquido cefalorraquídeo, heces, tejido, órgano o similar). Los tejidos pueden incluir, entre otros, tejido muscular esquelético, tejido hepático, tejido pulmonar, tejido renal, tejido miocárdico, tejido cerebral, médula ósea, tejido cervical, piel, etc. La muestra puede ser una muestra líquida o un extracto líquido de una muestra sólida. En ciertos casos, la fuente de la muestra puede ser un órgano o tejido, como una muestra de biopsia, que puede solubilizarse por disgregación tisular/lisis celular.

Puede analizarse una amplia variedad de volúmenes de la muestra de fluido. En unas pocas realizaciones ejemplares, el volumen de la muestra puede ser de aproximadamente 0,5 nl, aproximadamente 1 nl, aproximadamente 3 nl, aproximadamente 0,01 µl, aproximadamente 0,1 µl, aproximadamente 1 µl, aproximadamente 5 µl, aproximadamente 10 µl, aproximadamente 100 µl, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 10 ml, o similares. En algunos casos, el volumen de la muestra de fluido está entre aproximadamente 0,01 µl y aproximadamente 10 ml, entre aproximadamente 0,01 µl y aproximadamente 1 ml, entre aproximadamente 0,01 µl y aproximadamente 10 µl.

La muestra de fluido no se diluye antes de su uso en un ensayo.

En algunos casos, la muestra puede someterse a un procesamiento preanalítico. El procesamiento preanalítico puede ofrecer una funcionalidad adicional, como la eliminación de proteínas inespecíficas y/o una funcionalidad de mezclado implementable eficaz y económica. Los métodos generales de procesamiento preanalítico pueden incluir el uso de atrapamiento electrocinético, electrocinética de CA, ondas acústicas superficiales, isotacoforesis, dielectroforesis, electroforesis u otras técnicas de preconcentración conocidas en la técnica. En algunos casos, la muestra de fluido puede concentrarse antes de su uso en un ensayo. Por ejemplo, en realizaciones en las que la fuente de una molécula de analito es un fluido corporal humano (por ejemplo, sangre, suero), el fluido puede concentrarse por precipitación, evaporación, filtración, centrifugación o una combinación de las mismas. Una muestra de fluido puede concentrarse aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 100 veces o más antes de su uso.

b. Controles

Puede ser deseable incluir una muestra de control. La muestra de control puede analizarse concurrentemente con la muestra del sujeto, como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos de la muestra del sujeto pueden compararse con los resultados obtenidos de la muestra de control. Pueden proporcionarse curvas estándar, con las que pueden compararse los resultados del ensayo de la muestra biológica. Dichas curvas estándar presentan los niveles del marcador en función de las unidades de ensayo, es decir, la intensidad de la señal fluorescente, si se usa un marcador fluorescente. Usando muestras tomadas de múltiples donantes, pueden proporcionarse curvas estándar para niveles de control o referencia de la UCH-L1 en tejido sano normal, así como para niveles "de riesgo" de la UCH-L1 en tejido tomado de donantes, que pueden tener una o más de las características expuestas anteriormente.

Por tanto, en vista de lo anterior, se proporciona un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de UCH-L1 en una muestra de prueba. El método comprende ensayar la muestra de prueba para UCH-L1 mediante un inmunoensayo, por ejemplo, empleando por lo menos un anticuerpo de captura que se une a un epítipo en UCH-L1 y por lo menos un anticuerpo de detección que se une a un epítipo en UCH-L1 que es diferente del epítipo para el anticuerpo de captura y opcionalmente incluye un marcador detectable, y que comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de UCH-L1 en la muestra de prueba con una señal generada como indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de UCH-L1 en un calibrador. El calibrador forma parte opcionalmente, y preferiblemente, de una serie de calibradores en la que cada uno de los calibradores difiere de los demás calibradores de la serie por la concentración de UCH-L1. En algunas realizaciones, el calibrador puede incluir UCH-L1 o un fragmento de la misma, como se ha descrito anteriormente en la Sección 3a. En algunas realizaciones, el calibrador puede incluir GFAP o fragmento del mismo, como se ha descrito anteriormente en la Sección 6a.

10. Kit

La presente divulgación describe un kit que puede usarse para analizar o evaluar una muestra de prueba para UCH-L1 o un fragmento de UCH-L1. El kit comprende por lo menos un componente para analizar la muestra de prueba para UCH-L1, instrucciones para analizar la muestra de prueba para UCH-L1. Por ejemplo, el kit puede comprender instrucciones para analizar la muestra de prueba para UCH-L1 mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes. Las instrucciones incluidas en los kits pueden adherirse al material de envasado o incluirse como prospecto. Aunque las instrucciones son típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a tales. La presente divulgación contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de

almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Como se usa en la presente, el término "instrucciones" puede incluir la dirección de un sitio de Internet que proporcione las instrucciones.

El por lo menos un componente puede incluir por lo menos una composición que comprenda uno o más anticuerpos aislados o fragmentos de anticuerpos de los mismos que se unen específicamente a UCH-L1. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de captura de UCH-L1 y/o un anticuerpo de detección de UCH-L1.

Alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender un calibrador o control, por ejemplo, UCH-L1 purificada, y opcionalmente liofilizada, y/o por lo menos un recipiente (por ejemplo, tubo, placas de microtitulación o tiras, que pueden estar ya recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-UCH-L1) para realizar el ensayo, y/o un tampón, como un tampón de ensayo o un tampón de lavado, cualquiera de los cuales puede proporcionarse como una solución concentrada, una solución de sustrato para el marcador detectable (por ejemplo, un marcador enzimático), o una solución de detención. En algunas realizaciones, el calibrador o control puede incluir una UCH-L1 o fragmento de la misma, como se ha descrito anteriormente en la Sección 3a. En algunas realizaciones, el calibrador o control puede incluir una GFAP o fragmento de la misma, como se ha descrito anteriormente en la Sección 6a. Preferiblemente, el kit comprende todos los componentes, es decir, reactivos, estándares, tampones, diluyentes, etc., que son necesarios para realizar el ensayo. Las instrucciones también pueden incluir instrucciones para generar una curva estándar.

El kit puede comprender además estándares de referencia para cuantificar la UCH-L1. Los estándares de referencia pueden emplearse para establecer curvas estándar para interpolación y/o extrapolación de concentraciones de UCH-L1. Los estándares de referencia pueden incluir un nivel de concentración de UCH-L1 alto, por ejemplo, aproximadamente 100000 pg/ml, aproximadamente 125000 pg/ml, aproximadamente 150000 pg/ml, aproximadamente 175000 pg/ml, aproximadamente 200000 pg/ml, aproximadamente 225000 pg/ml, aproximadamente 250000 pg/ml, aproximadamente 275000 pg/ml, o aproximadamente 300000 pg/ml; un nivel medio de concentración de UCH-L1, por ejemplo, aproximadamente 25000 pg/ml, aproximadamente 40000 pg/ml, aproximadamente 45000 pg/ml, aproximadamente 50000 pg/ml, aproximadamente 55000 pg/ml, aproximadamente 60000 pg/ml, aproximadamente 75000 pg/ml o aproximadamente 100000 pg/ml; y/o un nivel bajo de concentración de UCH-L1, por ejemplo, aproximadamente 1 pg/ml, aproximadamente 5 pg/ml, aproximadamente 10 pg/ml, aproximadamente 12.5 pg/ml, aproximadamente 15 pg/ml, aproximadamente 20 pg/ml, aproximadamente 25 pg/ml, aproximadamente 30 pg/ml, aproximadamente 35 pg/ml, aproximadamente 40 pg/ml, aproximadamente 45 pg/ml, aproximadamente 50 pg/ml, aproximadamente 55 pg/ml, aproximadamente 60 pg/ml, aproximadamente 65 pg/ml, aproximadamente 70 pg/ml, aproximadamente 75 pg/ml, aproximadamente 80 pg/ml, aproximadamente 85 pg/ml, aproximadamente 90 pg/ml, aproximadamente 95 pg/ml, o aproximadamente 100 pg/ml.

Cualquier anticuerpo proporcionado en el kit, como los anticuerpos recombinantes específicos para UCH-L1, pueden incorporar un marcador detectable, como un fluoróforo, una fracción radiactiva, una enzima, un marcador de biotina/avidina, un cromóforo, un marcador quimioluminiscente, o similares, o el kit puede incluir reactivos para marcar los anticuerpos o reactivos para detectar los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de detección) y/o para marcar los analitos o reactivos para detectar el analito. Los anticuerpos, calibradores y/o controles pueden proporcionarse en recipientes separados o predispensarse en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación,

Opcionalmente, el kit incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe en las hojas de prospectos de una variedad de productos de inmunodiagnóstico. Los miembros del panel de sensibilidad se usan opcionalmente para establecer las características de rendimiento del ensayo, y además opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit de inmunoensayo, y de la estandarización de los ensayos,

El kit también puede incluir opcionalmente otros reactivos requeridos para realizar un ensayo de diagnóstico o facilitar las evaluaciones de control de calidad, como tampones, sales, enzimas, cofactores enzimáticos, sustratos, reactivos de detección y similares. También pueden incluirse en el kit otros componentes, como tampones y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de prueba (por ejemplo, reactivos de pretratamiento). El kit puede incluir adicionalmente uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del kit pueden estar liofilizados, en cuyo caso el kit puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los varios componentes del kit se proporcionan opcionalmente en recipientes adecuados según sea necesario, por ejemplo, una placa de microtitulación. El kit puede incluir además recipientes para contener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o cartucho para una muestra de orina, sangre completa, plasma o suero). Cuando sea apropiado, el kit también puede contener opcionalmente recipientes de reacción, recipientes de mezclado y otros componentes que faciliten la preparación de reactivos o de la muestra de prueba. El kit también puede incluir uno o más instrumentos para ayudar a obtener una muestra de prueba, como una jeringuilla, pipeta, fórceps, cuchara medidora, o similares.

Si el marcador detectable es por lo menos un compuesto de acridinio, el kit puede comprender por lo menos una acridinio-9-carboxamida, por lo menos un éster arílico de acridinio-9-carboxilato, o cualquier combinación de los mismos. Si el marcador detectable es por lo menos un compuesto de acridinio, el kit también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, como un tampón, una solución y/o por lo menos una solución básica. Si se desea, el kit puede contener una fase sólida, como una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, molécula de andamiaje, película, papel de filtro, disco o chip.

Si se desea, el kit puede comprender además uno o más componentes, solos o en combinación adicional con instrucciones, para analizar la muestra de prueba en busca de otro analito, que puede ser un biomarcador, como un biomarcador de lesión o trastorno cerebral traumático.

a. Adaptación del kit y del método

El kit (o los componentes del mismo), así como el método para evaluar o determinar la concentración de UCH-L1 en una muestra de prueba mediante un inmunoensayo, como se describe en la presente, pueden adaptarse para su uso en una variedad de sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquellos en los que la fase sólida comprende una micropartícula), tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5,063,081, las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078, y 2006/0160164 y como se comercializa en el mercado, por ejemplo, por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como Abbott Point of Care (i-STAT® or i-STAT Alinity, Abbott Laboratories) así como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5,089,424 y 5,006,309, y tal como se comercializan en el mercado, por ejemplo, por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT® o la serie de dispositivos de Abbott Alinity.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semiautomatizado en comparación con un sistema no automatizado (por ejemplo, ELISA) incluyen el sustrato al que se une el primer compañero de unión específica (por ejemplo, anticuerpo del analito o anticuerpo de captura) (que puede afectar a la formación del sándwich y a la reactividad del analito), y la duración y la cadencia de la captura, la detección y/o cualquier paso de lavado opcional. Mientras que un formato no automatizado como un ELISA puede requerir un tiempo de incubación relativamente más largo con la muestra y el reactivo de captura (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT® y cualquier plataforma sucesora, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). De manera similar, mientras que un formato no automatizado como un ELISA puede incubar un anticuerpo de detección como el reactivo conjugado durante un tiempo de incubación relativamente más largo (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT® y cualquier plataforma sucesora) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 4 minutos para ARCHITECT® y cualquier plataforma sucesora).

