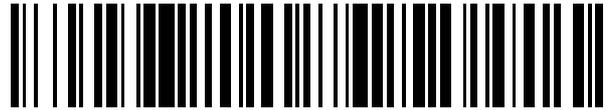


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 104**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2012 E 12704430 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2678688**

54 Título: **Método para predecir la evolución de un paciente que sufre de ictus**

30 Prioridad:

22.02.2011 EP 11382047

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL
UNIVERSITARI VALL D'HEBRON (100.0%)
Passeig Vall d'Hebron 119-129
08035 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MONTANER VILLALONGA, JOAN;
ROSELL NOVEL, ANNA y
NAVARRO SOBRINO, MIRIAM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 559 104 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para predecir la evolución de un paciente que sufre de ictus

CAMPO DE LA INVENCÓN

- 5 La presente invención describe un método para determinar el resultado de un paciente que sufre un ictus midiendo dos marcadores biológicos combinados, la endostatina y el FasL. La combinación de los biomarcadores de la invención se revela útil para todas las clases de ictus. La invención es de aplicación en la fase clínica en el diagnóstico de la evolución de los pacientes que sufren de toda clase de enfermedades neurovasculares.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 El ictus es la tercera causa de muerte y la causa más común de discapacidad permanente en adultos en todo el mundo. Cuando ocurre un ictus, el tiempo de reacción médica es de la mayor importancia para el paciente en razón de que el deterioro neurológico puede continuar después de la fase aguda. Reconocer los mecanismos de ocurrencia de los ictus que empeoran después de la fase aguda es crucial, y la información máxima que se relaciona con la evolución del paciente se requiere en la decisión de las medidas de las prácticas correctas que pueden ayudar a evitar los déficits neurológicos permanentes o la muerte.

- 15 El uso de biomarcadores de plasma se está volviendo crecientemente popular en varios campos de la medicina. Los procesos de toma de decisión que utilizan biomarcadores se aceptan ampliamente en situaciones médicas tales como iniciar terapias de disminución de lípido (LDL), diagnosticar infarto agudo del miocardio (troponina), excluyendo la sospecha de embolismo pulmonar (D-dímero), etc. En las enfermedades cerebro-vasculares también es interesante, en razón a que los biomarcadores podrían ayudar al médico en varias etapas de la evaluación del ictus. Los caminos patológicos relacionadas con daño han sido el principal enfoque buscado para biomarcadores potenciales (Shenhar-Tsarfaty et al., "interleukin-6 as an early predictor for one-year survival following an ischaemic stroke/transient ischaemic attack" *int J Stroke*. 2010 Feb, 5 (1): 16-20).

- 20 Los avances en el manejo de pacientes con ictus en los últimos años, incluyendo nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico, permiten reducir la letalidad en el hospital y lograr mejores resultados funcionales. Aún en vigilancia neurológica podría ser interesante ahorrar días, debido al alto coste. La descarga temprana podría evitar consumir un lote de recursos si este se hace de manera segura con alta predicción sobre el empeoramiento de los pacientes, o en complicaciones después de la descarga.

- 25 En razón a que es de gran importancia el establecimiento en costes de cuidado médico efectivo para ictus, se hacen necesarios estudios en la técnica para evaluar la proporción de la efectividad de coste y el coste beneficio de diferentes conceptos del cuidado de ictus. En relación a esto, los biomarcadores que podrían predecir el resultado ayudan en el proceso de ubicación del tratamiento de los pacientes.

- 30 Varios biomarcadores han mostrado ser útiles en pronóstico neurológico tal como el empeoramiento que sigue al ictus isquémico, por ejemplo IIL-6, ICAM-1 o TNF-alfa ("Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review", Whiteley W. et al. *Stroke*. 2009 May; 40(5): e380-9). El ictus es una enfermedad etiológicamente heterogénea. La identificación de la causa específica en cada paciente tiene implicaciones clínicas. El péptido natriurético del cerebro (BNP) y el dímero -D se han reportado como marcadores específicos del ictus cardioembólico. Más aún, un nivel de S100B incrementado también se encontró después de hemorragia cerebral espontánea aguda ("Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers". Montaner J et al. *Stroke*. 2008 Aug; 39(8): 2280-7. Todos estos biomarcadores estuvieron asociados con una evolución temprana y tardía peor en pacientes con ictus, sin embargo no tan precisa como la combinación de la presente invención.

- 35 Muchos de los biomarcadores que se relacionan con ictus están ligados a cascadas neuroinflamatorias. Los inventores recientemente mostraron que los niveles de admisión (< 3h de la presentación de los síntomas) de Proteína Reactiva C de alta sensibilidad (CRP) predice la mortalidad después del tratamiento con activador de Plasminógeno de tejido (t-PA) para pacientes con ictus, agregando información de pronóstico a los factores de riesgo clásico. Esto tiene importancia clínica por que el CRP es un marcador potente que podría ser utilizado como una herramienta de punto de atención para la estratificación del riesgo de los candidatos pacientes a recibir t-PA. Junto con el CRP, una edad avanzada es otro elemento de predicción independiente de la mortalidad, siguiendo al t-PA. El riesgo de muerte de acuerdo al t-PA alcanzó el 54% en pacientes mayores de 72 años que estuvieron en el cuartil CRP superior. Por lo tanto ambos factores (edad y CRP) podrían interactuar negativamente.

- 40 El infarto Maligno de la Arteria Cerebral Media (MCA) muestra un muy mal pronóstico y enormes tasas de mortalidad. Serena et al. hicieron un estudio para determinar si los marcadores moleculares daño endotelial podrían ayudar a predecir edema secundario del cerebro y a identificar pacientes que pudieran beneficiarse de terapias agresivas tales como el hemicraneotomía de descompresión o hipotermia (Serena J, et al. "The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers." *Stroke* 2005 Sep, 36(9): 1921-6).

Mostraron que c-Fn \gt 16,6 microg/mL tuvo la más alta sensibilidad (90%), especificidad (100%), y valores de predicción negativos y positivos (89% y 100%, respectivamente) para la predicción de infarto MCA maligno.

5 Aunque la terapia trombolítica en ictus agudo es efectiva en razón a que éste acelera la lisis de los coágulos en el restablecimiento temprano de flujo sanguíneo, hasta el 40-50% de los pacientes tratados no recanalizan o lo hacen muy tarde, y entre el 6 y el 15% sufren transformaciones hemorrágicas (HT) con altas tasas de muerte. En humanos, se han identificado recientemente los biomarcadores tales como el MMP-9 o la fibronectina, que se podrían utilizar para seleccionar pacientes con mayor riesgo de transformación Hemorrágica (HT), y alta interferencia de PAI-1 con la recanalización inducida por tPA, que predicen así la resistencia a la lisis del coágulo y pobre resultado, (Montaner J. "Blood biomarkers to guide stroke thrombolysis", *Front Biosci (Elite. Ed)*. 2009 Jun 1; 1: 200-8).

10 Una de las limitaciones principales de la mayoría de los biomarcadores relacionados con ictus es que no se vuelven indicadores independientes del resultado, En estos biomarcadores incluidos en los modelos multivariados juntos con otras variables clínicas tales como la edad o NIHSS, los resultados muestran que ya no se vuelven elementos de predicción independientes, agregando muy poco o ningún valor de predicción a las variables clínicas bien conocidas. El NIHSS refleja la severidad inicial del ictus. La incorporación de niveles marcadores inflamatorios a los modelos de pronóstico variados no mejora efectivamente la discriminación del modelo, la calibración, o la reclasificación en la producción del resultado después del ictus.

