

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 534**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014 PCT/GB2014/051721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195698**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014 E 14732597 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3004382**

54 Título: **Método para ayudar al diagnóstico diferencial del accidente cerebrovascular**

30 Prioridad:

**04.06.2013 GB 201309928**

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

**29.03.2019**

73 Titular/es:

**RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)  
Ardmore 55 Diamond Road  
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es:

**MCCONNELL, IVAN;  
LAMONT, JOHN;  
FITZGERALD, PETER y  
MAKRIS, KONSTANTINOS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 706 534 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 ayudar al diagnóstico diferencial del accidente cerebrovascular

**Antecedentes de la invención**

5 El accidente cerebrovascular es la tercera causa de muerte en todo el mundo y se puede definir como la pérdida de rápido desarrollo de la función(es) cerebral debido a la interrupción del suministro de sangre al cerebro. Según la Organización Mundial de la Salud, 15 millones de personas al año sufren accidentes cerebrovasculares en todo el mundo, 5 millones mueren y otros 5 millones quedan discapacitados permanentemente. Se estima que la presión arterial alta es un factor que contribuye en 12,7 millones de estos 15 millones de casos de accidentes cerebrovasculares. En el Reino Unido, aproximadamente 150000 personas tienen un accidente cerebrovascular cada año y los accidentes cerebrovasculares representan alrededor de 53000 muertes por año. Los accidentes cerebrovasculares le cuestan a la economía un estimado de 8 billones de libras por año solo en Inglaterra y los pacientes con accidentes cerebrovasculares ocupan aproximadamente el 20 por ciento de todas las camas de hospital de agudos y el 25 por ciento de las camas a largo plazo.

Los accidentes cerebrovasculares se pueden clasificar en tres subtipos:

15 i) El accidente cerebrovascular isquémico (IS) se produce cuando disminuye el suministro de sangre al cerebro, dando como resultado un daño cerebral. Un accidente cerebrovascular isquémico se produce cuando un vaso sanguíneo se bloquea, generalmente mediante un coágulo de sangre. Este coágulo se puede formar localmente en una placa aterosclerótica (accidente cerebrovascular trombótico) o, alternativamente, puede ocurrir debido a una partícula o residuo viajero que se originó en algún otro lugar del torrente sanguíneo (accidente cerebrovascular embólico);

20 ii) El ataque isquémico transitorio (TIA) es un “mini accidente cerebrovascular” que se produce cuando el suministro de sangre al cerebro disminuye temporalmente. Se diagnostica un TIA si los síntomas se resuelven rápidamente (dentro de las 24 horas con el individuo recuperando su salud normal); y

25 iii) El accidente cerebrovascular hemorrágico (HS) se produce cuando la sangre se acumula dentro de la bóveda del cráneo, generalmente cuando se rompe un vaso sanguíneo debilitado. El accidente cerebrovascular hemorrágico se puede clasificar en dos subtipos principales, a saber, intracerebral (dentro del tejido cerebral) y subaracnoideo (alrededor de la superficie del cerebro y bajo su capa protectora).

30 IS y TIA representan aproximadamente el 85% de todos los casos de accidentes cerebrovasculares y HS represente el 15%. Para minimizar el daño neurológico después del accidente cerebrovascular, es crucial que los pacientes con accidente cerebrovascular se diagnostiquen de manera rápida y precisa, de modo que pueda administrarse el tratamiento adecuado. Por ejemplo, para acabar con los coágulos se puede administrar una terapia trombolítica tal como el activador tisular del plasminógeno (TPA). Sin embargo, dicha terapia solo se garantiza en IS y es perjudicial en HS. La naturaleza de la TIA no requiere dicha terapia y en tales casos se prescriben anticoagulantes como la Warfarina y la aspirina.

35 En la actualidad, si se sospecha un accidente cerebrovascular, se evalúan los síntomas físicos y se realiza, por lo general, una tomografía computarizada (CT). Una tomografía computarizada tiene una buena sensibilidad para identificar pacientes con HS (aproximadamente 90% de sensibilidad) pero una pobre sensibilidad para identificar pacientes con IS Y TIA (aproximadamente 20% de sensibilidad). En la práctica, se produce un daño tisular mínimo o nulo para el TIA debido a su naturaleza transitoria, por lo que la tomografía computarizada CT no es efectiva como técnica de diagnóstico. La imagen de Resonancia Magnética (MRI) tiene una sensibilidad mejorada para el diagnóstico de IS (hasta aproximadamente el 80%), pero el aumento de los requisitos de tiempo, la accesibilidad de la máquina y el alto coste han limitado su uso para el diagnóstico de accidentes cerebrovasculares. La pobre sensibilidad de la tomografía computarizada para la detección de IS y TIA significa que los ensayos de biomarcadores de diagnóstico basados en fluidos biológicos para detectar IS y TIA serían una herramienta invaluable para ayudar a los médicos en el diagnóstico del subtipo de accidente cerebrovascular. Los biomarcadores basados en fluidos biológicos tienen el potencial para acelerar y aumentar la precisión del diagnóstico de accidente cerebrovascular.

45 Varios biomarcadores candidatos se han propuesto para el diagnóstico de la delimitación del accidente cerebrovascular y del subtipo del accidente cerebrovascular y existen varias descripciones de discriminación de IS/TIA versus HS en técnicas anteriores, por ejemplo, los documentos de Patente EP1238284, WO 2010/086697, WO 2010/012834, y WO 2002/012892.

55 El documento de Patente EP1419388 describe los datos que distinguen IS de HS y todos los tipos de accidentes cerebrovasculares a partir de los controles sin accidente cerebrovascular. Sin embargo, hasta ahora ninguno ha encontrado uso en la práctica clínica y existe una necesidad clínica real de biomarcadores para los tres subtipos de accidentes cerebrovasculares que tengan una alta sensibilidad y especificidad para permitir un diagnóstico preciso.