Otras plataformas disponibles de Abbott Laboratories incluyen, entre otras, AxSYM®, IMx® (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.294.404), PRISM®, EIA (perlas) y Quantum™ II, así como otras plataformas. Además, los ensayos, kits y componentes de los kits pueden emplearse en otros formatos, por ejemplo, en sistemas de ensayo electroquímicos u otros sistemas de ensayo manuales o de punto de atención. Como se ha mencionado anteriormente, la presente divulgación es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico comercial Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) que realiza inmunoensayos tipo sándwich. Los inmunosensores y sus métodos de fabricación y funcionamiento en dispositivos de prueba de un solo uso se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.063.081, Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078, y 2006/0160164.

En particular, con respecto a la adaptación de un ensayo al sistema i-STAT®, se prefiere la siguiente configuración. Se fabrica un chip de silicio microfabricado con un par de electrodos de trabajo amperométricos de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. En uno de los electrodos de trabajo, se adhieren perlas de poliestireno (0,2 mm de diámetro) con anticuerpo de captura inmovilizado a un recubrimiento de polímero de alcohol polivinílico estampado sobre el electrodo. Este chip se ensambla en un cartucho i-STAT® con un formato de fluido adecuado para el inmunoensayo. En una parte del chip de silicio, hay un compañero de unión específica para UCH-L1, como uno o más anticuerpos UCH-L1 (uno o más anticuerpos monoclonales/policonales o un fragmento de los mismos, una variante de los mismos o un fragmento de una variante de los mismos que puede unirse a UCH-L1) o uno o más DVD-Igs anti-UCH-L1 (o un fragmento de los mismos, una variante de los mismos o un fragmento de una variante de los mismos que puede unirse a UCH-L1), cualquiera de los cuales puede marcarse de manera detectable. Dentro de la bolsa de fluido del cartucho hay un reactivo acuoso que incluye fosfato de p-aminofenol.

En funcionamiento, se añade una muestra de un sujeto que se sospecha que padece una TBI a la cámara de retención del cartucho de prueba y se inserta el cartucho en el lector i-STAT®. Un elemento de bombeo dentro del cartucho empuja la muestra hacia un conducto que contiene el chip. La muestra se pone en contacto con los sensores, permitiendo que el conjugado enzimático se disuelva en la muestra. La muestra se hace oscilar a través de los sensores para promover la formación del sándwich durante aproximadamente 2-12 minutos. En el penúltimo paso del ensayo, la muestra se empuja a una cámara de desechos y se usa el líquido de lavado, que contiene un sustrato para

la enzima fosfatasa alcalina, para lavar el exceso de conjugado enzimático y la muestra del chip sensor. En el paso final del ensayo, el marcador de fosfatasa alcalina reacciona con el fosfato de p-aminofenol para escindir el grupo fosfato y permitir que el p-aminofenol liberado se oxide electroquímicamente en el electrodo de trabajo. Basándose en la corriente medida, el lector puede calcular la cantidad de UCH-L1 en la muestra por medio de un algoritmo integrado y una curva de calibración determinada en fábrica.

Los métodos y kits descritos en la presente abarcan necesariamente otros reactivos y métodos para llevar a cabo el inmunoensayo. Por ejemplo, están abarcados varios tampones conocidos en la técnica y/o que pueden prepararse u optimizarse fácilmente para emplearse, por ejemplo, para el lavado, como diluyente de conjugado y/o como diluyente de calibrador. Un diluyente de conjugado ejemplar es el diluyente de conjugado ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), una sal, un bloqueador de proteínas, un agente antimicrobiano y un detergente. Un diluyente de calibrador ejemplar es el diluyente de calibrador humano ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que comprende un tampón que contiene MES, otra sal, un bloqueador de proteínas y un agente antimicrobiano. Además, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 61/142.048 presentada el 31 de diciembre de 2008, puede obtenerse una generación de señales mejorada, por ejemplo, en un formato de cartucho i-STAT®, usando una secuencia de ácido nucleico enlazada al anticuerpo de señal como amplificador de señal.

Aunque ciertas realizaciones de la presente son ventajosas cuando se emplean para evaluar enfermedades, como la lesión cerebral traumática, los ensayos y kits también pueden emplearse opcionalmente para evaluar la UCH-L1 en otras enfermedades, trastornos y afecciones, según sea adecuado.

El método de ensayo también puede usarse para identificar un compuesto que mejore enfermedades, como la lesión cerebral traumática. Por ejemplo, una célula que expresa UCH-L1 puede ponerse en contacto con un compuesto candidato. El nivel de expresión de UCH-L1 en la célula puesta en contacto con el compuesto puede compararse con el de una célula de control usando el método de ensayo descrito en la presente.

La presente divulgación tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitativos.

11. Ejemplos

Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la presente divulgación descritos en la presente son fácilmente aplicables y apreciables, y pueden realizarse usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la presente divulgación o de los aspectos y realizaciones divulgados en la presente. Habiendo descrito la presente divulgación en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se pretende solamente que ilustren algunos aspectos y realizaciones de la divulgación, y no deben considerarse como limitativos del alcance de la divulgación. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Ensayo i-STAT® UCH-L1

Los anticuerpos se cribaron usando el formato de ensayo de interés (i-STAT). Se seleccionaron los pares de anticuerpos que generaron señal en el ensayo. Los criterios de selección iniciales se basaron en una serie de factores que incluían la detección de señal por pares de anticuerpos cuando se cribaron usando una concentración de calibrador baja. Se probaron pares de anticuerpos monoclonales, como el Anticuerpo A como anticuerpo monoclonal de captura y los Anticuerpos B y C como anticuerpos monoclonales de detección. El anticuerpo A es un anticuerpo anti-UCH-L1 ejemplar que se desarrolló internamente en Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). El Anticuerpo B y el Anticuerpo C son anticuerpos anti-UCH-L1 ejemplares que se desarrollaron en Banyan Biomarkers, Inc. Los Anticuerpos B y C reconocen diferentes epítomos de UCH-L1 y mejoran la detección del antígeno en la muestra. La combinación de los anticuerpos proporciona un efecto sinérgico cuando se usan juntos y proporciona una señal aumentada. Otros anticuerpos que se desarrollaron internamente en Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) también muestran o se espera que muestren una mejora similar de la señal cuando se usan juntos como anticuerpos de captura o anticuerpos de detección, en varias combinaciones. El diseño del ensayo UCH-L1 se evaluó en función de atributos clave de rendimiento. La configuración del cartucho fue Configuración de Anticuerpos: Anticuerpo A (anticuerpo de captura)/Anticuerpo B+C (anticuerpo de detección); Condiciones del reactivo: 0,8% de sólidos, 125 µg/ml de conjugado de grupo de fosfatasa alcalina Fab; e Impresión de entrada de muestra: Estándar. El tiempo de ensayo fue de 10-15 min (con 7-12 min de tiempo de captura de muestra).

Calibración del ensayo - Los calibradores se prepararon usando UCH-L1 recombinante OriGene (0-25.000 pg/ml) (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD) en un grupo de plasma EDTA. La concentración de UCH-L1 se

basó en la afirmación de la etiqueta del proveedor. El calibrador se dividió en alícuotas y se almacenó congelado (-70° C.). El ajuste de la curva fue 4PLC (curva logística de 4 parámetros). Véase la FIG. 1; véase también la Tabla 2, que se basa en n=70 repeticiones/nivel cal.

Tabla 2

Cal (pg/ml)	Corriente neta (nA)		Concentración (pg/ml)	
	Media	% CV	Media	% CV
0	0.1	72.1	0.3	n/a
200	3.6	5.4	199.6	5.4
400	7.2	4.2	400.6	4.2
800	14.3	3.5	800.3	3.6
1600	28.2	3.8	1599.3	3.9
6400	100.9	4.5	6398.1	5.3
10000	149.1	3.7	10133.8	4.8
15000	194.8	4.5	14612.4	6.7
20000	238.4	4.5	20257.4	7.6
25000	266.3	4.4	25023.1	7.9

Precisión del ensayo. El diseño del estudio de precisión de 5 días se basó en las directrices de los protocolos del CLSI (EP5-A2 (NCCLS. *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Segunda Edición*. Documento EP5-A2 del NCCLS [ISBN 1-56238-542-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898 USA, 2004) y EP15-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute. *User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline - Segunda Edición*. Documento EP15-A2 del CLSI [ISBN 1-56238-574-7]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898 USA, 2005)). El protocolo de pruebas incluyó 5 días, 2 series/día, 4 repeticiones/serie (n=40 repeticiones/muestra). El análisis usó el programa de software NIP (un programa de descubrimiento estadístico de SAS, Cary, NC) para determinar los componentes de varianza de día, serie y repetición usando un modelo anidado. Se prepararon paneles (n=6) con las concentraciones diana de UCH-L1 que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Panel de precisión	Concentración de UCH-L1 (pg/ml)
Antígeno OriGene enriquecido en matriz de suero*.	100
	500
	5000
Lisado de médula espinal (LME) enriquecido con grupo de plasma de heparina de litio	2300
Especímenes de TBI agrupados en plasma EDTA	100
	200
*Como matriz para los materiales de control de calidad de i-STAT TBI se usó la matriz de suero de Clinia (Fallbrook, CA). La SCL era de Analytical Biological Services, Inc. (Wilmington, DE).	

Como se muestra en la Tabla 4, se observó menos de un 10% de CV total en todos los paneles de 100-4.500 pg/ml en los cartuchos individuales para UCH-L1.

Tabla 4

Panel (Conc. objetivo de UCH-L1)	Media (pg/ml)	Entre día		Entre serie		Entre Repetición		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
100*	94.9	1.2	1.3	0.0	0.0	5.0	5.2	5.1	5.4
OriGene 500	417.7	0.0	0.0	7.0	1.7	17.4	4.2	18.8	4.5
OriGene 5000	4457.3	54.6	1.2	31.7	0.7	178.3	4.0	189.2	4.2
SCL 2300	2111.7	8.9	0.4	35.2	1.7	88.9	4.2	96.0	4.5
Native 100	101.3	0.0	0.0	0.0	0.0	9.6	9.5	9.6	9.5
Native 200	175.4	0.0	0.0	0.0	0.0	11.9	6.8	11.9	6.8

Límite de detección (LoD). El diseño del estudio LoD se basó en las directrices del protocolo EP17-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ("Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline - Segunda Edición", EP17A2E, por James F. Pierson-Perry et al., Clinical and Laboratory Standards Institute, 1 de junio de 2012, 80 páginas [ISBN: 1562387952]). El protocolo de prueba utilizó un grupo de plasma de nivel cero para determinar el Límite de Muestra en Blanco (LoB). Se probaron 60 repeticiones en total. Se preparó un panel de UCH-L1 de 50 pg/ml seleccionando una unidad de muestra de plasma EDTA a 50 pg/ml a partir de un cribado de donantes normales. Se prepararon diluciones a una concentración objetivo de 10-40 pg/ml diluyendo con un grupo de plasma EDTA tratado con calor a una concentración de 10 pg/ml de UCH-L1. Se probaron 40 repeticiones para el panel UCH-L1 a lo largo de 3 días. El análisis de datos fue el siguiente: LoB= percentil 95 de concentraciones de muestra de analito cero; LoD=LoB + Cp × SD(dentro del laboratorio), Cp es un multiplicador para dar el percentil 95 de SD(dentro del laboratorio). SD(dentro del laboratorio) fue la desviación estándar agrupada en los cinco paneles.