15 El "Fas ligando" (FasL) es una proteína de transmembrana tipo II de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), capaz de inducir apoptosis cuando se une a su receptor, Fas. El sistema Fas es un receptor de señalización de apoptosis localizado en la superficie de la célula que pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral. La interacción entre el Fas y su ligando FasL conduce a la apoptosis. La forma soluble del regulador anti-apoptótico Fas (sFas) y el FasL soluble de los factores pro-apoptóticos (sFasL) pueden ser medidos. Luego del sangrado del cerebro, el sFas, del cual se cree que inhibe la interacción Fas con su ligando, disminuyó dentro de las primeras 24 horas después de la hemorragia intracerebral. También disminuyó en el fluido cerebroespinal proveniente de pacientes con ictus isquémico y estuvo inversamente correlacionado con el volumen de infarto del cerebro y el déficit neurológico 3 semanas y 3 meses después del evento (Tarkowski E, et al. *Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. Stroke*. 1999 Feb; 30(2): 321-7).

20 El FasL ha estado relacionado con cáncer como un modulador del sistema inmune, pero poco con el ictus. En este sentido, Delgado sugiere la existencia del involucramiento de apoptosis mediada por Fas después de la Hemorragia Intracerebral (ICH) en áreas perihematomales (Delgado et al, "Fas system activation in perihematomal areas after spontaneous intracerebral hemorrhage *Stroke*. 2008; 39: 1730-1734"). Describe que el FasL media en la apoptosis post ictus.

25 La WO 2010031821 describe el FasL como marcador para un diagnóstico diferencial para determinar si un paciente ha sufrido de un ictus versus. O cualquier otra patología que se asemeje a un ictus. Sin embargo, el FasL solo muestra una pobre correlación mRS para ser clínicamente relevante, lo que lo hace no particularmente sugerente para ser utilizado en diagnóstico combinado con respecto a otros biomarcadores de la técnica.

30 La EP 2166358 A1 describe FasL como un marcador más de un panel, siendo el panel capaz de diferenciar si un paciente ha sufrido de ictus vs. cualquier otra patología que asemeje a un ictus. Esto es un diagnóstico de ictus, no un estudio acerca del desarrollo de ictus. Por el contrario, la presente solicitud reivindica un valor pronóstico de FasL y endostatina en el desarrollo del ictus.

35 La endostatina es una proteína derivada del colágeno XVIII, que es el principal proteoglicano de las zonas de membrana base endotelial y epitelial. Se ha encontrado un nivel de endostatina circulante elevado en varias enfermedades, tales como la retinopatía diabética, la esclerosis sistémica, el daño agudo del pulmón, los glioblastomas malignos y la enfermedad de arteria coronaria. Muestra niveles medibles en la sangre, y trabaja como un factor inhibidor de la angiogenia: inhibe la construcción de nuevos vasos sanguíneos. La acción de la endostatina se ha dirigido adicionalmente a tópicos oncológicos. La WO 2009033406 A1 entre otros, propone su uso en tratamientos de tumores. Otros estudios se relacionan con el uso antiangiogénico de la endostatina para tratar neovascularización ocular.

40 Los inventores han demostrado que la predominancia de la endostatina sobre el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) dentro de la respuesta angiogénica endógena se asocia con mayor extensión y riesgo de recurrencia de aterosclerosis intracraneal sintomática (Arenillas et al. *Angiogenesis in symptomatic intracranial atherosclerosis: predominance of the inhibitor endostatin is related to a greater extent and risk of recurrence. Stroke*. 2005 Jan; 36(1): 92-7). Además, descubrieron que los pacientes con ictus isquémico tratados con tPA que mostraron mayor nivel de endostatina mostraron un resultado funcional afectado lo que significa que estos pacientes eran dependientes en actividades de la vida diaria tres meses después del ictus.

45 Tian identifica altos niveles de endostatina en tejido isquémico de conejo (Tian et al. "Increased protein and mRNA expression of endostatin in the ischemic brain tissue of rabbits after middle cerebral artery occlusion". *Neurosci Bull*.

2007. 23(1): 35-40). Concluyen que la isquemia cerebral conduce a una regulación hacia arriba de la endostatina en el cerebro.

5 Navarro-Sobrino describe un array de moléculas relacionadas con angiogénesis y muestra que el nivel basal de endostatina está asociado a una dependencia funcional de larga duración ($mRS > 2$; $p = 0,004$) en ictus agudo (Navarro-Sobrino et al. "A Large Screening of Angiogenesis Biomarkers and their Association with Neurological Outcome after Ischemic Stroke"; *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 216, 1, 205-211). En este estudio se miden muchos marcadores, pero es importante destacar que ninguna combinación de ellos mejora la predicción de la endostatina sola. En esta publicación no se considera FasL.

10 Arenillas ha observado a pacientes con estenosis intracraneal sintomática (Arenillas et al. "Angiogenesis in Symptomatic intracranial Atherosclerosis: Predominance of the Inhibitor Endostatin Is Related to a Greater Extend and Risk of Recurrence"; *Stroke*, 2005, Vol. 36, 1, 92-97). Se les extrajo muestras de sangre en su visita de admisión en el hospital, tres meses después del evento isquémico relevante. Una concentración aumentada en el nivel basal de endostatina se consideró un predictor independiente de nuevos eventos vasculares; de nuevo, sin considerar FasL. Es más, en la presente invención la endostatina no actúa como un marcador de recurrencia sino de desarrollo de la enfermedad.

15 Rosell muestra que el nivel de endostatina está inversamente relacionado con la evolución de la mejora clínica de los pacientes que sufren de ictus (Montaner et al. "High level of an Angiogenesis inhibitor (endostatin) is Related to poor Outcome in Ischemic Stroke Patients treated with t-PA. 2005 www.tesisenxarxa.net), en la que se considera la publicación más cercana de la técnica a la presente invención. Este es el primer estudio que muestra que un factor angiostático, la endostatina del plasma está sobre expresado después del ictus cardioembólico agudo. La publicación muestra la correlación positiva entre la endostatina y la calificación de la escala Rankin modificada (mRS , varía los pacientes de ictus mediante el resultado funcional desde 0= "sin síntomas" a 5= "discapacidad muy severa" y 6= "muerte"), que se relaciona con los niveles de endostatina plasmática durante la fase aguda con evolución adicional de la patología. Así, identifican el papel de la endostatina como un marcador biológico de la evolución del ictus en un paciente. Sin embargo, la endostatina sola muestra pobre correlación mRS ($R = 0,357$; $P = 0,035$). Este marcador considerado solo no suministra información más precisa que cualquier otro marcador clásico, por ejemplo que el NIHSS o simplemente que la edad del paciente. Por lo tanto, el uso de endostatina en diagnóstico combinado no se puede considerar particularmente sugerido con respecto a otros biomarcadores de la técnica.

25 En la presente solicitud "r" se entiende como el coeficiente de correlación que se refiere a un número entre menos uno y más uno (-1,0 a 1,0) que mide la cantidad del acuerdo entre dos variables, y quiere decir lo cercana que está la gráfica dibujada que enlaza a dichas dos variables en una línea recta.