El diagnóstico diferencial entre los tres subtipos diferentes de accidentes cerebrovasculares utilizando un análisis de

sangre facilitaría una decisión clínica más informada, podría hacer diagnósticos de neuroimagen potencialmente innecesariamente costosos y menos rápidos, y podría mejorar el resultado clínico para los pacientes.

**Compendio de la invención**

5 Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para ayudar al diagnóstico diferencial del accidente cerebrovascular hemorrágico, accidente cerebrovascular isquémico y un ataque isquémico transitorio en un paciente que ha sufrido o está sufriendo un accidente cerebrovascular, que comprende: determinar la concentración de los biomarcadores VCAM-1, GFAP y CRP en una muestra *ex vivo* obtenida del paciente; y establecer la importancia de la concentración de los biomarcadores.

**Descripción de los dibujos**

10 La Figura 1 es un análisis de la curva ROC para distinguir un TIA de otros tipos de accidentes cerebrovasculares utilizando los biomarcadores de la invención;

la Figura 2 es un análisis de la curva ROC para distinguir un IS de otros tipos de accidentes cerebrovasculares utilizando los biomarcadores de la invención;

15 la Figura 3 es un análisis de la curva ROC para distinguir un HS de otros tipos de accidentes cerebrovasculares utilizando los biomarcadores de la invención;

la Figura 4 es un gráfico que muestra la concentración de GFAP para cada subtipo de accidente cerebrovascular tanto en sujetos masculinos como femeninos;

la Figura 5 es un gráfico que muestra la concentración de VCAM1 para cada subtipo de accidente cerebrovascular tanto en sujetos masculinos como femeninos;

20 la Figura 6 es un gráfico que muestra la concentración de CRP para cada subtipo de accidente cerebrovascular tanto en sujetos masculinos como femeninos;

la Figura 7 es un gráfico que muestra la concentración de sTNFR1 para cada subtipo de accidente cerebrovascular tanto en sujetos masculinos como femeninos;

25 la Figura 8 es un gráfico que muestra la concentración de IL-6 para cada subtipo de accidente cerebrovascular tanto en sujetos masculinos como femeninos; y

la Figura 9 muestra los datos y el análisis de la curva ROC correspondiente, comparando respectivamente la regresión logística y los métodos de red neuronal para diseñar un algoritmo de clasificación para distinguir un HS de todos los tipos de accidentes cerebrovasculares.

**Descripción detallada de la invención**

30 La presente invención se refiere a los métodos y biochips basados en biomarcadores que se puede utilizar para ayudar a la discriminación entre los tres subtipos de accidentes cerebrovasculares: accidente cerebrovascular hemorrágico (HS), accidente cerebrovascular isquémico (IS) y ataque isquémico transitorio (TIA).

A menos que se indique lo contrario, todas la referencias en la presente memoria al término “accidente cerebrovascular” abarcan las tres formas de accidente cerebrovascular.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término “accidente cerebrovascular isquémico (IS) se refiere al tipo de accidente cerebrovascular que se produce cuando disminuye el suministro de sangre al cerebro, dando como resultado un daño cerebral. Un accidente cerebrovascular isquémico se produce cuando un vaso sanguíneo se bloquea, generalmente mediante un coágulo de sangre. Este coágulo se puede formar localmente en una placa aterosclerótica (accidente cerebrovascular trombótico) o alternativamente se puede producir debido a una partícula o residuo viajero que se originó en algún otro lugar en el torrente sanguíneo (accidente cerebrovascular embólico). El término “ataque isquémico transitorio (TIA)” se refiere a un “mini accidente cerebrovascular” que se produce cuando disminuye temporalmente el suministro de sangre al cerebro. Un TIA se diagnostica si los síntomas se resuelven rápidamente (dentro de las 24 horas con el individuo recuperando su salud normal). El término “accidente cerebrovascular hemorrágico (HS)” se produce cuando la sangre se acumula dentro de la bóveda del cráneo, generalmente cuando un vaso sanguíneo debilitado se rompe. El accidente cerebrovascular hemorrágico se puede clasificar en dos subtipos principales: intracerebral (dentro del tejido cerebral); y subaracnoideo (alrededor de la superficie del cerebro y bajo su capa protectora).

50 Las referencias en la presente memoria a “un paciente que ha sufrido o está sufriendo un accidente cerebrovascular” incluyen a un paciente al que se le ha diagnosticado un accidente cerebrovascular o que se le ha diagnosticado un accidente cerebrovascular previo. El accidente cerebrovascular puede haber sido un suceso reciente, habiendo iniciado dicho suceso el proceso del individuo que busca ayuda clínica.

Los términos “sujeto” y “paciente” se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria y se refieren a un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, perro, gato, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono y un humano). Preferiblemente el sujeto o paciente es un humano.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “biomarcador” se refiere a una molécula presente en una muestra biológica obtenida de un paciente, cuya concentración en dicha muestra puede ser indicativa de un estado patológico. Varios biomarcadores que los presentes inventores han encontrado útiles para diferenciar diferentes subtipos de accidentes cerebrovasculares, solos o en combinación con otros métodos de diagnóstico, o como biomarcadores complementarios en combinación con otros biomarcadores, se describen en la presente memoria. Como se utiliza en la presente memoria, el término “biomarcador complementario” se refiere a un biomarcador que se puede utilizar junto con otros biomarcadores de accidentes cerebrovasculares para apoyar el diagnóstico.

Se entiende bien en la técnica que las concentraciones de biomarcador normal o “histórico” pueden mostrar una ligera variación debido, por ejemplo, a la edad, el género o los genotipos étnicos/geográficos. Como resultado, el valor de corte utilizado en los métodos de la invención puede variar también ligeramente debido a la optimización dependiendo del paciente/población objetivo.

15 La muestra biológica obtenida de un paciente es preferiblemente una muestra de sangre, suero o plasma. Como se utiliza en la presente memoria, el término “*ex vivo*” tiene su significado habitual en la técnica y se refiere a una muestra que se ha extraído del cuerpo de un paciente.