UCH-L1: El perfil de precisión para cada panel muestra que los CV varían del 6-10% para los paneles >25 pg/ml. Véase la Tabla 5. Los resultados se usan para determinar la sensibilidad funcional ajustando la ecuación:

$$\%CV = a + \frac{b}{[UCH-L1]}$$

Tabla 5

	Panel					
	0	10	20	30	40	50*
Media (pg/ml)	-0.5	7.7	17.2	25.3	36.9	46.8
Desviación estándar	1.8	3.9	2.3	2.5	3.0	3.1
% CV	N/A	50.8	13.4	9.7	8.1	6.5
*Un punto de datos >10 SD de la media se sustituyó por un resultado de prueba repetido						

Se determinó que la LoD era <10 pg/ml. Los resultados se basaron en un único lote de reactivo y cartucho. La Sensibilidad Funcional (a 20% de CV) fue <20 pg/ml. Véase la Tabla 6. La sensibilidad funcional es una estimación del límite de cuantificación (LoQ).

Tabla 6

Ensayo	LoB (pg/ml)	LoD (pg/ml)	Sensibilidad funcional, 20% CV (pg/ml)
UCH-L1	3	8	17

Linealidad/intervalo de ensayo. La linealidad del ensayo se evaluó usando una serie de diluciones como sigue. En cada estudio de dilución, se preparó una serie de diluciones mezclando las muestras de alta y baja concentración. La primera dilución que utilizó una muestra de alta concentración se preparó enriqueciendo lisado de tejido a un grupo de plasma EDTA hasta una concentración objetivo de UCH-L1 de aproximadamente 8.000 pg/ml. Una segunda dilución utilizó especímenes de plasma EDTA agrupados de pacientes que se sospecha que tienen TBI. La concentración inicial objetivo de UCH-L1 fue de aproximadamente 1.000 pg/ml. Se evaluó un tercer estudio de dilución usando un lisado de tejido enriquecido en un grupo de plasma EDTA hasta una concentración objetivo de UCH-L1 de aproximadamente 20.000 pg/ml. Los datos se analizaron como sigue: se trazaron las concentraciones esperadas frente a las observadas, se determinó el coeficiente de correlación. La linealidad se evaluó según CLSI EP6-A ajustando los datos a una regresión polinómica de primer, segundo y tercer orden. Se usó el modelo de mejor ajuste para determinar la desviación de la linealidad.

UCH-L1: Dilución 1: El coeficiente de correlación (Observado frente a Esperado) fue r = 0.9998 para el ensayo individual. Véase Tabla 7; FIG. 5. Se alcanzó una desviación de la linealidad (DL) de menos del 10% de 20 a 6.400 pg/ml. Dilución 2: El coeficiente de correlación (Observado frente a Esperado) fue r=0.9989. Véase la Tabla 8; FIG. 6. Se logró menos del 10% de desviación de la linealidad (DL) de 12 a 900 pg/ml. Dilución 3: El coeficiente de correlación (Observado frente a Esperado) fue r=0.9992. Véase Tabla 9; FIG. 7. Se logró menos del 15% de desviación de la linealidad de 165 a >18,000 pg/ml.

Tabla 7

Dilución	Esperado (pg/ml)	Observado (pg/ml)	% CV	% Sesgo	Predicho		Desviación de la Linealidad	
					Ajuste lineal	3° orden	DL	% DL
1	8,389.4	8,389.4	7.3	0.0	7,944.0	8,144.4	200.38	2.5
2	7,343.5	7,150.1	2.7	2.7	6,953.7	7,254.4	300.71	4.3
3	6,297.6	6,352.8	3.2	-0.9	5,963.4	6,280.5	317.05	5.3
4	5,251.7	5,260.4	4.1	-0.2	4,973.2	5,246.6	273.49	5.5
5	4,205.8	4,275.9	3.9	-1.6	3,982.9	4,177.0	194.15	4.9
6	3,159.9	3,123.8	5.8	1.2	2,992.6	3,095.7	103.11	3.4
7	2,114.0	2,067.0	3.2	2.3	2,002.3	2,026.8	24.48	1.2
8	1,416.6	1,320.6	1.2	7.3	1,342.0	1,332.8	-9.15	-0.7
9	858.9	804.6	5.1	6.7	814.0	794.4	-19.57	-2.4
10	545.1	514.2	4.9	6.0	516.9	499.4	-17.49	-3.4
11	283.6	259.9	2.8	9.1	269.3	258.5	-10.79	-4.0
12	152.9	141.1	2.7	8.4	145.5	139.9	-5.61	-3.9
13	87.5	81.4	5.2	7.6	83.6	81.1	-2.55	-3.1
14	54.8	52.0	4.1	5.5	52.7	51.8	-0.90	-1.7
15	38.5	36.7	4.1	4.9	37.2	37.2	-0.04	-0.1
16	30.3	30.4	5.5	-0.3	29.5	29.9	0.39	1.3
17	26.2	26.5	5.3	-1.1	25.6	26.2	0.61	2.4
18	22.2	22.2	5.5	0.0	21.8	22.6	0.83	3.8

Tabla 8

Dilución	Esperado (pg/ml)	Observado (pg/ml)	% CV	% Sesgo	Predicho		Desviación de la Linealidad	
					Ajuste lineal	2° orden	DL	% DL
1	998.3	998.3	1.8	0.0	956.3	1016.7	60.4	6.3
2	752.2	747.1	2.1	-0.7	720.2	727.0	6.8	0.9
3	506.1	488.7	4.1	-3.4	484.0	463.2	-20.8	-4.3
4	342.1	307.0	5.3	-10.3	326.7	301.9	-24.8	-7.6
5	260.7	220.1	5.4	-15.6	248.6	226.1	-22.5	-9.0
6	151.2	123.4	5.0	-18.4	143.5	128.6	-14.9	-10.4
7	96.7	80.1	4.6	-17.1	91.2	82.1	-9.1	-10.0
8	42.1	36.3	8.8	-13.8	38.8	36.7	-2.1	-5.5
9	23.9	21.6	16.2	-9.4	21.3	21.8	0.5	2.2
10	17.8	17.2	8.9	-3.7	15.5	16.9	1.4	9.0
11	14.8	14.8	10.9	0.0	12.6	14.5	1.8	14.6

Tabla 9

Dilución	Esperado (pg/ml)	Observado (pg/ml)	% CV	% Sesgo	Predicho		Desviación de la Linealidad	
					Ajuste lineal	3º orden	DL	% DL
1	18763.8	18763.8	13.6	0.0	21002.7	18758.1	-2244.7	-10.7
0.9	9381.9	8896.0	6.0	-0.1	10513.6	8978.4	-1535.2	-14.6
0.8	4690.9	5204.9	3.5	0.1	5269.0	4887.6	-381.4	-7.2
0.7	2345.5	2343.6	5.6	0.0	2646.1	2604.0	-42.1	-1.6
0.6	1876.4	2068.5	4.9	0.1	2121.8	2112.5	-9.3	-0.4
0.5	1407.3	1456.5	9.7	0.0	1597.4	1607.0	9.5	0.6
0.4	938.2	1153.5	5.5	0.2	1073.1	1086.5	13.4	1.2
0.3	469.1	527.7	7.6	0.1	548.7	550.0	1.2	0.2
0.2	234.5	339.3	3.4	0.4	287.1	276.0	-11.1	-3.9
0.1	187.6	231.6	8.9	0.2	234.6	220.4	-14.1	-6.0
0.05	140.7	191.9	9.0	0.4	182.0	164.7	-17.3	-9.5
0.025	93.8	137.3	10.1	0.5	129.5	108.8	-20.7	-16.0
0.0125	46.9	77.6	10.9	0.7	76.9	52.7	-24.2	-31.5
0.00625	23.5	42.4	12.1	0.8	50.1105	24.014	-26.1	-52.1
0	0.0	0.0	-207.6	0.0	24.3962	-3.5412	-27.9	-114.5

Muestras de donantes normales. Se probaron 50 muestras de plasma de donantes aparentemente sanos, adquiridas de fuentes comerciales, en el ensayo i-STAT UCH-L1. Los niveles de UCH-L1 fueron bajos, con un valor mediano de aproximadamente 40 pg/ml y un valor máximo menor de 180 pg/ml en este conjunto de muestras. Véanse la FIG. 2 y la Tabla 10.

Tabla 10

	UCH-L1 (pg/ml)
Media	48.4
SD	36.9
Cuartiles	
Percentil 25	22.3
Mediana	37.1
Percentil 75	59.2

El ensayo UCH-L1 muestra: Límite de detección (LoD) <20 pg/ml; Calibración del ensayo hasta 20.000 pg/ml, y linealidad del ensayo hasta 18.000 pg/ml; Precisión <10% CV desde 100 - 4.500 pg/ml; Resultados en <15 min.

Ejemplo 2

Potenciales interferencias del ensayo

El ensayo UCH-L1 se evaluó para las interferencias potenciales y los reactivos cruzados, como se muestra en la Tabla 11. En resumen, las interferencias se introdujeron en un panel de UCH-L1 con concentraciones objetivo de 200-250 pg/ml. Las concentraciones de prueba de las sustancias interferentes se basaron en las directrices EP7-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Segunda Edición*. Documento EP7-A2 del CLSI [ISBN 1-56238-584-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898 USA, 2005). Los reactivos cruzados potenciales se probaron a 500 ng/ml. El criterio de aceptación fue <10% de interferencia.

Específicamente, se evaluó el ensayo UCH-L1 para detectar posibles interferencias endógenas. La sustancia potencialmente interferente se preparó en un tampón/solvente de elección y se añadió a una muestra de prueba que contenía el analito de interés. Se preparó una muestra de control en la que sólo se añadió el tampón/solvente de elección. La interferencia se calculó basándose en el % de diferencia de los resultados medidos entre la muestra de control y la muestra de prueba que contenía el interferente.

Se evaluó la interferencia de las muestras que contenían las siguientes sustancias endógenas potencialmente interferentes: Bilirrubina (no conjugada y conjugada); triglicéridos; proteína total; heparina; y anticuerpos endógenos (HAMA, RF). El panel UCH-L1 se preparó en grupo de plasma de heparina de Li usando lisado tisular dirigido a 200-

250 pg/ml. Todas las muestras se probaron en el cartucho UCH-L1. El % de interferencia se calculó tomando la diferencia entre la solución de prueba y la solución de control dividida por la solución de control multiplicada por 100, como se muestra en la ecuación: % Interferencia = $100 \times (\text{Prueba} - \text{Control}) / \text{Control}$.