30 En la presente solicitud el "valor P" significa la probabilidad (de cero a uno) de que ocurran algunos resultados si la hipótesis nula sin efecto fuera cierta. Un valor de $p \leq 0,05$ se utiliza a menudo como umbral para indicar la significancia estadística.

35 Recientemente, se han propuesto varios paneles de biomarcadores para ser utilizados en el diagnóstico de ictus isquémicos (Blood biomarkers in acute stroke. Foerch C, et al. *Neurology*. 2009 Aug 4;73(5):393-9). La solicitud Internacional WO 2004/059293 A2 describe un panel de biomarcadores para el diagnóstico diferencial de ictus que incluye la matriz metaloproteínasa 9, el factor natriurético del cerebro, el dímero d y la proteína S 100 beta (Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. Laskowitz DT, et al. *Stroke*. 2009 Jan; 40(1): 77-85). Sin embargo, según el conocimiento de los inventores, ningún panel o combinación de biomarcadores están siendo utilizados en la práctica diaria para predecir el resultado del ictus.

40 El problema de la técnica es entonces encontrar un marcador adecuado que indique la evolución clínica de un paciente que sufre de enfermedades neurovasculares, que muestre una correlación mRS mayor que aquellos del estado de la técnica. La solución propuesta por la presente invención es el uso combinado de endostatina y FasL, que muestra de manera sorprendente una acción diagnóstica sinérgica en el ictus y dan como resultado una mejor precisión en la predicción que cualquier otro marcador utilizado en la técnica, a menudo corrigiendo sus resultados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 La presente invención es un método para predecir la evolución de un paciente que sufre de ictus, que comprende evaluar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de endostatina y FasL, o de sus respectivas moléculas de ácido nucleico que las codifican, determinar si dichos niveles de endostatina y FasL juntos, o de sus respectivas moléculas de ácido nucleico que las codifican, están por encima o por debajo de unos valores de corte predeterminados y predecir el resultado funcional de dicho ictus en dicho paciente evaluando el resultado de la etapa previa.

En el alcance de la presente invención, la obtención de una muestra biológica del paciente no compromete ninguna etapa quirúrgica que pudiera involucrar riesgos sustanciales para la salud del dicho paciente. Además, la evolución del paciente está directamente relacionada con el resultado funcional de la enfermedad.

5 Una realización preferida de la presente invención es que dicha muestra biológica se haya tomado del paciente a lo largo de las siguientes 24 horas después del episodio agudo del ictus.

10 La presente solicitud muestra que aquellos pacientes con ictus funcionalmente dependientes a los tres meses del evento isquémico tuvieron un nivel mayor de endostatina y FasL en la fase hiperaguda, cuando se llega Urgencias. Los inventores demuestran la correlación positiva de los niveles isquémicos de estos dos marcadores, la endostatina y el FasL con la evolución de los pacientes de ictus. Estos marcadores plasmáticos medidos correctamente después de producirse el ictus, son capaces de predecir con gran especificidad el pronóstico funcional del paciente. Esto hace la combinación de la presente invención un marcador potente y muy específico de la evolución de dichos pacientes.

15 Los nuevos marcadores biológicos o los relacionados con la familia y los parámetros clínicos son utilizados en el diagnóstico de la familia completa de las enfermedades neurovasculares, que también comparten síntomas neurológicos similares tales como la oclusión de arterias cerebrales grandes y pequeñas que conducen a la isquemia del cerebro o a la ruptura de vasos, lo que conduce a hemorragias cerebrales. Por lo tanto, la combinación de la endostatina y el FasL es adecuada para todas las enfermedades que se relacionan con ictus.

20 En el alcance de la presente solicitud, el término “marcador biológico” o “biomarcador” se refiere a cualquier parámetro medible (anatómico, fisiológico, bioquímico o molecular) capaz de monitorear un proceso fisiológico o patológico tal como la generación de enfermedad, la respuesta a intervención médica o el relapso, o la respuesta del cuerpo a factores ambientales externos. Un “biomarcador de pronóstico” es un parámetro medible incorporado a una prueba validada que la hace predictiva de la progresión de la enfermedad en un caso individual, mientras un “biomarcador de diagnóstico” es predictivo de la generación de la enfermedad.

25 Una realización preferida de la invención es que la muestra biológica tomada del paciente es una muestra de sangre. Otra realización es que dicha muestra biológica es una muestra de plasma. Otra realización es que sea una muestra de suero, y otra es una muestra de saliva.

30 La invención ejemplifica además los niveles de corte particulares de ambos marcadores considerados juntos, de los cuales se puede establecer que los pacientes tienen 100% de posibilidades de un estado funcional “dependiente” evaluado con respecto a la calificación del nivel en el tercer mes. El valor de especificidad del pronóstico proveniente de los niveles de corte es así del 100%. En el contexto de los ejemplos suministrados, cualquier paciente que exceda de 184 ng/ml de la endostatina y 37,1 pg/ml del FasL tuvo 100% de posibilidades de empeorar su pronóstico.

35 En el alcance de la presente solicitud, una “calificación dependiente” mRS >2, se refiere a un mal pronóstico funcional. La “Escala Rankin modificada” (mRS) es una escala aceptada en la técnica para medir el grado de discapacidad o dependencia de las actividades diarias de gente que ha sufrido de ictus. Se ha convertido en la medición del resultado clínico más ampliamente utilizado y el punto final para la mayoría de los ensayos clínicos de ictus. La escala va de 0 a 6, desde salud perfecta sin síntomas hasta la muerte.

• 0- Sin síntomas

• 1- Sin discapacidad significativa. Capaz de llevar a cabo todas las actividades usuales, a pesar de algunos síntomas.

40 • 2 – Ligera discapacidad. Capaz de realizar sus propios asuntos sin ayuda, pero incapaz de llevar a cabo todas las actividades previas.

• 3 – Discapacidad moderada. Requiere alguna ayuda, Pero es capaz de caminar sin ayuda.

• 4 – Discapacidad modernamente severa. Incapaz de atender las propias necesidades del cuerpo sin ayuda, e incapaz de caminar sin ayuda.

45 • 5 – Discapacidad severa – requiere de cuidado y atención de enfermera constante, postrado en la cama, incontinente.

• 6 – Muerte.

Los pacientes con altos niveles de endostatina en la línea base (< 3 horas después de producido el síntoma) serán dependientes a los 3 meses, lo que significa que no podrán hacer sus actividades diarias independientemente.

La invención muestra que los pacientes con mRS calificado ≤ 2 (pacientes independientes) llegan a un departamento de emergencias con bajos niveles combinados de endostatina y FasL y produjeron una buena evolución. De otro lado, los altos niveles de estos marcadores medidos en la fase aguda del ictus puntualizarían una menor evolución favorable. Cuando se evalúa el resultado funcional a los tres meses, los inventores encontraron que los pacientes dependientes, pacientes con mRS >2 con mal resultado de la enfermedad, habían tenido mayor nivel de ambos biomarcadores ($p < 0,05$). La combinación de los niveles de endostatina y FasL alcanza 100% de la especificidad. La mayor especificidad de pronóstico es determinante para asegurar que todos los pacientes que se vuelvan dependientes en tres meses reciban la mayor atención médica precisa. Solamente la combinación novedosa de los biomarcadores de la invención muestra el valor predictivo más alto.