20 Cuando se toma una muestra de sangre del paciente para su análisis, se analiza la sangre total, el suero o el plasma. El análisis de la muestra de sangre puede realizarse a través de varias metodologías analíticas tales como espectrometría de masas unida a una etapa de separación previa tal como cromatografía. La metodología preferida se basa en la inmunodetección. La tecnología de inmunodetección se incorpora también fácilmente en dispositivos portátiles o de mano para su uso fuera del entorno clínico. Se puede utilizar un inmunoensayo cuantitativo tal como una transferencia de Western o ELISA para detectar la cantidad de proteína. Un método de análisis preferido comprende utilizar un biochip multianálito que permite detectar y cuantificar varias proteínas simultáneamente. La electroforesis en gel 2D es también una técnica que se puede utilizar para el análisis de multianálitos.

25 Un primer aspecto de la invención proporciona un método para ayudar al diagnóstico diferencial del accidente cerebrovascular hemorrágico (HS), accidente cerebrovascular isquémico (IS) y el ataque isquémico transitorio (TIA) en un paciente que ha sufrido o está sufriendo un accidente cerebrovascular, que comprende: determinar la concentración de VCAM-1, GFAP y CRP en una muestra *ex vivo* obtenida de un paciente; y establecer la importancia de la concentración de los biomarcadores. Utilizando la regresión logística escalonada hacia atrás, los presentes inventores han encontrado que los biomarcadores GFAP, VCAM, CRP influyen significativamente en un modelo de predicción que puede discriminar entre TIA, IS y HS.

30 En realizaciones preferidas, el método comprende además: determinar la concentración de IL-6 y sTNFR1 en una muestra *ex vivo* obtenida del paciente; determinar el género del paciente; y establecer la importancia de la concentración de los cinco biomarcadores, en relación con el género del paciente.

35 Se ha encontrado que el género tiene una mayor influencia en los niveles de biomarcadores tanto en la homeostasis como en la enfermedad. Los presentes inventores han encontrado que los cinco biomarcadores GFAP, VCAM, CRP, IL-6 y sTNFR1, en combinación con el género, se pueden utilizar para desarrollar un algoritmo que pueda predecir con precisión la probabilidad de qué tipo de accidente cerebrovascular presenta el paciente para permitir el tratamiento correspondiente.

Además de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el método de la invención puede comprender además determinar la concentración de uno o de los biomarcadores ICAM-1, L-selectina, P-selectina, D-dímero y FABP y utilizar el valor de concentración en un algoritmo estadístico para distinguir entre diferentes subtipos de accidente cerebrovascular.

45 Preferiblemente, cada uno de los valores de concentración de los biomarcadores se introduce en un algoritmo o algoritmos estadísticos para producir un valor de salida que se correlaciona con un diagnóstico diferencial de HS, IS o TIA. En una realización, el método se utiliza para diagnosticar diferencialmente entre HS y IS/TIA.

50 La persona experta estará al tanto de numerosos métodos adecuados para desarrollar algoritmos estadísticos, y todos estos estarán dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de algoritmos de clasificación adecuados incluyen regresión logística multinomial, red neuronal de perceptrón multicapa (MLP), redes neuronales artificiales, máquinas de vectores de soporte y clasificadores de bosques aleatorios. Los presentes inventores han encontrado que tanto la regresión logística multinomial como la MPL logran un rendimiento similar en el contexto de la presente invención, sugiriendo la importancia de los análisis (es decir, biomarcadores) utilizados en los métodos de la invención, en lugar del método utilizado para generar el modelo de algoritmo. Sin embargo, en una realización preferida, el algoritmo estadístico incluye una ecuación de regresión logística.

55 La precisión de los métodos estadísticos utilizados según la presente invención se puede describir mejor por sus características operativas del receptor (ROC). La curva ROC aborda tanto la sensibilidad, el número de verdaderos

positivos, y la especificidad, el número de verdaderos negativos, del ensayo. Por lo tanto, los valores de sensibilidad y especificidad para una combinación dada de biomarcadores son una indicación de la precisión del ensayo. Por ejemplo, si una combinación de biomarcadores tiene unos valores de sensibilidad y especificidad del 80%, de cada 100 pacientes que tienen un accidente cerebrovascular, 80 se identificarán correctamente a partir de la determinación de la presencia de la combinación particular de biomarcadores como positiva para el accidente cerebrovascular, mientras que de cada 100 pacientes que no han sufrido un accidente cerebrovascular 80 darán un ensayo negativo de la enfermedad con precisión.

Si se van a utilizar dos o más biomarcadores en el método de diagnóstico, se puede derivar un modelo matemático adecuado, tal como una ecuación de regresión logística. La ecuación de regresión logística puede incluir otras variables tales como edad y género del paciente. La curva ROC se puede utilizar para evaluar la precisión del modelo de regresión logística. La ecuación de regresión logística se puede utilizar independientemente o en un algoritmo para ayudar a la toma de decisiones clínicas. Aunque una ecuación de regresión logística es un procedimiento matemático /estadístico común utilizado en dichos casos y se prefiere en el contexto de la presente invención, también se puede utilizar otros procedimientos matemáticos/estadísticos.

A modo de ejemplo, una ecuación de regresión logística aplicable a la presente invención (a un valor de corte de clasificación de 0,5) para la combinación de biomarcadores GFAP, CRP y VCAM para la indicación del tipo de accidente cerebrovascular en un paciente sospechoso de haber tenido o padecer actualmente un accidente cerebrovascular se calcula de la siguiente manera:

Probabilidad de IS

$$= \frac{e^{(-3.075-0.581[GFAP]+0.094[CRP]+0.05[VCAM])}}{1 + e^{(-3.075-0.581[GFAP]+0.094[CRP]+0.05[VCAM])} + e^{(-3.605+3.979[GFAP]-0.116[CRP]+0.04[VCAM])}}$$

donde [GFAP], [CRP] y [VCAM] son las concentraciones de GFAP, CRP y VCAM medidas en una muestra de sangre tomada de un paciente (véase el número 118 de la Tabla 1 para el valor AUC).