5 **Bilirrubina:** Se analizaron por separado la bilirrubina conjugada y no conjugada para detectar interferencias, tal y como se recomienda en las directrices EP7-A2 de CLSI, como se ha descrito anteriormente. La concentración de bilirrubina se confirmó probando las muestras en el analizador de química clínica ARCHITECT. La Tabla 11 muestra una interferencia <10% a >20 mg/dl de bilirrubina para UCH-L1.

10 **Triglicéridos:** Se introdujo el caldo de triglicéridos (Intralipid) en la muestra que contenía UCH-L1 y el tampón/matriz se introdujo en la muestra que contenía UCH-L1 para preparar la muestra de control. La concentración de triglicéridos se confirmó probando las muestras en el analizador de química clínica ARCHITECT. La Tabla 11 muestra una interferencia <10% a >3.000 mg/dl de triglicéridos para UCH-L1.

15 **Proteína total:** El contenido total de proteínas en muestras humanas mostró cierta variabilidad, variando lo normal entre 6,4-8,3 g/dl (Tietz) y siendo el 99% de los especímenes <9 g/dl (análisis interno). Para evaluar el efecto de la proteína total, las muestras se suplementaron con HSA (albúmina de suero humano) y se compararon con una muestra normal. El contenido proteico de las muestras se determinó independientemente usando la prueba de proteína total de química clínica ARCHITECT. La Tabla 11 muestra una interferencia <10% a 8,8 g/dl de proteína total para UCH-L1.

20 **Heparina:** La heparina se usa como anticoagulante en los tubos de recogida de sangre y se evalúa como interferente potencial, ya que la sangre completa heparinizada y el plasma son tipos de muestras potenciales en los ensayos i-STAT. Un tubo de heparina contiene aproximadamente 15 U/ml de heparina, por lo que la concentración de la prueba representa una concentración más alta que podría estar presente si un tubo de recogida no se llena completamente (extracción corta). La Tabla 11 muestra una interferencia <10% debida a 90 U/ml de heparina en la muestra para UCH-L1.

25 **Anticuerpos endógenos (HAMA, RF):** Los inmunoensayos se basan en interacciones específicas entre los anticuerpos y el analito de interés para un rendimiento óptimo. Sin embargo, algunas muestras pueden contener anticuerpos endógenos que reaccionan de manera cruzada con los anticuerpos empleados en el ensayo. Los anticuerpos no específicos se añadieron al ensayo como proteínas bloqueadoras de las interacciones no específicas y redujeron el potencial de interferencia. Se usaron dos de las fuentes comúnmente identificadas de interferencia potencial en inmunoensayos; HAMA (anticuerpo humano anti ratón) y RF (Factor Reumatoide). Los concentrados de HAMA y RF se obtuvieron de fuentes comerciales: Roche, Scantibodies y Bioreclamation. Estos concentrados se introdujeron en un grupo de plasma al que también se habían introducido pequeñas cantidades de UCH-L1 para evaluar la posible interferencia. Se preparó una muestra de control añadiendo tampón a las muestras correspondientes. La recuperación se determinó con respecto al grupo de plasma enriquecido con HAMA o RF. Los resultados se presentan en la Tabla 11. La recuperación de UCH-L1 estuvo dentro del 100±10% en presencia de HAMA y RF.

30 **Reactividad cruzada e interferencia de proteínas homólogas: Reactivos cruzados de UCH-L1 potenciales** - Hay varias enzimas ubiquitina carboxihidrolasas que forman parte de la serie de enzimas deubiquitinadoras que muestran una homología de secuencia considerable con UCH-L1 sobre la base de la alineación de secuencia primaria. Se evaluó tanto la reactividad cruzada (ausencia de UCH-L1) como la interferencia (presencia de UCH-L1) de UCH-L2, UCH-L3 y UCH-L5 a una concentración de 500 ng/ml. Las UCH-L2 y UCH-L3 recombinantes se adquirieron de Boston Biochem Inc. (Cambridge, MA.) y la UCH-L5 recombinante se adquirió de Genway Biotech Inc. (San Diego, CA). El % de reactividad cruzada se determinó usando la ecuación $100 \times (\text{Prueba} - \text{Control}) / \text{Concentración de reactivo cruzado}$. Los resultados mostrados en la Tabla 11 indican que no hay reactividad cruzada significativa y <10% de interferencia con vimentina y desmina en el ensayo UCH-L1.

Tabla 11

Interferente potencial	Interferencias
Bilirrubina (no conjugada y conjugada)	<10%
Triglicéridos	<10%
Proteína total (9 g/dl)	<10%
Heparina	<10%
Anticuerpos endógenos (HAMA y RF)	<10%
Reactivos cruzados (UCH-L2, UCH-L3, UCH-L5)	<10% <0,001% de reactividad cruzada

Ejemplo 3

65 **Estudio de población de TBI**

Se usó el ensayo i-STAT UCH-L1 en un estudio de población de pacientes con TBI.

Especímenes de estudio: Se inscribieron 260 sujetos en total con TBI de moderada a grave, con hasta 8 puntos temporales/sujeto; todas las muestras eran de suero. Tabla 12; FIG. 3.

Tabla 12

MUESTRA	PUNTO_TEMPORAL_MUESTRA
B1	Preinfusión
B2	Infusión: +12 horas
B3	Infusión: +24 horas
B4	Infusión: +36 horas
B5	Infusión: +48 horas
B6	Infusión: +72 horas
B7	Infusión: +96 horas
B8	Infusión: +120 horas

Distribución de los especímenes del estudio. La FIG. 3 muestra la mediana de todos los resultados del ensayo de UCH-L1 en cada punto temporal, lo que muestra que UCH-L1 es alta en la muestra B1 y tiende a disminuir en los puntos temporales posteriores. La FIG. 4 muestra un diagrama de cajas (escala logarítmica) en cada punto temporal de la muestra que muestra una distribución amplia de los resultados de UCH-L1 en toda la población de pacientes. Los recuadros representan intervalos intercuartílicos (percentiles 25, 50 y 75).

En resumen, se dispuso de un total de 250 sujetos para realizar las pruebas. No se dispuso necesariamente de todos los puntos temporales de todos los sujetos. Algunas muestras tenían un volumen limitado o insuficiente. Los resultados de UCH-L1 abarcaron de <0,05 a 12.100 pg/ml y se leyeron dentro del intervalo de calibración del ensayo.

Ejemplo 4

Multiplex de UCH-L1 y GFAP

El ensayo UCH-L1 se usó con un ensayo GFAP en formato multiplex. El formato multiplex se usó en el formato i-STAT, de tal manera que el cartucho i-STAT multiplex proporciona tanto un resultado de UCH-L1 como un resultado de GFAP en una única serie usando la misma muestra. El ensayo de GFAP usó el Anticuerpo D (como anticuerpo monoclonal de captura) y el anticuerpo E (como anticuerpo monoclonal de detección), que son anticuerpos anti-GFAP ejemplares desarrollados internamente en Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). La configuración del cartucho fue Configuración de anticuerpos: Anticuerpo D (anticuerpo de captura)/Anticuerpo E (anticuerpo de detección); Condiciones del reactivo: 0,8% de sólidos, 250 µg/ml de conjugado de clúster Fab de Fosfatasa Alcalina; e Impresión de entrada de muestra: específica de GFAP. El tiempo de ensayo fue de 10-15 min (con 7-12 min de tiempo de captura de la muestra).

Calibración del ensayo - GFAP. Los calibradores se prepararon usando GFAP recombinante OriGene (0-15.000 pg/ml) en un grupo de plasma EDTA tratado con calor. La concentración de GFAP se basó en la afirmación de la etiqueta del vendedor. El calibrador se dividió en alícuotas y se almacenó congelado (-70° C). En la Tabla 13 se muestra la calibración del ensayo GFAP en el formato multiplex, mientras que en la Tabla 14 se muestra la calibración del ensayo UCH-L1 en el formato multiplex.

Tabla 13 UCH-L1

Cal (pg/ml)	TCorr neto (nA)		Conc (pg/ml)	
	Media	% CV	Media	% CV
0	0,28	0,09 (SD)	-0,43	1,7 (SD)
100	5,4	6,9	105,0	7,4
200	9,7	7,4	192,8	7,7
400	18,7	7,1	386,7	7,4
1.600	69,8	3,8	1.610,0	4,3
6.400	206,3	4,7	6.448,0	7,2

Tabla 14 GFAP

Multiplex

Cal (pg/ml)	TCorr neto (nA)		Conc (pg/ml)	
	Media	% CV	Media	% CV
0	0,00	0,11 (SD)	-0,9	8,4 (SD)
100	1,2	5,9	99,7	6,1
200	2,5	4,5	203,8	4,6
800	9,3	2,4	789,9	2,5
3.200	35,1	2,2	3.221,1	2,4
6.400	63,9	2,3	6.400,0	2,8
25.000	159,9	3,0	24.985,6	5,9

Como se muestra en la Tabla 15, <10% CV Total en todos los paneles de 120-4.550 pg/ml en cartuchos multiplex para UCH-L1. Como se muestra en la Tabla 16, se alcanzó <15% de CV total en todos los paneles de 80-5.600 pg/ml en cartucho multiplex para GFAP.

Tabla 15

Múltiplex UCH-L1									
Panel (Conc. objetivo de GFAP/UCH-L1)	Media (pg/ml)	Entre día		Entre serie		Entre Repetición		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
OriGene 100/100	126.3	0.0	0.0	1.8	1.4	5.4	4.3	5.7	4.5
OriGene 1000/500	579.0	0.0	0.0	10.5	1.8	24.7	4.3	26.9	4.6
OriGene 5000/5000	4552.2	0.0	0.0	0.0	0.0	303.3	6.7	303.3	6.7
SCL 3000/2300	2592.7	0.0	0.0	0.0	0.0	130.6	5.0	130.6	5.0
Native 100/100	138.1	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	7.3	10.0	7.3
Native 200/200	227.8	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	3.6	8.3	3.6

Tabla 16

Múltiplex GFAP									
Panel (Conc. objetivo de GFAP/UCH-L1)	Media (pg/ml)	Entre día		Entre serie		Entre Repetición		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
OriGene 100/100*	107.9	0.0	0.0	2.6	2.4	7.4	6.8	7.8	7.2
OriGene 1000/500	1042.7	0.0	0.0	0.0	0.0	37.8	3.6	37.8	3.6
OriGene 5000/5000	4962.3	0.0	0.0	0.0	0.0	174.3	3.5	174.3	3.5
SCL 3000/2300	5656.0	45.5	0.8	99.7	1.8	144.4	2.6	181.3	3.2
Native 100/100	86.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.2	10.6	9.2	10.6
Native 200/200	213.8	0.0	0.0	1.1	0.5	7.9	3.7	8.0	3.7

Límite de detección (LoD). El panel de 50 pg/ml de GFAP se preparó añadiendo una muestra de GFAP elevada a una muestra que contenía ~50 pg/ml de UCH-L1. Se prepararon diluciones a una concentración objetivo de 10-40 pg/ml. Se probaron 40 repeticiones para cada panel a lo largo de 3 días en la configuración de cartucho multiplex. El análisis de datos fue el siguiente LoB = percentil 95 de concentraciones de muestra de analito cero; LoD = LoB + Cp × SD (dentro del laboratorio), Cp es un multiplicador para dar el percentil 95 de SD(dentro del laboratorio). SD(dentro del laboratorio) fue la desviación estándar agrupada en los cinco paneles.