Las posibles combinaciones de los marcadores de ictus de diagnóstico independiente usualmente no muestran ningún pronóstico agregado o más preciso. Sin embargo, la prueba combinada de endostatina y FasL es más específica que utilizar cada una de ellas separadamente. Más aún la prueba combinada de endostatina y FasL es un indicador más potente que cualquier herramienta de pronóstico clínico y agrega un valor de pronóstico significativo a todas las otras variables clínicas conocidas por estar asociadas con resultado pobre. La combinación de la invención muestra un efecto sinérgico diagnóstico sorprendente, que le confiere actividad inventiva sobre la técnica.

Una realización del método de la presente invención comprende la endostatina y el FasL en combinación con al menos otro biomarcador para la predicción de la evolución de un paciente que sufre de ictus. Otra realización es el método de la invención que comprende endostatina y FasL en combinación con al menos un parámetro clínico para la predicción de la evolución de un paciente que sufre de ictus, preferiblemente NIHSS, la edad o degradación de la arteria probada con *doppler*.

Una realización adicional del método de la invención es que la predicción de la evolución del paciente que sufre de ictus le posibilita a un médico determinar el grado y el tipo de terapia recomendada para evitar o tratar dicho ictus.

Aun otra realización de la invención es el uso de endostatina y FasL combinadas como un indicador de la evolución de un paciente que sufre de ictus, preferiblemente cuando los niveles de endostatina y FasL de dicha combinación se buscan en una muestra biológica por encima de ciertos niveles de corte.

La invención también se refiere a un kit que incluye al menos un recipiente que contiene un anticuerpo capaz de reconocer endostatina y otro anticuerpo capaz de reconocer FasL en una muestra biológica de un paciente que sufre de ictus, instrucciones para el uso de dichos anticuerpos y un dispositivo para determinar si el resultado de la cuantificación de la endostatina y el FasL combinados están por encima o por debajo de niveles de corte predeterminados indicativos de la probabilidad de un pronóstico de un resultado funcional de ictus en dicho paciente. Preferiblemente, la muestra biológica aprobada se selecciona entre la muestra de sangre, la muestra de plasma, una muestra de suero y una muestra de saliva.

Otra realización de la invención se refiere a un método para predecir la evolución clínica de un paciente que sufre de un ictus relacionado con el nivel de endostatina y FasL con los niveles de las moléculas de ácido nucleico que codifican la endostatina y las proteínas FasL, comprendiendo dicho método comprende la etapa de detectar en una muestra biológica adecuada de dicho paciente el nivel de endostatina y de proteínas FasL.

La invención ofrece la posibilidad de manejar el pronóstico del diagnóstico de un amplio número de pacientes en otros centros diferentes a aquellos en donde se obtuvieron las muestras biológicas. Una realización adicional de la invención es, entonces, un sistema para la predicción de la evolución de un paciente de ictus, que comprende medios para procesamiento de datos, estando configurados dichos medios para procesamiento de datos para evaluar en dicha muestra biológica el nivel de endostatina y el FasL, o de sus respectivas moléculas de ácido nucleico que las codifican; para determinar si dichos niveles de endostatina y FasL juntos o de sus respectivas moléculas de ácido nucleico que las codifican, están por encima o por debajo de niveles de corte predeterminados; y para predecir el resultado funcional del ictus del paciente que evalúa el resultado de la determinación previa.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curvas Características de Operación del Receptor (ROC) del nivel FasL de línea base (A) y de endostatina de línea base (B). La flecha indica los puntos de corte para el FasL (37,1 ng/ml) y endostatina (184 ng/ml) con la sensibilidad y la especificidad más alta para identificar la dependencia a los tres meses.

Figura 2. Niveles de endostatina (eje de las X) y FasL (ejes de las Y) en pacientes dependientes de ictus (mRS > 2) (puntos negros) y en pacientes independientes de ictus (mRS ≤ 2) (cruces negras). Las líneas son trazadas a través de cortes previamente seleccionados para ambos biomarcadores si muestran que solamente los pacientes con un resultado funcional malo (puntos negros) están localizados en el área con altos niveles en sangre para ambos marcadores (cuadrante superior derecho).

Figura 3. Porcentaje de pacientes dependientes de ictus (calificación > de 2) dependientes del nivel de endostatina (igual o mayor de 184 ng/ml) y FasL igual o mayor de de 37,1 ng/ml.

Figura 4. Curvas ROC del modelo de variable clínica y del modelo de variable clínica + biomarcadores comparados con la línea de referencia.

- 5 En el alcance de la presente descripción, “variable clínica” significa los datos demográficos indicativos de ictus tal como la edad, el género, y la historia familiar del ictus, así como también la información clínica tal como la presencia de hipertensión, dislipidemia, diabetes, fibrilación atrial, enfermedad cardiaca, fumar, medicación, y la historia clínica pasada del ictus.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PARTICULARES

- 10 Los siguientes ejemplos se incluyen como soporte de la materia objeto reivindicado, en ningún caso limitando el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Selección de pacientes

15 El estudio incluyó pacientes con ictus isquémico agudo (n = 61) que involucra el territorio de la Arteria Cerebral Media (MCA) admitida en el departamento de emergencias del Hospital Vall d’Hebron, Barcelona, España. Todos los pacientes recibieron terapia trombolítica en una dosis estándar de 0,9 mg/kg (10% de bolo y 90% de infusión continua durante 1h) dentro de las 3h desde el inicio de los síntomas. En la admisión, todos los pacientes tuvieron o se les hizo una exploración con una Tomografía Craneal Computarizada (CT) y una segunda exploración CT se repitió 24 a 48 horas después (o antes cuando ocurrió el deterioro neurológico rápido) para evaluar la presencia y el tipo de transformación hemorrágica (HT) que se definió de acuerdo con los criterios previamente publicados (Hacke et al., Thrombolysis with alteplase 3 to 4,5 hours after acute ischemic stroke. N Engl J Med. 2008; 359: 1317-29; Pessin 1990). Las mediciones Doppler Transcraneanas (TCD) se efectuaron por un neurólogo experimentado sin acceso a los resultados de laboratorio, con el uso de un dispositivo Multi-Dop X4 TCD (DWL Elektronische System GmbH). Los exámenes TCD se efectuaron antes de iniciar el tratamiento, y al final de la infusión t-PA y en serie durante las primeras 24 h. Las oclusiones próximas y distantes MCA y los grados de recanalización de seguimiento fueron definidos como se describió previamente (Burgin et al, Transcranial doppler ultrasound criteria for recanalization after thrombolysis for middle cerebral artery stroke. Stroke 2000; 31: 1128-32).

20 Se obtuvo de cada paciente una historia detallada de los factores de riesgo vasculares, abuso de drogas, alcoholismo y medicación concomitante. Las Calificaciones de la Escala del Ictus del Instituto Nacional de Salud (NIHSS) se registraron para evaluar el nivel de conciencia y el estado neurológico en la admisión y durante las visitas de seguimiento (2,12, 24, 48h y a la descarga entre 3-7 días). La mejora neurológica se definió como una disminución en el NIHSS \geq 4 puntos y el deterioro neurológico como muerte o incremento en el NIHSS \geq 4 puntos a las 48h. El resultado funcional se definió mediante la escala Rankin modificada (mRS) tres meses después del ictus. Los pacientes fueron considerados dependientes cuando la calificación de la escala Rankin fue > de 2 puntos.