Preferiblemente, el método para ayudar al diagnóstico diferencial de HS, IS y TIA se lleva a cabo en un paciente que previamente se ha diagnosticado que sufre un accidente cerebrovascular, o que ha sufrido previamente un accidente cerebrovascular. El propósito del método de la invención es identificar que subtipo de accidente cerebrovascular está sufriendo o ha sufrido el paciente, para que se pueda administrar el tratamiento apropiado. Por lo tanto, en una realización, el método de la invención comprende una etapa adicional de administrar el tratamiento apropiado al paciente, una vez que se ha llevado a cabo un diagnóstico diferencial del subtipo de accidente cerebrovascular. Por ejemplo, si como resultado de llevar a cabo el método de la invención se determina que el paciente ha sufrido, o está sufriendo, un IS, se puede administrar un tratamiento apropiado tal como una terapia trombolítica (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno (TPA)) para acabar con los coágulos. Esto se puede administrar junto con otras terapias apropiadas, según lo determinado por un médico. Si como resultado de llevar a cabo el método de la invención se determina que el paciente ha sufrido, o está sufriendo, un TIA, se pueden prescribir y administrar anticoagulantes tales como la Warfarina y aspirina. Si como resultado de llevar a cabo el método de la invención se determina que el paciente ha sufrido, o está sufriendo, un HS entonces estos pacientes se mandarán típicamente a una unidad quirúrgica para reparar los vasos sanguíneos dañados.

Una etapa inicial para diagnosticar al paciente que sufre, o ha sufrido, un accidente cerebrovascular se puede llevar a cabo utilizando cualquier método o técnica de diagnóstico adecuada conocida en la técnica, incluyendo técnicas de exploración tales como CT y MRI, o ensayando la muestra de un paciente para biomarcadores de accidentes cerebrovasculares. Sin embargo, en una realización preferida, el paciente ha sido diagnosticado que sufre, o ha sufrido, un accidente cerebrovascular mediante la determinación de la concentración de al menos dos biomarcadores en una muestra *ex vivo* obtenida del paciente y el establecimiento de la importancia de la concentración de los biomarcadores al comparar el valor de la concentración para cada biomarcador con un valor de control correspondiente. Preferiblemente, los al menos dos biomarcadores se seleccionan de ICAM-1, L-selectina, P-selectina, VCAM-1, IL-6, sTNFR1, D-dímero y CRP, y preferiblemente al menos uno de los dos biomarcadores se selecciona de ICAM-1, L-selectina, P-selectina y VCAM-1. Según este método preferido de diagnóstico inicial de accidente cerebrovascular, cada uno de los valores de concentración de los biomarcadores del paciente y de control se introduce en un algoritmo o algoritmos estadísticos para producir un valor de salida que indica si ha ocurrido un accidente cerebrovascular. Las combinaciones de biomarcadores preferidas para esta realización de la invención son las enumeradas en la Tabla 1 y Tabla 2. Estas tablas proporcionan los datos de sensibilidad, especificidad y AUC para diferentes combinaciones de biomarcadores para el accidente cerebrovascular versus control.

Tabla 1

Biomarcador(s)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUC
----------------	------------------	-------------------	-----

ES 2 706 534 T3

1.	VCAM-1 + ICAM-1	80,6	75,0	0,831
2.	VCAM-1 + Psel	87,8	71,7	0,913
3.	VCAM-1 + Lsel	89,8	86,7	0,943
4.	VCAM-1 + IL-6	80,6	78,3	0,879
5.	VCAM-1 + CRP	78,6	75,0	0,826
6.	VCAM-1 + D-dímero	87,8	76,7	0,886
7.	VCAM-1 + NGAL	81,6	73,3	0,867
8.	VCAM-1 + sTNFR1	82,7	75,0	0,832
9.	IL-6 + sTNFR1	78,6	75,0	0,870
10.	ICAM-1 + Psel	92,9	76,7	0,932
11.	ICAM-1 + Lsel	90,8	90,0	0,954
12.	ICAM-1 + IL-6	83,7	83,3	0,897
13.	ICAM-1 + CRP	79,6	80,0	0,822
14.	ICAM-1 + D-dímero	86,7	76,7	0,905
15.	ICAM-1 + NGAL	81,6	73,3	0,836
16.	ICAM-1 + sTNFR1	77,6	73,3	0,832
17.	IL-6 + NGAL	87,8	81,7	0,909
18.	Psel + Lsel	88,8	65,0	0,867
19.	Psel + IL-6	90,8	78,3	0,937
20.	Psel + CRP	87,8	68,3	0,888
21.	Psel + D-dímero	90,8	85,0	0,931
22.	Psel + NGAL	86,7	58,3	0,838
23.	Psel + sTNFR1	86,7	65,0	0,885
24.	IL-6 + D-dímero	84,7	81,7	0,910
25.	Lsel + IL-6	84,7	85,0	0,907
26.	Lsel + CRP	86,7	71,7	0,863
27.	Lsel + D-dímero	88,8	80,0	0,894
28.	Lsel + NGAL	90,8	51,7	0,833
29.	Lsel + sTNFR1	84,7	61,7	0,862
30.	IL-6 + CRP	76,5	81,7	0,870
31.	IL-6 + NGAL + sTNFR1	89,8	81,7	0,942
32.	IL-6 + D-dímero + sTNFR1	85,7	80,0	0,908
33.	IL-6 + D-dímero + NGAL	92,9	83,3	0,943
34.	IL-6 + CRP + sTNFR1	75,5	78,3	0,872
35.	VCAM-1 + ICAM-1 + Psel	91,8	80,0	0,946