(a) UCH-L1: El perfil de precisión para cada panel a través de la configuración del cartucho multiplex tuvo intervalo de CV de 8-22% para Paneles >10 pg/ml (SD agrupada=3.1). Véase la Tabla 17. Los resultados se usan para determinar la sensibilidad funcional ajustando la ecuación:

$$\%CV = a + \frac{b}{[UCH-L1]}$$

Tabla 17 Multiplex - UCH-L1

	Panel					
	0	10	20	30	40	50*
Media (pg/ml)	1.0	11.3	18.3	24.5	31.5	47.0
Desviación estándar	1.8	2.4	2.3	2.6	2.6	4.8
% CV	N/A	21.5	12.6	10.8	8.2	10.3

*Un punto de datos >10 SD de la media se sustituyó por un resultado de prueba repetido

(b) **GFAP:** El perfil de precisión para cada panel a través de la configuración del cartucho multiplex tuvo intervalo de CV de 14-25% para Paneles >19 pg/ml (SD agrupada=5.62). Véase la Tabla 18. Los resultados se usan para determinar la sensibilidad funcional ajustando la ecuación:

$$\%CV = a + \frac{b}{[UCH-L1]}$$

Tabla 18 Multiplex - GFAP

	Panel					
	0	10	20	30	40	50*
Media (pg/ml)	0.2	9.2	19.6	29.0	37.7	55.7
Desviación estándar	3.9	4.6	4.8	6.0	5.3	6.2
% CV	N/A	50.2	24.7	20.6	14.2	11.2

*Un punto de datos >10 SD de la media se sustituyó por un resultado de prueba repetido

El LoD fue <35 pg/ml para cada ensayo en la configuración de cartucho multiplex. Los resultados se basaron en un único lote de reactivo y lote de cartucho. Para los cálculos de LoD no se tuvieron en cuenta el lote de reactivo y la variabilidad de fabricación. El LoD fue mayor en la configuración multiplex debido a la mayor SD observada en los paneles. La Sensibilidad Funcional (al 20% CV) fue <50 pg/ml para cada configuración de anticuerpos. Véase la Tabla 19. La Sensibilidad Funcional es una estimación del Límite de Cuantificación (LoQ).

Tabla 19

Ensayo	LoB (pg/ml)	LoD (pg/ml)	Sensibilidad funcional, 20% CV (pg/ml)
UCH-L1	4	10	12
GFAP	7	16	27

Linealidad/intervalo de ensayo. El diseño del estudio de linealidad fue el siguiente. Se preparó una muestra de alta concentración añadiendo lisado tisular a un grupo de plasma de EDTA. La concentración objetivo de UCH-L1 era de aproximadamente 6.400 pg/ml, mientras que la concentración objetivo de GFAP de la muestra enriquecida era de aproximadamente 15.000 pg/ml. Una segunda dilución incluyó especímenes de plasma de EDTA agrupadas de pacientes que se sospechaba que tenían TBI. La concentración objetivo era de aproximadamente 1.000 pg/ml tanto para GFAP como para UCH-L1. Las diluciones que abarcan el intervalo de ensayo se prepararon mezclando muestras de alta y baja concentración. Cada dilución se probó en repeticiones de 10 en la configuración de cartucho multiplex. Los datos se analizaron de la siguiente manera: se trazaron las concentraciones esperadas frente a las observadas, se determinó el coeficiente de correlación; la linealidad se evaluó según el protocolo EP6-A (NCCLS. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline*. Documento EP6-A del NCCLS [ISBN 1-56238-498-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898 USA, 2003). Los datos se ajustaron a las regresiones polinómicas de primer, segundo y tercer orden. Se determinaron el modelo que mejor se ajustaba y la desviación observada de la linealidad.

(c) **UCH-L1:** El coeficiente de correlación (Observado frente a Esperado) fue $r > 0.9997$ para el ensayo multiplex. Tabla 20. Se alcanzó una desviación de la linealidad (DL) de menos del 10% de 25 a 6.400 pg/ml.

Tabla 20 Multiplex - UCH-L1

Estudio	Cartucho	Coeficiente de correlación (r)	Desviación de la linealidad (DL)
Dilución 1	Multiplex	$r = 0.9987$	Menos del 10% DL de 23->6.400 pg/ml
Dilución 2	Multiplex	$r = 0.9992$	Menos del 10% DL de <20-4.200 pg/ml

(b) GFAP: El coeficiente de correlación (Observado frente a Esperado) fue $r > 0,99$ para el ensayo multiplex. Tabla 21. Se alcanzó una desviación de la linealidad (DL) de menos del 10% de 25 a 6.400 pg/ml.

Tabla 21 Multiplex - GFAP

Estudio	Cartucho	Coeficiente de correlación (r)	Desviación de la linealidad (DL)
Dilución 1	Multiplex	$r = 0.9970$	Menos del 10% DL de 80->15.000 pg/ml
Dilución 2	Multiplex	$r = 0.9990$	Menos del 10% DL de <20-6.400 pg/ml

Correlación de muestras: UCH-L1 (Multiplex frente a Individual). Se analizaron 133 potenciales especímenes de TBI. Se observó una buena correlación global ($r > 0,98$) y pendiente (1,1). Véase la FIG. 8. Se usaron 50 donantes normales. La mayoría de las muestras mostraron una buena concordancia y una buena correlación general ($r > 0,98$). Véanse la FIG. 9 y la Tabla 22.

Tabla 22 Multiplex

	UCH-L1 (pg/ml)	
	Individual	Multiplex
Media	48.4	55.1
SD	36.9	42.7
Cuartiles		
percentil 25	22.3	24.2
mediana	37.1	39.6
percentil 75	59.2	68.0

Correlación de muestras: GFAP (Multiplex frente a Individual). Se analizaron 133 posibles especímenes de TBI. Se observó una buena correlación global ($r > 0,98$) y pendiente (1,1). Véanse la FIG. 10 y la Tabla 23. Se usaron 50 donantes normales. Los niveles de GFAP eran bastante bajos y los valores eran ligeramente más altos en el cartucho multiplex. Véanse la FIG. 11 y la Tabla 24.

Tabla 23

ID del espécimen	Concentración (pg/ml)		% de Diferencia
	MPLX GFAP	GFAP individual	
198B	672.0	305.3	120

Tabla 24

	GFAP (pg/ml)	
	Individual	Multiplex
Media	14.5	22.8
SD	10.4	15.0
Cuartiles		
percentil 25	9.3	12.3
mediana	13.0	20.3
percentil 75	16.7	28.4

La configuración del cartucho multiplex mostró: (a) Límite de detección (LoD) <25 pg/ml tanto para GFAP como para UCH-L1; (b) Intervalo hasta 6.400 pg/ml; Calibración del ensayo hasta 6.400 pg/ml, y linealidad del ensayo hasta >6.400 pg/ml tanto para GFAP como para UCH-L1; (c) Precisión <15%; <10% CV (de 100-4.000 pg/ml) tanto para GFAP como para UCH-L1; (d) Tiempo de Resultados en ≤20 minutos; ciclo de ensayo utilizado de 15 min para pruebas de rendimiento; (e) Plasma tipo espécimen; plasma EDTA utilizado para calibradores y pruebas de rendimiento; (f) Linealidad $r \geq 0,95$; Coeficiente de correlación: $r > 0,99$; y <10% de desviación de la linealidad de 25->6.400 pg/ml tanto para GFAP como para UCH-L1; (g) Correlación: $r \geq 0,85$, Coeficiente de correlación, Multiplex frente a Individual, $r > 0,99$.

Se entiende que la descripción detallada anterior y los ejemplos acompañantes son meramente ilustrativos y no deben considerarse como limitaciones al alcance de la invención, que está definido únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Para los expertos en la técnica serán evidentes varios cambios y modificaciones en las realizaciones divulgadas. Tales cambios y modificaciones, incluyendo sin limitación los referentes a las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, productos intermedios, síntesis, composiciones, formulaciones, o métodos de uso de la invención, pueden realizarse sin apartarse del alcance de la misma.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1) en una muestra biológica de un sujeto, el método comprendiendo:

(a) poner en contacto la muestra biológica con, ya sea simultánea o secuencialmente, en cualquier orden:

(1) por lo menos un anticuerpo de captura, que se une a un epítipo que comprende por lo menos tres aminoácidos contiguos en la SEQ ID NO: 1 para formar un complejo de anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1, y (2) por lo menos un anticuerpo de detección que incluye un marcador detectable y se une a un epítipo que comprende por lo menos tres aminoácidos contiguos en la SEQ ID NO: 1 que no está unido por el anticuerpo de captura, para formar un complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-anticuerpo de detección, y

(b) determinar el nivel de UCH-L1 en la muestra biológica basándose en la señal generada por el marcador detectable en el complejo anticuerpo de captura-antígeno de UCH-L1-anticuerpo de detección,

en donde la muestra biológica no requiere dilución,
en donde el método se realiza en de 5 a 20 minutos, y
en donde el método:

(i) determina los niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, tiene un intervalo dinámico de 5 log y es lineal en dicho intervalo dinámico;

(ii) cuantifica el nivel de UCH-L1 en un intervalo dinámico de 5 pg/ml a 25.000 pg/ml con una precisión de menos del 10% de coeficiente de variación (CV) y con menos del 10% de desviación de la linealidad (DL) alcanzada en el intervalo dinámico, o bien

(iii) determina niveles menores o iguales a 25.000 pg/ml de UCH-L1.

2. El método de cualquier reivindicación 1, en donde UCH-L1 se evalúa junto con uno o más biomarcadores adicionales seleccionados entre proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína B de unión al calcio S100 (S100β), proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP), aldolasa C (ALDOC), fosfoproteína astrocítica 15 (PEA15), glutamina sintetasa (GS), cadena B de cristalina (CRYAB), enolasa específica de neuronas (NSE), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Tau, P-tau, proteína c reactiva (PCR), apolipoproteína A-I (ApoAI) y NFL.

3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde los niveles de UCH-L1 se evalúan junto con el estado de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) del sujeto, el método comprendiendo el paso de:

detectar GFAP y UCH-L1 en la muestra biológica, en donde el método (i) determina niveles de GFAP en una cantidad menor o igual a 50.000 pg/ml y niveles de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, (ii) tiene un intervalo dinámico de 5 log, y (iii) es lineal sobre el intervalo dinámico.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde UCH-L1 se detecta mediante un inmunoensayo o un ensayo de detección de moléculas individuales.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además evaluar el estado de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) del sujeto realizando los siguientes pasos:

a) poner en contacto la muestra biológica, ya sea simultánea o secuencialmente, con: (i) por lo menos un anticuerpo de captura que se une a un epítipo en la SEQ ID NO: 2 y por lo menos un anticuerpo de detección que incluye un marcador detectable y se une a un epítipo de la SEQ ID NO: 2 al que no se ha unido el anticuerpo de captura, produciendo de este modo un complejo anticuerpo de captura-antígeno de GFAP-anticuerpo de detección; y

b) detectar GFAP en el complejo anticuerpo de captura-antígeno de GFAP-anticuerpo de detección en la muestra,

en donde el método

(i) determina niveles de hasta 50.000 pg/ml de GFAP y 25.000 pg/ml de UCH-L1, no requiere dilución de la muestra biológica y se realiza usando un dispositivo de punto de atención; o

(ii) determina los niveles de GFAP en una cantidad menor o igual a 50.000 pg/ml y de UCH-L1 en una cantidad menor o igual a 25.000 pg/ml, tiene un intervalo dinámico de 5 log y es lineal sobre dicho intervalo dinámico.