35 Las muestras de sangre venosa fueron extraídas de cada paciente en la admisión (línea base). El plasma fue extraído en tubos de EDTA, fue inmediatamente separado mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos y almacenado a -80°C hasta el análisis. El nivel del plasma de la endostatina humana se determinó mediante ELISA comercialmente disponible (Quantikine, R& D Systems, MN, USA) y FasL a través de la tecnología SearchLight. Cada muestra de plasma se analizó dos veces y la media de dos valores fue dada en ng/ml. Los coeficientes intra-ensayo medios de la variación fueron de menos de 30% para ambos biomarcadores. La endostatina y los niveles de FasL fueron expresados como una media \pm desviación estándar. El significado estadístico para las diferencias entre grupos se evaluó mediante la prueba Mann-Whitney. P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Para estudiar las correlaciones entre las variables continuas, se utilizaron los coeficientes Spearman. Los niveles de endostatina y FasL no siguieron una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov y gráfica P-P). Los niveles de endostatina y FasL (media \pm desviación estándar) y su asociación con las características demográficas, variables clínicas y el perfil de factores de riesgo en pacientes con ictus dependiendo de las características demográficas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

| | Endostatina | | |
|----------------------|----------------|----------------|---------|
| | Niveles | | |
| | Sí | No | Valor-p |
| Sexo (mujer) | 169,73 ± 66,36 | 135,06 ± 51,74 | 0,026* |
| HTA | 156,16 ± 69,81 | 144,89 ± 46,62 | 0,484 |
| Tabaco | 119,06 ± 31,44 | 161,74 ± 65,19 | 0,03* |
| Fibrilación Atrial | 175,64 ± 69,69 | 136,96 ± 51,02 | 0,015* |
| Diuréticos | 171,26 ± 76,99 | 136,94 ± 44,41 | 0,053 |
| Hematoma Parenquimal | 195,13 ± 72,34 | 145,9 ± 61,16 | 0,044* |
| mRS > 2 | 169,81 ± 72,34 | 132,67 ± 40,07 | 0,016* |
| Vaso (MCA) | 154,1 ± 61,19 | 122,95 ± 68,79 | 0,558 |
| TCD b (próximo) | 152,8 ± 70,1 | 150,01 ± 49,56 | 0,867 |
| TCD 12h (próximo) | 100,54 ± 23,5 | 157,88 ± 40 | 0,018* |
| TOAST (atero) | 147,51 ± 70,5 | 152,74 ± 58,92 | 0,046* |

| | FasL | | |
|----------------------|----------------|---------------|----------|
| | Niveles | | |
| | Sí | No | Valor -p |
| Sexo (mujer) | 21,32 ± 196,57 | 13,82 ± 16,52 | 0,072 |
| HTA | 14,3 ± 17,6 | 21,83 ± 18,67 | 0,085 |
| Tabaco | 15,64 ± 17,69 | 19,43 ± 18,82 | 0,386 |
| Fibrilación Atrial | 18,43 ± 18,53 | 16,76 ± 18,34 | 0,508 |
| Diuréticos | 15,93 ± 15,24 | 17,55 ± 18,95 | 0,776 |
| Hematoma Parenquimal | 25,8 ± 15,71 | 16,29 ± 18,43 | 0,154 |
| mRS > | 21,77 ± 21,3 | 12,85 ± 13,42 | 0,17 |
| Vaso (MCA) | 15,88 ± 17,62 | 34,24 ± 20,83 | 0,063 |
| TCD b (próximo) | 20,25 ± 19,88 | 10,48 ± 11,3 | 0,081 |
| TCD 12H (próximo) | 8,6 ± 4,5 | 7,8 ± 4,5 | 0,08 |
| TOAST (atero) | 16,3 ± 20,38 | 17,7 ± 17,83 | 0,579 |

HTA: Hipertensión arterial; mRS: ESCALA Rankin modificada; TCD: Exámenes doppler transcraneales; TOAST: El Trial de Org 10172 en el Tratamiento de Ictus Agudo, Atero: etiología aterotrombótica.*valor p ≤ 0,05.

La correlación entre los niveles de endostatina y FasL y la edad y la severidad del ictus en pacientes con ictus se muestra en la Tabla 2.

5 **Tabla 2.**

| | Endostatina | | Fas L | |
|--------------------|----------------|---------|----------------|---------|
| | R ² | Valor p | R ² | Valor p |
| Edad | 0,4 | 0001* | 0,889 | 0,018* |
| NIHSS Basal | -0,97 | 0,005* | 0,302 | 0,018* |
| NIHSS 1h | 0,993 | 0,001 | 0,324 | 0,015* |
| NIHSS 2h | 0,528 | 0,089 | 0,337 | 0,014* |
| NIHSS 24h | 0,879 | 0,02* | 0,266 | 0,038* |
| NIHSS 48 h | 0,219 | 0,116 | 0,268 | 0,044* |
| NIHSS alta | 0,367 | 0,007* | 0,213 | 0,127 |

R²: coeficiente de correlación entre los niveles de biomarcación y la edad o la severidad del ictus. *valor p ≤ 0,05, NIHSS: Calificaciones de la Escala de Ictus del Instituto Nacional de Salud.

Ejemplo 2: Determinación de los Valores de corte para endostatina y FasL.

10 Diferentes variables demográficas. Clínicas y factores de riesgo se asociaron con buenos (mRS ≤ 2) y pobres resultados (mRS > 2) en la población con ictus. La Tabla 3 muestra la característica clínica, demográfica y los niveles de biomarcador asociados con el resultado funcional del ictus (mRS < ó > 2) a los tres meses y muestra el análisis de los factores que influyen el resultado funcional del ictus junto con aquellos biomarcadores. El análisis de los factores que influyen el resultado funcional del ictus (mRS > 2) se evaluó mediante la prueba Mann-Whitney.

15 **Tabla 3**

| | Global | Nivel < 2 | Nivel >2 | Valor p |
|------------------------------|--------------------|------------|------------|---------|
| Edad | 70,44 12,6 (36-94) | 68,13±13,3 | 72,68±11,7 | 0,097 |
| Sexo (mujer) | 29 (47,5%) | 46,70% | 48,40% | 0,893 |
| Tabaco | 11 (19,6%) | 28,60% | 10,7% | 0,093 |
| HTA | 36 (59%) | 56,70% | 61,30% | 0,714 |
| DM | 15 (24,6%) | 20,00% | 29,00% | 0,413 |
| ACxFA | 23 (37,7%) | 26,70% | 48,40% | 0,008* |
| Cardiopatía Isquémica | 11 (18%) | 16,70% | 19,40% | 0,785 |
| Dislipemia | 15 (25%) | 23,30% | 26,70% | 0,766 |
| Ictus Previo | 9 (14,8%) | 10,00% | 19,40% | 0,303 |