ES 2 706 534 T3

36. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel	93,9	93,3	0,975
37. VCAM-1 + ICAM-1 + IL-6	85,7	81,7	0,906
38. VCAM-1 + ICAM-1 + CRP	80,6	78,3	0,853
39. VCAM-1 + ICAM-1 + D-dímero	88,8	80,0	0,907
40. VCAM-1 + ICAM-1 + NGAL	85,7	80,0	0,895
41. VCAM-1 + ICAM-1 + sTNFR1	82,7	75,0	0,856
42. IL-6 + CRP + NGAL	85,7	80,0	0,915
43. VCAM-1 + Psel + Lsel	92,9	88,3	0,957
44. VCAM-1 + Psel + IL-6	90,8	76,7	0,962
45. VCAM-1 + Psel + CRP	87,8	78,3	0,930
46. VCAM-1 + Psel + D-dímero	89,8	83,3	0,955
47. VCAM-1 + Psel + NGAL	89,8	76,7	0,932
48. VCAM-1 + Psel + sTNFR1	88,8	76,7	0,923
49. IL-6 + CRP + D-dímero	81,6	80,0	0,911
50. VCAM-1 + Lsel + IL-6	89,8	90,0	0,957
51. VCAM-1 + Lsel + CRP	91,8	91,7	0,951
52. VCAM-1 + Lsel + D-dímero	89,8	85,0	0,946
53. VCAM-1 + Lsel + NGAL	92,9	83,3	0,962
54. VCAM-1 + Lsel + sTNFR1	83,3	87,8	0,947
55. Lsel + NGAL + sTNFR1	89,8	80,0	0,931
56. VCAM-1 + IL-6 + CRP	79,6	81,7	0,881
57. VCAM-1 + IL-6 + D-dímero	86,7	88,3	0,916
58. VCAM-1 + IL-6 + NGAL	91,8	86,7	0,941
59. VCAM-1 + IL-6 + sTNFR1	81,6	80,0	0,882
60. Lsel + D-dímero + sTNFR1	83,7	76,7	0,905
61. VCAM-1 + CRP + D-dímero	85,7	81,7	0,895
62. VCAM-1 + CRP + NGAL	87,8	81,7	0,911
63. VCAM-1 + CRP + sTNFR1	80,6	78,3	0,837
64. Lsel + D-dímero + NGAL	91,8	85,0	0,921
65. VCAM-1 + D-dímero + NGAL	90,8	96,7	0,938
66. VCAM-1 + D-dímero + sTNFR1	87,8	80,0	0,891
67. Lsel + CRP + sTNFR1	84,7	73,3	0,875
68. VCAM-1 + NGAL + sTNFR1	89,8	80,0	0,930
69. Lsel + CRP + D-dímero	86,7	76,7	0,908
70. Lsel + CRP + NGAL	86,7	73,3	0,882

ES 2 706 534 T3

71. ICAM-1 + Psel + Lsel	95,9	91,7	0,977
72. ICAM-1 + Psel + IL-6	93,9	91,7	0,979
73. ICAM-1 + Psel + CRP	92,9	83,3	0,949
74. ICAM-1 + Psel + D-dímero	93,9	88,3	0,969
75. ICAM-1 + Psel + NGAL	88,8	78,3	0,938
76. ICAM-1 + Psel + sTNFR1	91,8	81,7	0,946
77. Lsel + IL-6 + sTNFR1	84,7	81,7	0,911
78. ICAM-1 + Lsel + IL-6	92,9	90,0	0,975
79. ICAM-1 + Lsel + CRP	89,8	90,0	0,958
80. ICAM-1 + Lsel + D-dímero	90,8	88,3	0,964
81. ICAM-1 + Lsel + NGAL	91,8	86,7	0,963
82. ICAM-1 + Lsel + sTNFR1	91,8	88,3	0,965
83. Lsel + IL-6 + NGAL	90,8	83,3	0,920
84. ICAM-1 + IL-6 + CRP	83,7	83,3	0,896
85. ICAM-1 + IL-6 + D-dímero	87,8	85,0	0,931
86. ICAM-1 + IL-6 + NGAL	89,8	86,7	0,934
87. ICAM-1 + IL-6 + sTNFR1	84,7	80,0	0,903
88. Lsel + IL-6 + D-dímero	86,7	81,7	0,920
89. ICAM-1 + CRP + D-dímero	88,0	85,0	0,911
90. ICAM-1 + CRP + NGAL	85,7	76,7	0,882
91. ICAM-1 + CRP + sTNFR1	77,6	73,3	0,844
92. Lsel + IL-6+ CRP	87,8	81,7	0,914
93. ICAM-1 + D-dímero + NGAL	90,8	83,3	0,932
94. ICAM-1 + D-dímero + sTNFR1	87,8	80,0	0,909
95. Psel + NGAL + sTNFR1	89,8	76,7	0,930
97. ICAM-1 + NGAL + sTNFR1	87,8	83,3	0,920
98. Psel + D-dímero + sTNFR1	89,8	81,7	0,930
99. Psel + D-dímero + NGAL	91,8	86,7	0,947
100. Psel + Lsel + IL-6	89,8	78,3	0,943
101. Psel + Lsel + CRP	89,8	75,0	0,903
102. Psel + Lsel + D-dímero	90,8	83,3	0,936
103. Psel + Lsel + NGAL	88,8	70,0	0,873
104. Psel + Lsel + sTNFR1	90,8	71,7	0,914
105. Psel + CRP + sTNFR1	87,8	70,0	0,897
106. Psel + IL-6 + CRP	88,8	76,7	0,945