6. El método de la reivindicación 3 o de la reivindicación 5, en donde el método detecta niveles de GFAP seleccionados del grupo que consiste en de 16 pg/ml a 50.000 pg/ml.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el método detecta niveles de UCH-L1 de 10 pg/ml a 25.000 pg/ml.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el por lo menos un anticuerpo de captura está inmovilizado en un soporte sólido.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica es una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de plasma, una muestra de tejido o un fluido corporal.

5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los niveles de UCH-L1 por encima de un nivel de referencia indican que el sujeto tiene una lesión cerebral traumática (TBI).

10 11. El método de la reivindicación 10, en donde la TBI es una TBI leve.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de UCH-L1 se mide en un único punto temporal, o en donde el nivel de UCH-L1 se monitoriza a lo largo de múltiples puntos temporales.

15 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el método se realiza usando un volumen de menos de 20 microlitros de dicha muestra biológica.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el método tiene un límite inferior de detección (LoD) de 10 pg/ml.

20 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el método tiene un límite inferior de detección (LoD) de 20 pg/ml.

25 16. El método de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo de captura que se une a un epítipo en la SEQ ID NO: 2 se inmoviliza en un soporte sólido o en donde el anticuerpo de detección que se une a un epítipo en la SEQ ID NO: 2 al que no se ha unido el anticuerpo de captura se inmoviliza en un soporte sólido.

17. El método de la reivindicación 5, en donde la GFAP se detecta mediante un inmunoensayo o un ensayo de detección de moléculas individuales.

30 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método se realiza usando un dispositivo de punto de atención.