ES 2 559 104 T3

| | | | | |
|-----------------------------|---------------|----------------|-------------------|--------------------|
| Plaqueta | 20 (33,3%) | 27,60% | 38,70% | 0,361 |
| Estatina | 13 (21,3%) | 20% | 22,60% | 0,806 |
| ADO | 12 (21,8%) | 17,20% | 26,90% | 0,385 |
| DIUASA | 25 (42,4%) | 34,50% | 50,00% | 0,228 |
| ARA II | 4(6,8%) | 6,90% | 6,70 | 0,972 |
| ACE-I | 11(18,6%) | 17,20% | 20,00 | 0,786 |
| Fas L > 37,1 | 10 (16,4%) | 3,30% | 29 | 0,007* |
| Endostatina > 184 | 18 (29,5%) | 13,30% | 45,20 | 0,006* |
| TCD b (próximo) | 35 (59,3%) | 40% | 79,30 | 0,002* |
| TCD 1h | 23 (41,1%) | 17,20% | 66,70 | 0,001* |
| TCD 2h | 15 (32,6%) | 4,50% | 58,30 | <0,001* |
| TCD 24h | 3 (11,1%) | 0% | 25 | 0,031 [†] |
| Evolución 48h | 38 (62,3%) | 90% | 35,50 | <0,001* |
| NIHSS b | 16 (11-20) | 14(9,75-18,5) | 17(10,25-19,75) | 0,035* |
| NIHSS 1h | 14,5 (9-19) | 11(8,25-16,25) | 17 (9,5-17) | 0,013* |
| NIHSS 2h | 11 (7,5-17) | 9 (5-11) | 16,5 (8,25-16,5) | 0,002* |
| NIHSS 12h | 9,5 (5-18,25) | 6 (4-10) | 15,5 (8,25-19,75) | <0,001* |
| NIHSS 24h | 8 (4-16,5) | 5 (2-9,25) | 15,5(8,25-18,75) | <0,001* |
| NIHSS 48h | 7 (2-16) | 2,5(1,75-7) | 15,5(10,25-17,75) | <0,001* |
| NIHSS alta | 3 (1-10) | 2 (1-4) | 13,5(6,25-20,5) | <0,001* |

HTA: Hipertensión; DM: Diabetes melitus; ACxFA: fibrilación atrial, ADO: Fármacos antidiabéticos orales; DIUASA: fármaco antiidiurética; ARA II antagonismo del receptor de angiotensina ACE: Enzima que convierte la angiotensina 1; TCD: Exámenes Doppler transcraneano; NIHSS: Calificaciones de la escala de ictus del Instituto Nacional de Salud. *p< 0,05 se considera estadísticamente significativo.

5 Para determinar los valores de endostatina y Fas L se efectuaron curvas de las Características del Operador Receptor (ROC). Una curva ROC es el dibujo gráfico de la sensibilidad, o de la tasa positiva cierta, vs. la tasa positiva falsa (1-especificidad o 1- tasa negativa cierta). En el alcance de la presente solicitud, el término "sensibilidad" se refiere al porcentaje de la proporción de los positivos presentes que fueron correctamente identificados como tales; por ejemplo, el porcentaje de personas enfermas que fue correctamente identificadas por tener la condición. El término "especificidad" mide la proporción de negativos que fueron correctamente identificados; por ejemplo, el porcentaje de gente saludable que fue correctamente identificada como no poseedora de la condición.

15 Una predicción óptima teórica puede lograr un 100% de la sensibilidad, es decir, predecir todas las personas del grupo de enfermos enfermas y un 100% de especificidad, es decir, no predecir a nadie del grupo saludable como enfermo. Para identificar los mejores valores de corte se efectuó una curva ROC para cada biomarcador y utilizar que valores fueron efectuados en una regresión logística con otros parámetros relacionados con el resultado para determinar los factores que se podrían considerar como indicadores independientes de la dependencia a los tres meses (mRS>2; dependencia), utilizando el método en forma de etapas hacia adelante mediante la prueba de índice de probabilidad (Figura 1). Se detectó un punto de corte de endostatina de 184 ng/ml que tenía una sensibilidad del 45,2% y una especificidad del 86,7% para identificar la dependencia a los tres meses y un FasL con un punto de

corte de 37,1 ng/ml que tenía una sensibilidad del 29% y una especificidad del 96,7% para detectar la dependencia a los tres meses.

Ejemplo 3: Sensibilidad de la endostatina y FasL.

5 Para calcular la sensibilidad y la especificidad para las curvas del corte del biomarcador para predecir el resultado del ictus, se configuró una curva de las características del operador receptor (ROC) para establecer el punto de corte de la endostatina y el FasL con la sensibilidad óptima y la especificidad que predice el resultado no favorable (mRS>2). Los biomarcadores seleccionados fueron modelados como variables dicótomas (con los valores de corte obtenido de las curvas ROC), y otras variables tales como la calificación NIHSS, la oclusión próxima de línea base y la edad fueron incluidas como variables continuas en diferentes modelos logísticos. Finalmente, los tres análisis de 10 regresión logística se efectuaron para determinar los factores que se podrían considerar como indicadores independientes del resultado no favorable utilizando el método en forma de etapas hacia adelante mediante la prueba de índice de probabilidad. Se efectúa una ecuación del modelo de regresión para calcular la probabilidad predictiva de la dependencia a los tres meses. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado significativo.

15 Un punto de corte de endostatina de 184 ng/ml tuvo una sensibilidad de 45,2% y una especificidad de 86,7% para identificar la dependencia a los tres meses del evento isquémico con un posible valor predictivo del 77,8% y un valor predictivo negativo del 60,5%. Con relación al FasL un punto de corte de 37,1 ng/ml tuvo una sensibilidad del 29% y una especificidad del 96,7% para detectar la dependencia a los tres meses con un posible valor predictivo positivo del 90% y un valor predictivo negativo del 56,9%. Todos estos valores son mostrados en la Tabla 4. La combinación de la endostatina > 184 ng/ml + FasL > 37,1 ng/ml tuvieron una especificidad del 100% para predecir un resultado 20 malo.

En el alcance de la presente solicitud, el “Valor Predictivo Positivo” (PPV) es la porción de los pacientes con resultados de prueba positivos que son correctamente diagnosticados, habitualmente aquellos pacientes cuyo nivel de endostatina en el plasma es mayor de 184 ng/ml y un nivel de FasL mayor de 37,1 ng/ml, midiendo quienes crean dependiente (mRS > 2) a los tres meses. El “valor Predictivo Negativo” (NPV) es la proporción de los pacientes con 25 resultados de prueba negativos quienes son correctamente diagnosticados; habitualmente aquellos pacientes que tenían niveles inferiores de endostatina y niveles de FasL y eran independientes (mRS ≤ 2) a los tres meses. La Tabla 4 muestra la sensibilidad, especificidad, PPV y NPV de la endostatina de línea base y el FasL y la combinación tanto de ambos biomarcadores en la población actual.

Tabla 4

| | Sensibilidad | Especificidad | PPV | NPV |
|---------------------------|---------------------|----------------------|------------|------------|
| FasL 37,1 | 29 | 96,7 | 90 | 56,9 |
| Endostatina 184 | 45,2 | 86,7 | 77,8 | 60,5 |
| FasL + endostatina | 9 | 100 | 100 | 51,7 |

30 **Ejemplo 4: Efecto sinérgico de endostatina y el FasL**

Diferentes variables clínicas tales como el NIHSS, la edad, el tipo de oclusión estuvieron fuertemente asociados con el resultado del paciente a los tres meses, significando que los pacientes mayores con mayor déficit neurológico y una oclusión próxima de línea base habían tenido un peor resultado a los tres meses. La adición de los biomarcadores de pronóstico debe mejorar la utilidad de los modelos predictivos clínicos.