ES 2 706 534 T3

107. Psel + IL-6 + D-dímero	90,8	88,3	0,957
108. Psel + IL-6 + NGAL	92,9	88,3	0,953
109. Psel + IL-6 + sTNDRI	89,8	78,3	0,944
110. Psel + CRP + NGAL	86,7	75,0	0,907
111. Psel + CRP + D-dímero	91,8	85,0	0,946
112. VCAM-1 + IL-6 + NGAL + sTNFR1	91,8	90,0	0,961
113. VCAM-1 + D-dímero + NGAL + sTNFR1	89,8	88,3	0,959
114. ICAM-1 + Lsel + IL-6 + D-dímero	92,9	90,0	0,980
115. ICAM-1 + Lsel + IL-6 + NGAL	94,9	91,7	0,983
116. ICAM-1 + Lsel + IL-6 + sTNFR1	92,9	91,7	0,978
117. ICAM-1 + Lsel + D-dímero + NGAL	94,9	91,7	0,975
118. ICAM-1 + Lsel + D-dímero + sTNFR1	93,9	90,0	0,975
119. ICAM-1 + Lsel + NGAL + sTNFR1	96,9	95,0	0,978
120. ICAM-1 + IL-6 + D-dímero + NGAL	91,8	88,3	0,966
121. ICAM-1 + IL-6 + D-dímero + sTNFR1	86,7	86,7	0,932
122. ICAM-1 + IL-6 + NGAL + sTNFR1	92,9	85,0	0,967
123. ICAM-1 + D-dímero + NGAL + sTNFR1	91,8	85,0	0,959
124. Lsel + IL-6 + D-dímero + NGAL	92,9	88,3	0,948
125. Psel + Lsel + IL-6 + ICAM-1	95,9	95,0	0,995
126. Lsel + IL-6 + NGAL + sTNFR1	93,9	85,0	0,958
127. Lsel + D-dímero + NGAL + sTNFR1	90,8	86,7	0,946
128. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + IL-6	96,9	95,0	0,985
129. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + D-dímero	94,9	93,3	0,978
130. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + NGAL	96,9	93,3	0,984
131. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + sTNFR1	94,9	95,0	0,977
132. VCAM-1 + ICAM-1 + IL-6 + D-dímero	86,7	86,7	0,933
133. VCAM-1 + ICAM-1 + IL-6 + NGAL	91,8	83,3	0,954
134. Psel + Lsel + IL-6 + VCAM-1	93,9	86,7	0,972
135. VCAM-1 + ICAM-1 + D-dímero + NGAL	89,8	80,0	0,948
136. Psel + Lsel + IL-6 + D-dímero	89,8	88,3	0,959
137. VCAM-1 + ICAM-1 + NGAL + sTNFR1	85,7	81,7	0,944
138. VCAM-1 + Lsel + IL-6 + D-dímero	90,8	91,7	0,956
139. VCAM-1 + Lsel + IL-6 + NGAL	92,9	91,7	0,972
140. VCAM-1 + Lsel + IL-6 + sTNFR1	88,8	90,0	0,959
141. VCAM-1 + Lsel + D-dímero + NGAL	93,9	90,0	0,968

ES 2 706 534 T3

142.	VCAM-1 + Lsel + D-dímero + sTNFR1	92,9	88,3	0,949
143.	VCAM-1 + Lsel + NGAL + sTNFR1	91,8	90,0	0,970
144.	VCAM-1 + IL-6 + D-dímero + NGAL	92,9	88,3	0,971
145.	IL-6 + D-dímero + NGAL + sTNFR1	89,8	88,3	0,971
146.	Psel + Lsel + IL-6 + NGAL	93,9	85,0	0,953
147.	CRP + D-dímero + ICAM-1 + IL-6	87,8	85,0	0,932
148.	CRP + D-dímero + ICAM-1 + Lsel	91,8	91,7	0,966
149.	CRP + D-dímero + ICAM-1 + NGAL	87,8	83,3	0,939
150.	Psel + Lsel + ICAM-1 + D-dímero	98,0	93,3	0,989
151.	Psel + Lsel + ICAM-1 + CRP	95,9	90,0	0,980
152.	Psel + IL-6 + ICAM-1 + D-dímero	95,9	93,3	0,988
153.	CRP + D-dímero + IL-6 + NGAL	91,8	85,0	0,948
154.	CRP + Lsel + sTNFR1 + VCAM-1	87,8	90,0	0,952
155.	Psel + IL-6 + ICAM-1 + NGAL	94,9	90,0	0,983
156.	CRP + D-dímero + Lsel + NGAL	93,9	80,0	0,935
157.	CRP + Lsel + NGAL + sTNFR1	91,8	81,7	0,933
158.	CRP + D-dímero + Lsel + VCAM-1	88,3	91,8	0,950
159.	Lsel + Psel + VCAM-1 + ICAM-1	94,9	95,0	0,986
160.	CRP + D-dímero + NGAL + VCAM-1	90,8	85,0	0,950
161.	CRP + IL-6 + NGAL + VCAM-1	90,8	88,3	0,947
162.	CRP + ICAM-1 + IL-6 + Lsel	92,9	90,0	0,975
163.	CRP + ICAM-1 + IL-6 + NGAL	88,8	83,3	0,938
164.	CRP + IL-6 + NGAL + sTNFR1	89,8	80,0	0,947
165.	CRP + IL-6 + Lsel + VCAM-1	90,8	91,7	0,957
166.	CRP + ICAM-1 + Lsel + NGAL	94,9	88,3	0,970
167.	CRP + ICAM-1 + Lsel + sTNFR1	91,8	88,3	0,968
168.	CRP + ICAM-1 + Lsel + VCAM-1	93,9	95,0	0,976
169.	CRP + IL-6 + Lsel + NGAL	88,8	83,3	0,931
170.	CRP + NGAL + sTNFR1 + VCAM-1	87,8	85,0	0,934

[Lsel (L-selectina) Psel (P-selectina)]

Tabla 2

Biomarcadores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUC
1. VCAM1 + FABP	89,8	95,0	0,960
2. ICAM1 + FABP	92,9	93,3	0,964