35

40

45

50

55

60

65

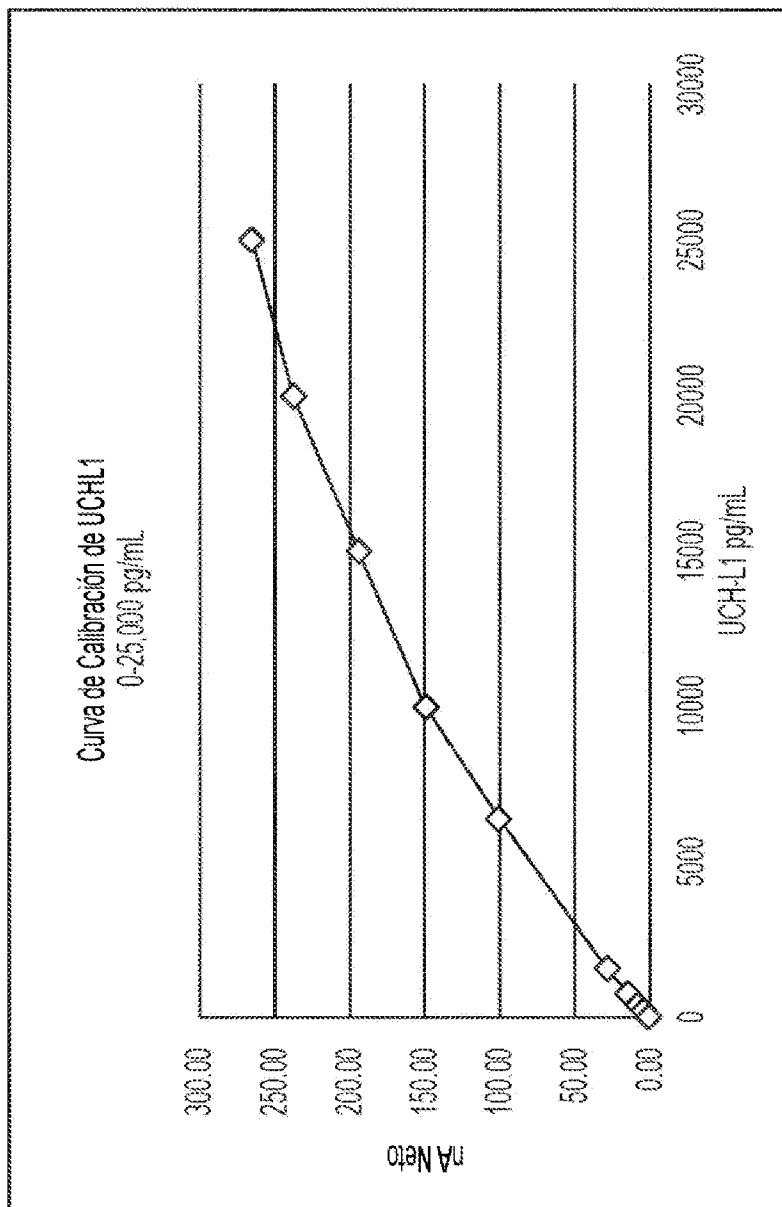


FIG. 1

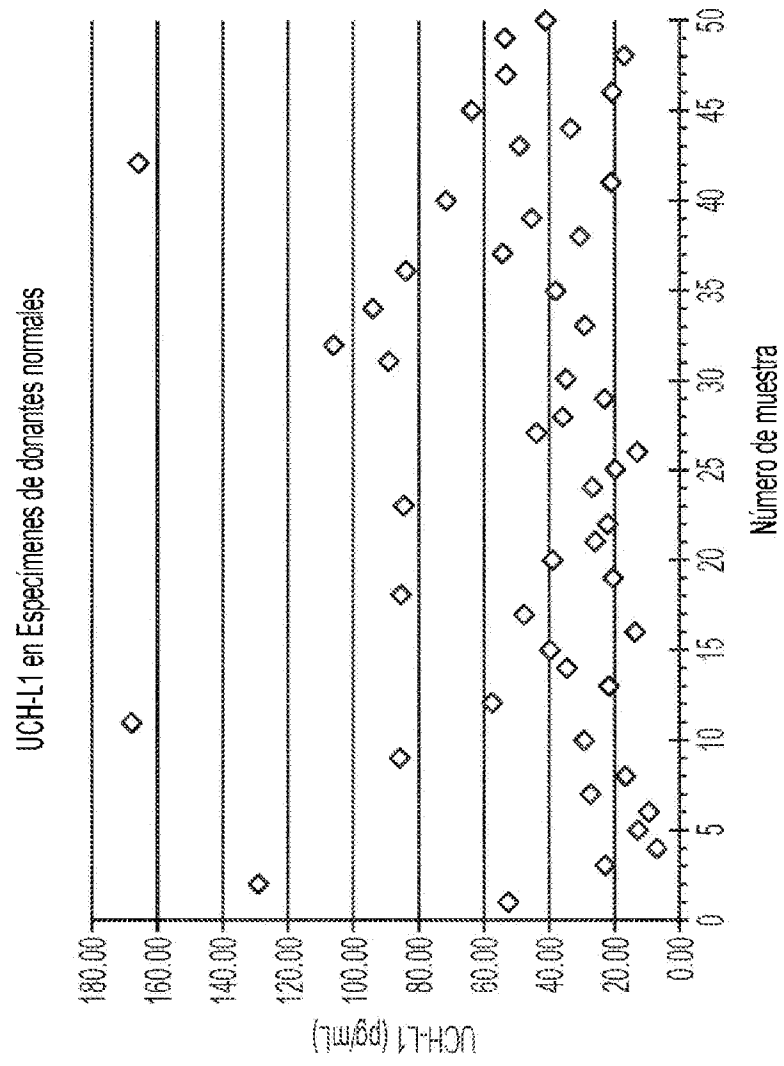


FIG. 2

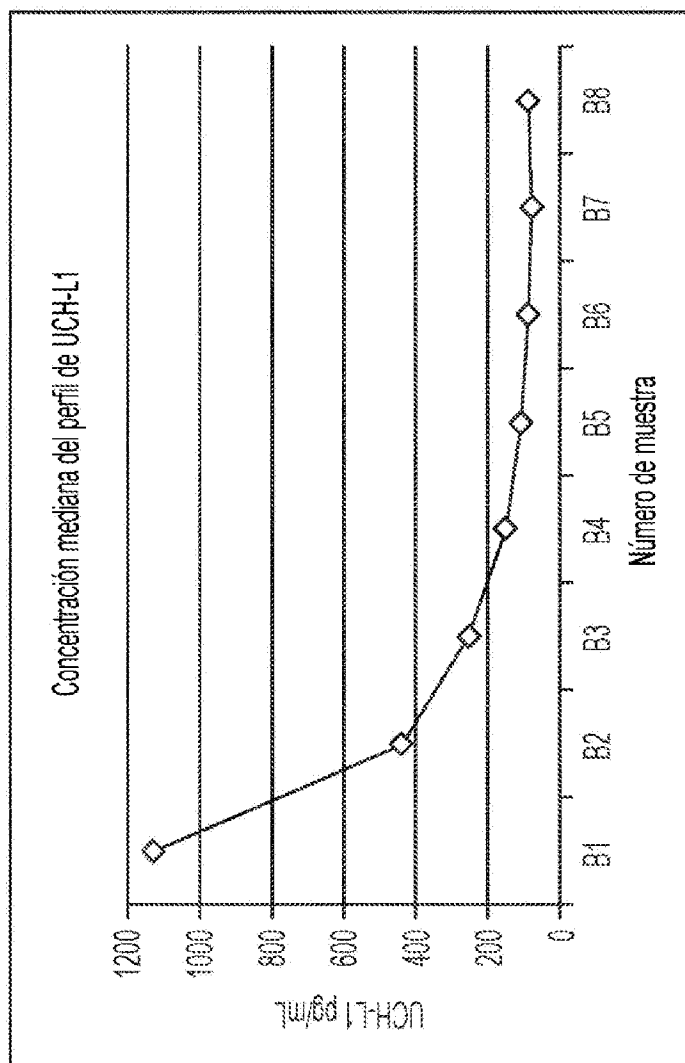


FIG. 3

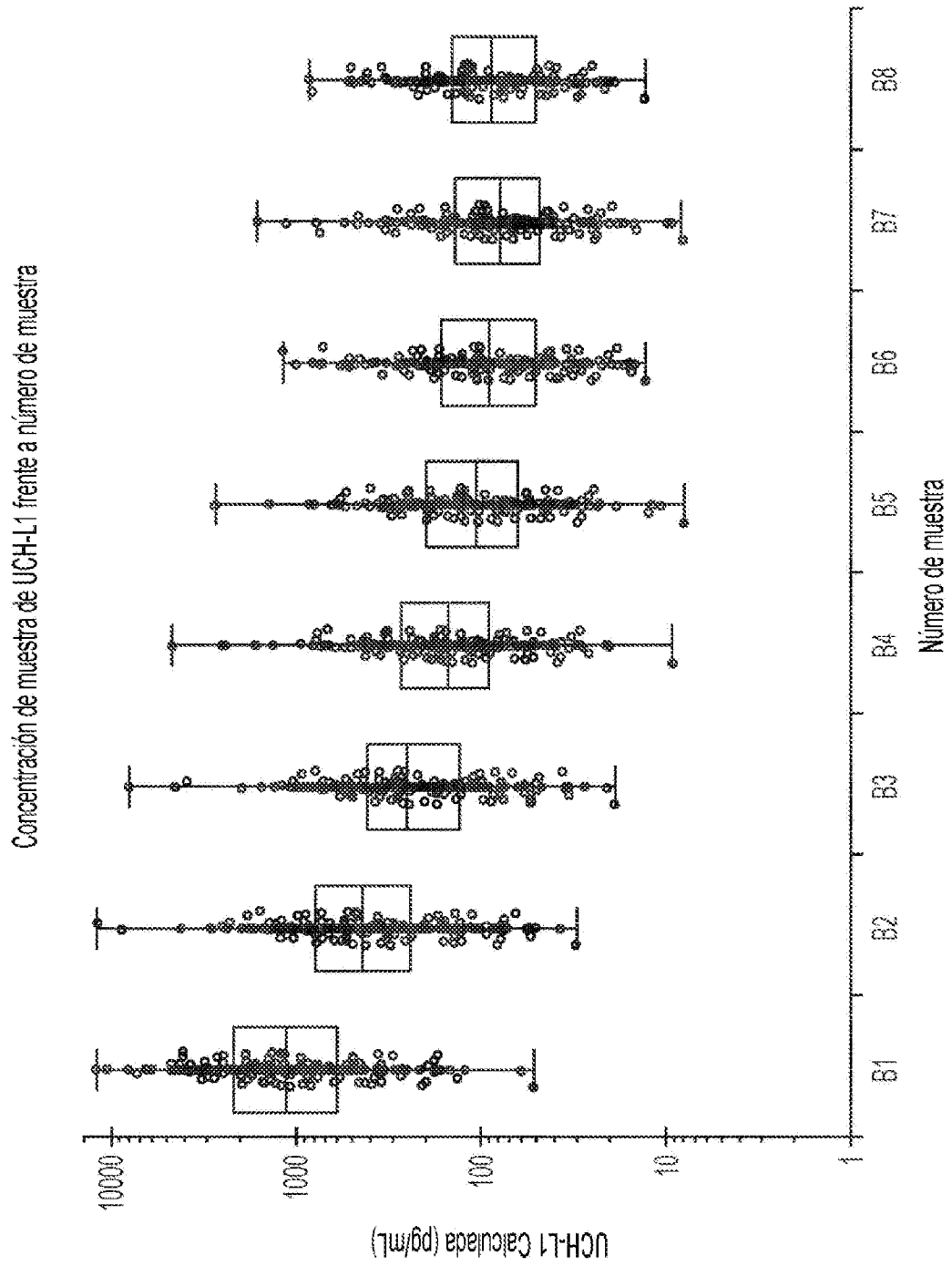


FIG. 4

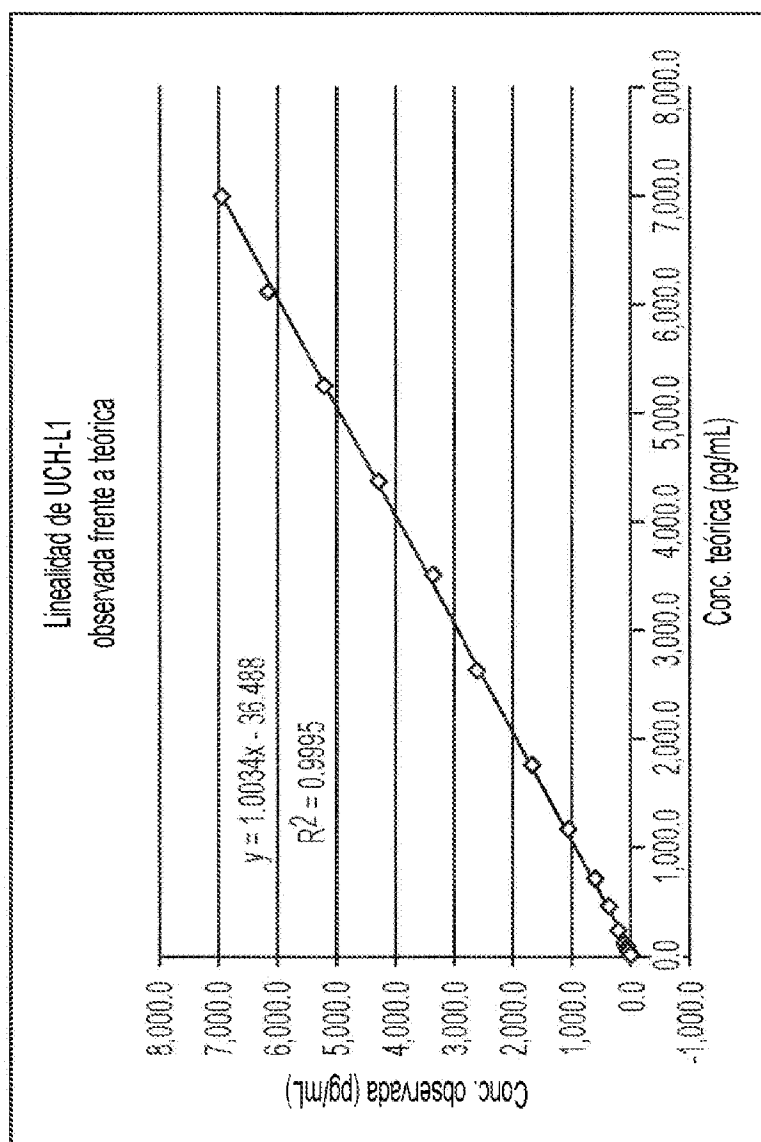


FIG. 5