35 En el alcance de la presente solicitud, el término “índice de probabilidad” (OR) se refiere a la probabilidad de que un cierto evento fuera igual para dos grupos (pacientes con ictus independientes o dependientes a los tres meses). Un índice de probabilidad de 1 implicó que el evento era igualmente probable en ambos grupos. Un índice de probabilidades mayor de 1 implicó una mayor probabilidad para ser dependiente funcional a los tres meses. El OR y el 95% de intervalos de confianza (CI) para el efecto sobre la dependencia a los tres meses fue estimado utilizando un análisis de regresión logística ajustado por los efectos de los factores de riesgo convencional. Se evaluó la 40 contribución adicional de los biomarcadores de endostatina + FasL que estuvieron significativamente asociados con el resultado pobre después del ajuste al modelo de variable clínica previamente validado. Los diferentes modelos de regresión logística son analizados, ajustados para diferentes variables clínicas del OR ajustado de resultado no favorable a los tres meses para los niveles de línea base y FASL, como en la Tabla 5.

45

Tabla 5

Modelo 1

| Incluyendo NIHSS, edad y biomarcadores individuales | OR | CI | P |
|---|-------|-----------|-------|
| FasL 37,1 | 14,36 | 1,4-138,8 | 0,021 |
| Endostatina 184 | 5,62 | 1,3-2,37 | 0,019 |
| Edad | 1,026 | 0,97-1,08 | 0,345 |
| Calificación NIHSS | 1,096 | 0,98-1,23 | 0,126 |

Modelo 2

Incluyendo NIHSS, edad y biomarcadores combinados

| | | | |
|--------------------|------|------------|-------|
| FasL + Endostatina | 4,86 | 1,86-12,74 | 0,001 |
|--------------------|------|------------|-------|

Modelo 3

Incluyendo NIHSS, edad, biomarcadores combinados y TCD de línea base

| | | | |
|---------------------------|------|-----------|-------|
| FasL + Endostatina | 5,34 | 1,5-19,3 | 0,011 |
| TCD (Distante vs próxima) | 5,76 | 1,3-0,019 | |
| Edad | 1,03 | 0,9-1,09 | 0,277 |
| Calificación NIHSS | 1,04 | 0,9-1,1 | 0,555 |

5 En el alcance de la presente solicitud, el “efecto sinérgico de diagnóstico” se cumple cuando el significado estadístico combinado de dos o varias moléculas es mayor que la suma de las moléculas separadas independientemente. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SPSS 15,0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). P< 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Un valor p inferior implica mayores diferencias estadísticamente significativas.

10 Los resultados de la invención mostraron un nivel de endostatina > 184 ng/ml (p = 0,006) y un FasL > 37,1 (p = 0,016) que fueron los principales indicadores de línea base de dependencia a los tres meses como en el Modelo 1 mostrado en la Tabla 5. Después del ajuste de la edad y las calificaciones NIHSS, la combinación de ambos biomarcadores permaneció independiente como en el Modelo 2 y la combinación mostró un valor inferior p (p = 0,001) que cada biomarcador independientemente (Tabla 5). De manera interesante el efecto sinérgico de ambos biomarcadores se observó en el Modelo 3 por que incurriendo en el modelo la TCD línea base (próxima), la combinación endostatina + FasL, fue el factor independiente principal de la dependencia a los tres meses. En el modelo 2 y 3 las calificaciones únicas de los biomarcadores no permanecieron independientes y la combinación de 15 endostatina + FasL fue el principal indicador de dependencia.

20 Los inventores también confirmaron que la combinación endostatina + FasL fue específica. Ellos analizaron los niveles del factor derivado estromal 1 (SDF-1), un biomarcador relacionado con el proceso de angiogenia (un proceso totalmente diferente de la apoptosis) y el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR-1), un biomarcador también involucrado en los procesos de apoptosis. Ambos biomarcadores están asociados con un peor pronóstico a los tres meses independientemente pero no en combinación con la endostatina. La Tabla 6 muestra el modelo logístico que incluye diferentes variables clínicas de resultado no favorable a los tres meses para la combinación de endostatina de línea base y los niveles SDF-1. Los niveles SDF-1 estuvieron asociados con dependencia (mRS ≥ 2) a los tres meses [OR= 13,6(1,7-108,8); p = 0,014], pero no la combinación de endostatina +SDF-1 (p = 0,998).

25

Tabla 6

| Incluyendo NIHSS, edad, tcd de línea base | OR | CI | P |
|---|------|-----------|-------|
| SDF-1 | 13,6 | 1,7-108,8 | 0,014 |
| TCD | 1,9 | 0,22-16 | 0,553 |
| Endostatina+SDF-1 | | | 0,998 |

De manera interesante, los resultados también mostraron una asociación entre TNFR-1 y un mal resultado [OR = 5,8(1,4-23,1); p = 0,012], pero no en el análisis de la combinación endostatina + TNFR1 (p = 0,998), como en la Tabla 1, que muestra el modelo logístico que incluye diferentes variables clínicas o un OR ajustado de resultado no favorable a los tres meses para la endostatina de línea base y los niveles de TNFR-1.

Tabla 7

| Incluyendo NIHSS, edad, TCD de línea base | OR | CI | P |
|---|-----|----------|-------|
| TNFR-1 | 5,8 | 1,4-23,1 | 0,012 |
| TCD | 6,9 | 1,9-25,2 | 0,003 |
| Endostatina+TNFR-1 | | | 0,998 |

Con el fin de comparar la capacidad de los modelos para discriminar entre resultado bueno y pobre, los inventores calcularon áreas bajo las curvas del operador receptor (AUC). Un AUC de 1 indicó discriminación perfecta; 0,5, no discriminación. Los inventores calcularon los modelos de pronóstico utilizando variables clínicas o variables clínicas + biomarcadores.

El efecto sinérgico también se observó en los análisis de contribución de endostatina + FasL a los modelos de pronóstico clínico. La adición de los biomarcadores (valor AUC = 0,834 vs. valor AUC = 0,766) mejoró la predicción del resultado pobre después del ictus (Figura 4). Por lo tanto, los inventores también determinaron el modelo predictivo que incluye las variables clínicas (TCD de línea base) y los niveles de endostatina + FasL para predecir el resultado. Una adecuación proveniente del modelo de regresión se efectuó para calcular la probabilidad predictiva del resultado malo a los tres meses. La probabilidad predicha para dependencia (mRS > 2) se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\text{Probabilidad (\%)} = \frac{1}{1 + e^{-(-9,8 + (1,67 * \text{Endostatina} + \text{FasL}) + (1,75 * \text{línea base TCD}))}}$$

Los biomarcadores y las variables clínicas incluidos en la ecuación:

Endostatina + FasL (valor de rango 2-5) significan:

2: Endostatina < 184 ng/ml y FasL < 37,1 ng/mL

3: Endostatina ≥ 184 ng/ml y FasL < 37,1 ng/mL

4: Endostatina < 184 ng/ml y FasL ≥ 37,1 ng/mL

5: Endostatina ≥ 184 ng/ml y FasL ≥ 37,1 ng/mL

TCD de línea base (valor de rango 0-2) significan:

0: oclusión normal

1: oclusión distante

2: oclusión próxima.