ES 2 706 534 T3

3.	Psel + FABP	95,9	91,7	0,981
4.	Lsel + FABP	91,8	95,0	0,970
5.	VCAM1 + ICAM1 + FABP	92,9	93,3	0,965
6.	VCAM1 + Psel + FABP	95,9	91,7	0,983
7.	VCAM1 + Lsel + FABP	92,9	96,7	0,971
8.	VCAM1 + IL6 + FABP	90,8	95,0	0,961
9.	VCAM1 + CRP + FABP	89,8	95,0	0,960
10.	VCAM1 + D-dímero + FABP	90,8	95,0	0,963
11.	VCAM1 + NGAL + FABP	98,0	93,3	0,986
12.	VCAM1 + sTNFR1 + FABP	89,8	91,7	0,962
13.	ICAM1 + Psel + FABP	96,9	93,3	0,990
14.	ICAM1 + Lsel + FABP	96,9	93,3	0,993
15.	ICAM1 + IL6 + FABP	91,8	91,7	0,966
16.	ICAM1 + CRP + FABP	92,9	93,3	0,964
17.	ICAM1 + D-dímero + FABP	92,9	95,0	0,968
18.	ICAM1 + NGAL + FABP	96,9	95,0	0,984
19.	ICAM1 + sTNFR1 + FABP	91,8	93,3	0,966
20.	Psel + Lsel + FABP	95,9	93,3	0,985
21.	Psel + IL6 + FABP	93,9	93,3	0,985
22.	Psel + CRP + FABP	92,9	91,7	0,983
23.	Psel + D-dímero + FABP	93,9	93,3	0,984
24.	Psel + NGAL + FABP	96,9	96,7	0,993
25.	Psel + sTNFR1 + FABP	93,9	91,7	0,983
26.	Lsel + IL6 + FABP	90,8	93,3	0,975
27.	Lsel + CRP + FABP	91,8	93,3	0,970
28.	IL6 + CRP + FABP	91,8	96,7	0,962
29.	IL6 + D-dímero + FABP	89,8	93,3	0,963
30.	IL6 + NGAL + FABP	91,8	93,3	0,990
31.	IL6 + sTNFR1 + FABP	89,8	91,7	0,963
32.	Lsel + D-dímero + FABP	90,8	93,3	0,973
33.	Lsel + NGAL + FABP	95,9	93,3	0,989
34.	Lsel + sTNFR1 + FABP	92,9	93,3	0,972
35.	FABP + CRP + D-dímero	90,8	93,3	0,962
36.	FABP + CRP + NGAL	95,9	93,3	0,985
37.	FABP + CRP + sTNFR1	90,8	93,3	0,959

ES 2 706 534 T3

38. FABP + D-dímero + NGAL	95,9	93,3	0,985
39. FABP + D-dímero + sTNFR1	91,8	93,3	0,962
40. CRP + IL6 + FABP	89,8	93,3	0,962
41. D-dímero + IL6 + FABP	91,8	93,3	0,963
42. NGAL + IL6 + FABP	95,9	93,3	0,990
43. sTNFR1 + IL6 + FABP	89,8	91,7	0,963
44. IL6 + NGAL + FABP + D-dímero	96,9	93,3	0,990
45. Lsel + NAGL + FAPB + D-dímero	95,9	93,3	0,992
46. Lsel + NGAL + FABP + IL6	94,9	93,3	0,994
47. Psel + sTNFR1 + FABP + D-dímero	93,9	93,3	0,985
48. Psel + sTNFR1 + FABP + NGAL	96,9	96,7	0,994
49. Psel + IL6 + FABP + D-dímero	93,9	91,7	0,986
50. Psel + IL6 + FABP + NGAL	96,9	95,0	0,996
51. Psel + Lsel + FABP + D-dímero	95,9	93,3	0,987
52. Psel + Lsel + FABP + IL6	93,9	91,7	0,987
53. Psel + Lsel + FABP + NGAL	96,9	96,7	0,994
54. Psel + Lsel + FABP + CRP	94,9	93,3	0,985
55. ICAM1 + NGAL + FABP + IL6	95,9	93,3	0,991
56. ICAM1 + NGAL + FABP + D-dímero	96,9	95,0	0,986
57. ICAM1 + NGAL + FABP + CRP	96,9	95,0	0,986
58. ICAM1 + Lsel + FABP + IL6	95,9	95,0	0,994
59. ICAM1 + Lsel + FABP + NGAL	99,0	96,7	0,996
60. ICAM1 + Lsel + FABP + D-dímero	96,9	95,0	0,993
61. ICAM1 + Lsel + FABP + CRP	96,9	93,3	0,993
62. ICAM1 + Lsel + FABP + sTNFR1	96,9	93,3	0,993
63. ICAM1 + Psel + FABP + IL6	98,0	95,0	0,994
64. ICAM1 + Psel + FABP + NGAL	96,9	96,7	0,996
65. ICAM1 + Psel + FABP + D-dímero	96,9	93,3	0,991
66. ICAM1 + Psel + FABP + CRP	98,0	91,7	0,990
67. ICAM1 + Psel + FABP + sTNFR1	96,9	93,3	0,990
68. ICAM1 + Psel + Lsel + FABP	100,0	95,0	0,997
69. VCAM1 + NGAL + FABP + D-dímero	96,9	93,3	0,988
70. VCAM1 + ICAM1 + Lsel + FABP	99,0	95,0	0,993
71. VCAM1 + Lsel + FABP + D-dímero	92,9	95,0	0,971
72. VCAM1 + Lsel + FABP + NGAL	96,9	93,3	0,991

73. FABP + NGAL + sTNFR1	95,9	93,3	0,986
--------------------------	------	------	-------

[Lsel (L-selectina) Psel (P-selectina)]

5 En el método preferido para diagnosticar inicialmente el accidente cerebrovascular descrito anteriormente, los valores de control se pueden derivar de la concentración de biomarcadores correspondientes en una muestra biológica obtenida de un individuo o individuos que no han sufrido un accidente cerebrovascular. Dichos individuos que no han sufrido un accidente cerebrovascular pueden ser, por ejemplo, individuos sanos, individuos que padecen enfermedades distintas del accidente cerebrovascular. Alternativamente, los valores de control pueden corresponder a la concentración de cada uno de los biomarcadores en una muestra obtenida del paciente antes del suceso de accidente cerebrovascular.