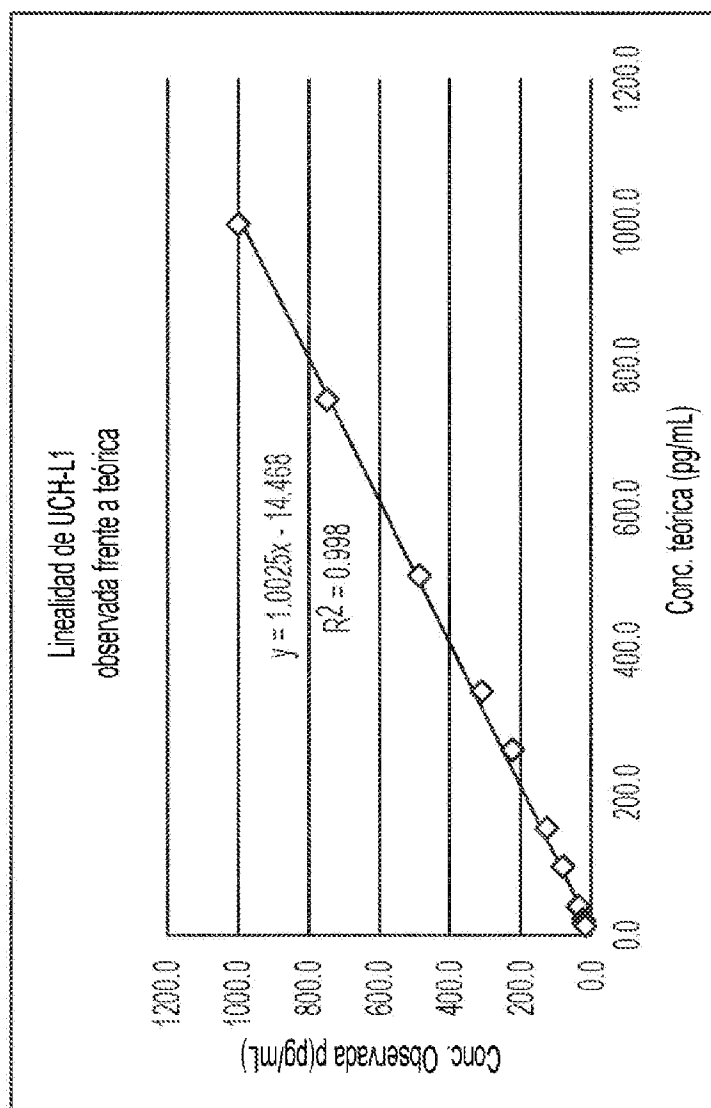


FIG. 6

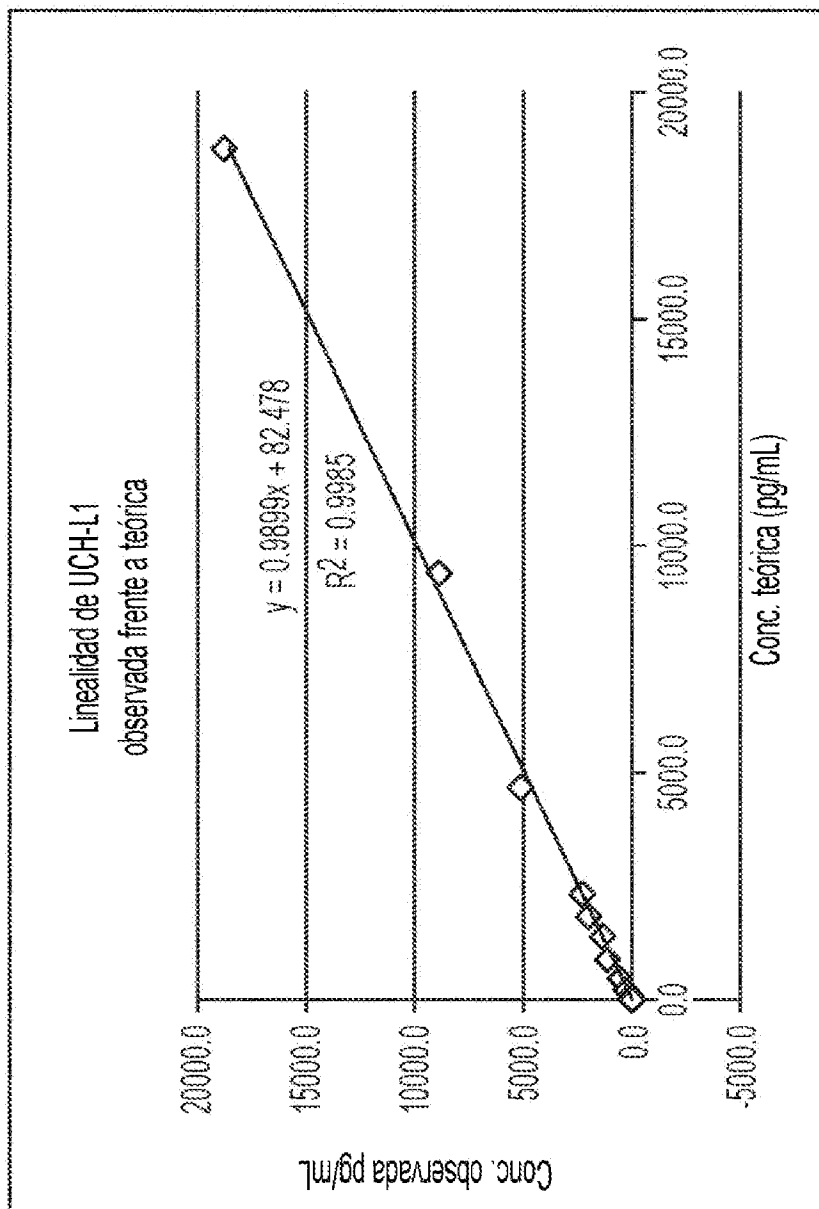


FIG. 7

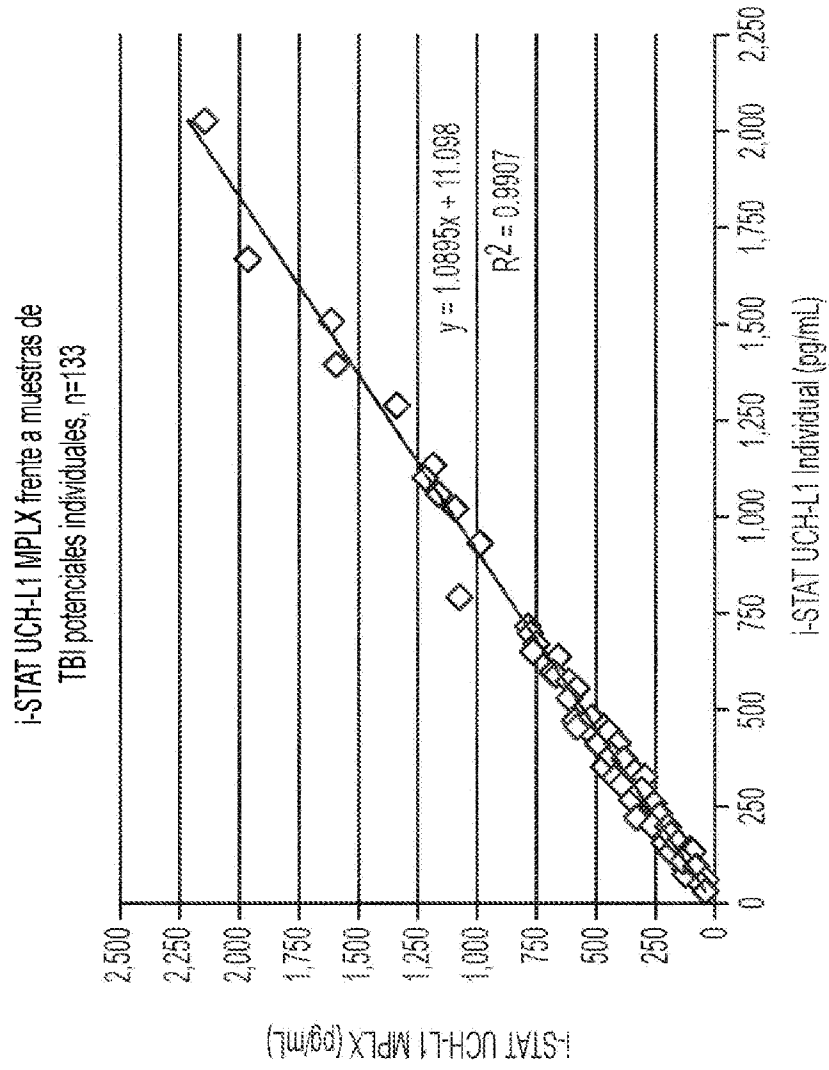


FIG. 8

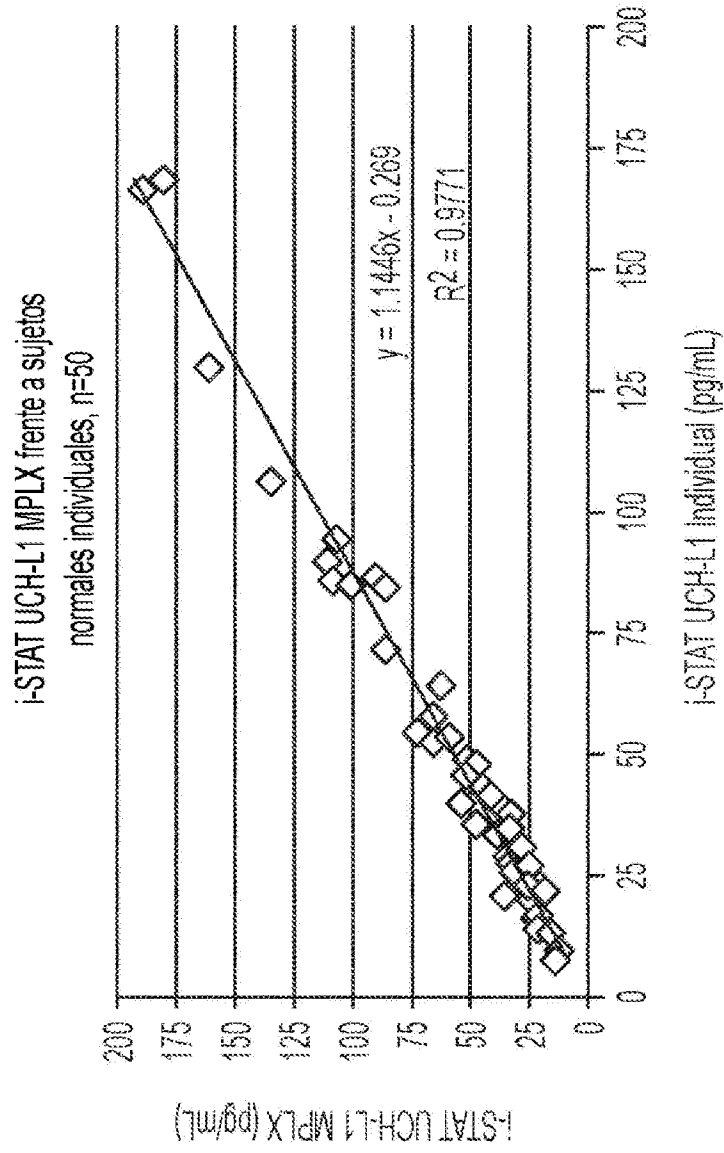


FIG. 9

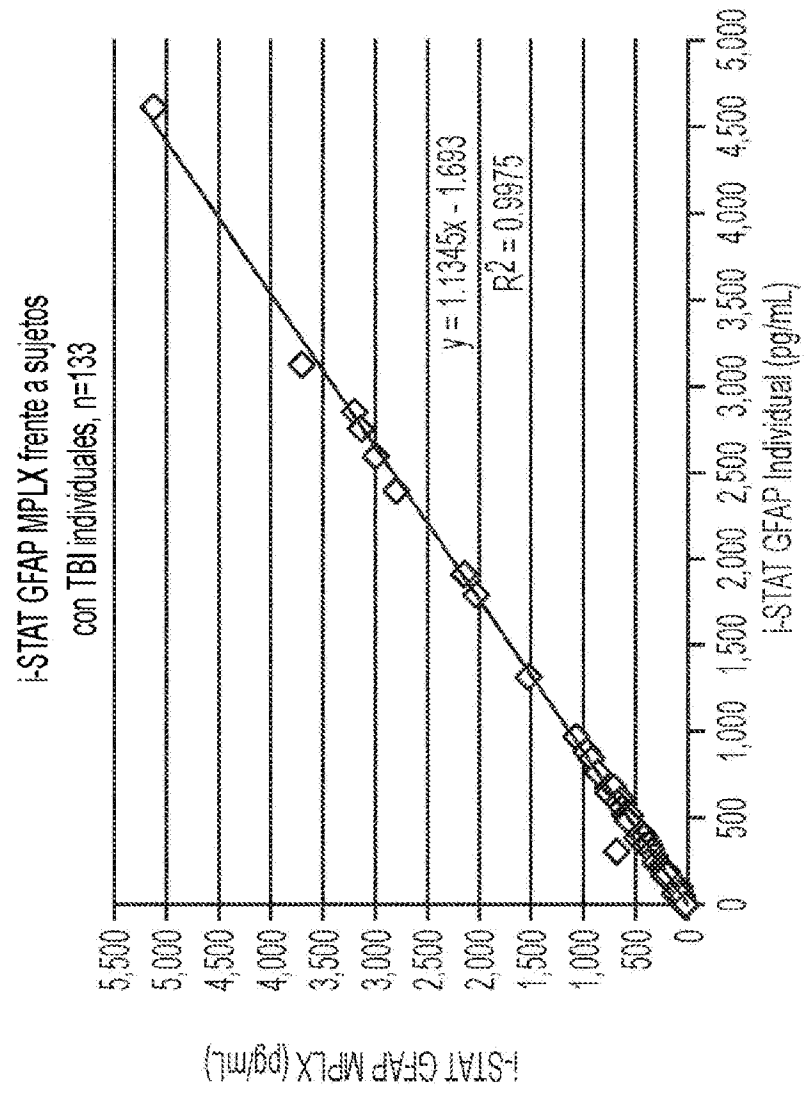


FIG. 10

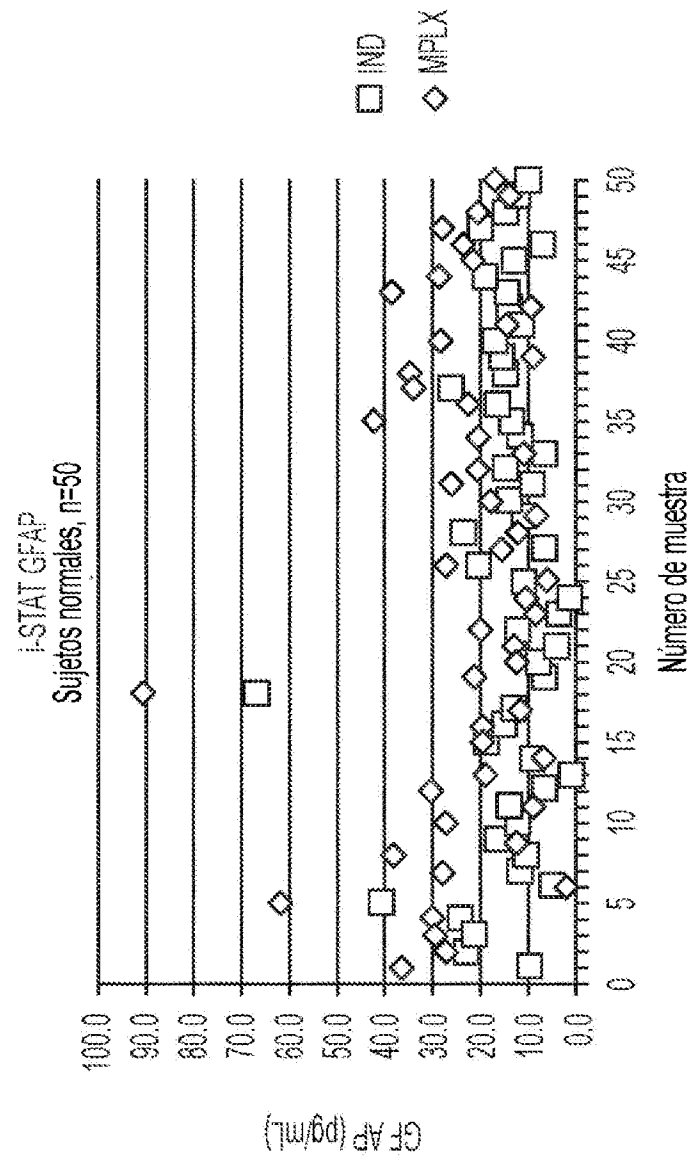


FIG. 11