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir la evolución de un paciente que sufre de ictus, que comprende:
 - a) evaluar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de endostatina y FasL, o de sus moléculas de ácido nucleico respectivas que las codifican;
 - 5 b) determinar si dichos niveles de endostatina y FasL juntos, o de sus moléculas de ácido nucleico respectivas que las codifican, están por encima o debajo de unos niveles de corte predeterminados; y
 - c) predecir el resultado funcional del ictus en dicho paciente evaluando el resultado a la etapa b).
2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha muestra biológica ha sido extraída del paciente a lo largo de las siguientes 24 horas después de un episodio agudo de ictus.
- 10 3. Un método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de sangre.
4. Un método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de plasma.
- 15 5. Un método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de suero.
6. Un método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de saliva.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende endostatina y FasL en combinación con al menos otro biomarcador para la predicción de la evolución de un paciente que sufre de ictus.
- 20 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende endostatina y FasL en combinación con al menos un parámetro clínico para la predicción de la evolución de un paciente que sufre de ictus.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicha predicción de la evolución del paciente que sufre de ictus le posibilita al médico determinar el grado y tipo de terapia recomendada para evitar o tratar dicho ictus.
- 25 10. Uso de la endostatina y el FasL combinados como un indicador de la evolución de un paciente que sufre de ictus.
- 30 11. Kit que incluye al menos un recipiente que contiene un anticuerpo capaz de reconocer endostatina y otro anticuerpo capaz de reconocer FasL en una muestra biológica de un paciente que sufre de ictus, instrucciones el uso y un dispositivo para determinar si el resultado de la cuantificación de la endostatina y el FasL combinados están por encima o por debajo de unos niveles de corte predeterminados indicativos de la probabilidad de un pronóstico del resultado funcional del ictus en dicho paciente.
12. Sistema para la predicción de la evolución de un paciente de ictus que comprende medios de procesamiento de datos, estando configurados dichos medios de procesamiento de datos:
 - 35 - para evaluar en una muestra biológica el nivel de endostatina y FasL, o de las respectivas moléculas de ácido nucleico que las codifican;
 - para determinar si dichos niveles de endostatina y FasL o de las respectivas moléculas de ácido nucleico que las codifican, están por encima o debajo de niveles de corte predeterminados; y
 - para predecir el resultado funcional del ictus del paciente evaluando el resultado de la determinación previa.

Figura 1

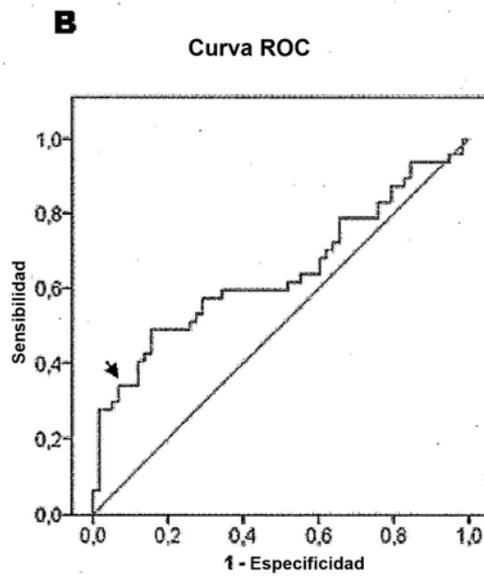
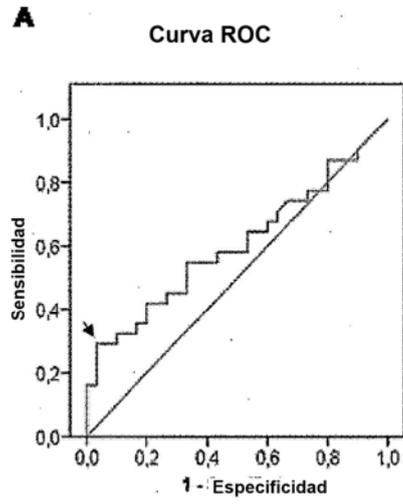


Figura 2

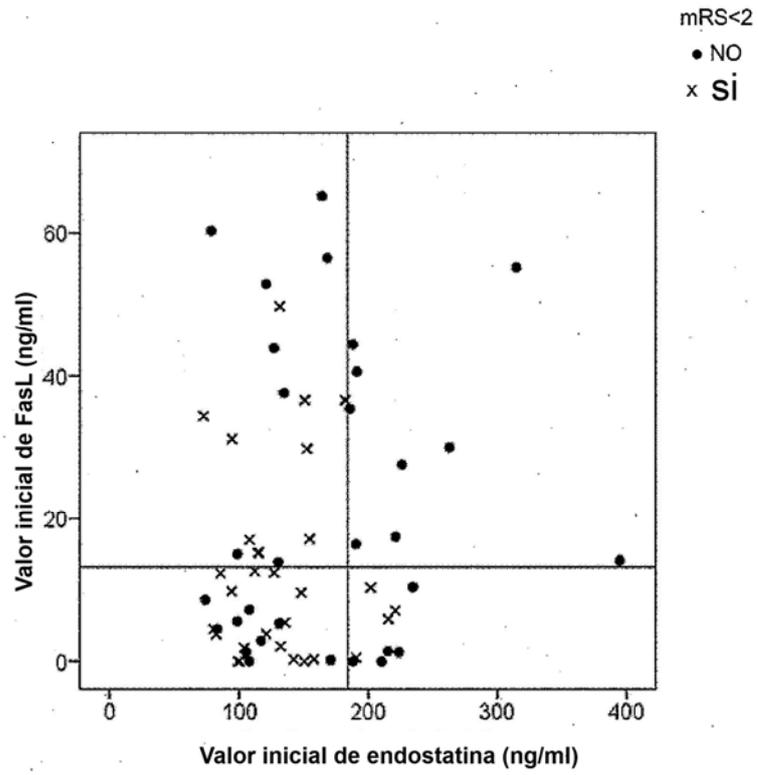


Figura 3

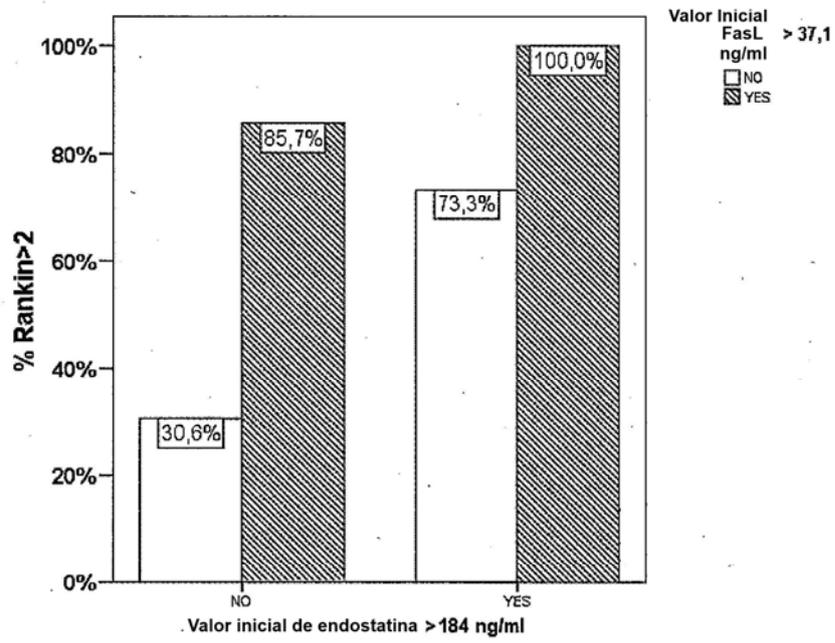


Figura 4