10 Para evitar dudas, el término “biomarcadores correspondientes” significa que las concentraciones de la misma combinación de biomarcadores que se determinan con respecto a la muestra del paciente también se utilizan para determinar los valores de control. Por ejemplo, si se determina la concentración de ICAM-1 y L-selectina en la muestra del paciente, también se determinará la concentración de ICAM-1 y L-selectina en la muestra de control.

15 En una realización preferida, cada uno de los valores de concentración del biomarcador del paciente y/o control se introduce en uno o más algoritmos estadísticos para producir un valor de salida que indica si se ha producido un accidente cerebrovascular.

20 Las concentraciones o valores de corte se derivan utilizando una técnica estadística; hay varios métodos diferentes disponibles para desarrollar los algoritmos estadísticos y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un método estándar de análisis estadístico de los biomarcadores es utilizar métodos univariados para comparar los niveles de los biomarcadores en varios grupos y resaltar aquellos biomarcadores cuyas concentraciones difieren significativamente entre los grupos particulares.

25 Las concentraciones de biomarcadores se pueden determinar poniendo en contacto la muestra con un sustrato que tiene una sonda específica para cada uno de los biomarcadores incluidos en la combinación de biomarcadores. Las interacciones entre un biomarcador y su sonda respectiva se pueden monitorizar y cuantificar utilizando varias técnicas que son bien conocidas en la técnica. Las concentraciones de biomarcadores se miden preferiblemente en ng/ml.

30 El método de la presente invención se puede llevar a cabo utilizando un sustrato que comprende las sondas específicas para VCAM-1, GFAP y CRP. El sustrato es adecuado para su uso en el método de la invención para ayudar al diagnóstico diferencial de HS, IS y TIA. Preferiblemente, el sustrato comprende además sondas específicas para IL-6 y sTNFR1, y pueden comprender además opcionalmente sondas para uno cualquiera o más de los biomarcadores enumerados en las Tablas 1 y/o 2.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término “específico” significa que la sonda se une solo a uno de los biomarcadores de la invención, con una unión insignificante a otros biomarcadores de la invención o a otros analitos en la muestra biológica que se está analizando. Esto asegura que la integridad del ensayo y su resultado utilizando los biomarcadores de la invención no se vea comprometida por los sucesos de unión adicionales.

40 Preferiblemente las sondas se inmovilizan en la superficie del sustrato, preferiblemente se inmovilizan covalentemente. El sustrato puede ser cualquier sustancia capaz de soportar una o más sondas, pero es preferiblemente un dispositivo de estado sólido, tal como un biochip. Un biochip es un sustrato plano que puede estar, por ejemplo, basado en minerales o polímeros, pero es preferiblemente cerámico. Cuando se identifiquen los diversos biomarcadores/proteínas de la invención, será evidente para la persona experta que, además de identificar la proteína de longitud completa, es posible identificar un fragmento o varios fragmentos de una proteína, siempre que esto permita una identificación precisa de la proteína. De manera similar, aunque una sonda preferida útil en la invención es un anticuerpo policlonal o monoclonal, se pueden utilizar otras sondas tales como aptámeros, polímeros de impresión molecular, fagos, fragmentos de anticuerpos de cadena corta y otras sondas basadas en anticuerpos.

45 Preferiblemente, un dispositivo de estado sólido se utiliza en los métodos de la presente invención, preferiblemente el sistema Biochip Array Technology (BAT) (disponible en Randox Laboratories Limited). Más preferiblemente, el aparato Evidence Evolution y Evidence Investigator (disponible en Randox Laboratories) se puede utilizar para determinar los niveles de biomarcadores de la muestra.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia al siguiente ejemplo no limitativo.

**Ejemplo**

50 Grupo de pacientes

El estudio consistió en 98 pacientes con síntomas de accidente cerebrovascular ingresados en el Departamento de Emergencias del Hospital General KAT, Atenas, Grecia. Las muestras de sangre se tomaron en el momento del ingreso y en los días 1, 2, 3 y 7. El tiempo medio desde el inicio de los síntomas del accidente cerebrovascular y el

ingreso en el hospital fue de 3,2 horas. La edad media de los pacientes fue de 75,2 años (desviación estándar de 9,4). La evaluación del médico (utilizando los criterios resaltados en la sección de antecedentes) y las técnicas de neuroimagen identificaron 44 accidentes cerebrovasculares isquémicos (IS), 25 accidentes cerebrovasculares hemorrágicos (HS), 29 ataques isquémicos transitorios (TIA); 60 sujetos sanos sirvieron como controles (C).

5 Análisis de la muestra

10 Las siguientes proteínas se analizaron frente a muestras de plasma con EDTA de sangre obtenida de los pacientes del grupo de estudio: VCAM-1, GFAP, CRP, IL-6 y sTNFR1. Las proteínas se detectaron y cuantificaron utilizando biochips multiplexados que incorporan anticuerpos específicos de biomarcadores y el Evidence Investigator (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK). Los inmunoensayos simultáneos se realizaron según las instrucciones del fabricante. Se evaluaron una curva de calibración de nueve puntos y tres controles de referencia para cada biomarcador para permitir la validación de los resultados. Para el análisis de CRP IS versus TIA, las muestras se diluyeron diez veces.

Análisis estadístico

15 Los biomarcadores individuales se sometieron a un análisis de la curva ROC para evaluar la sensibilidad y la especificidad. Se utilizó la regresión logística para modelar la dependencia del accidente cerebrovascular y del subtipo del accidente cerebrovascular en función de la concentración de varias combinaciones de biomarcadores seguido por el análisis de la curva ROC para evaluar la precisión de la clasificación del modelo. Los resultados se muestran en las Figuras 1-3.

La relevancia del género en cada uno de los biomarcadores para determinar el subtipo de accidente cerebrovascular se muestra en las Figuras 4-8.

20 Resultados

Los datos mostrados en la Tabla 3 muestran el uso de los biomarcadores de la invención para distinguir un HS de IS/TIA. El análisis de la curva ROC para distinguir un HS de pacientes con IS y TIA utilizando los biomarcadores de la invención se muestra en la Fig. 3.

Tabla 3

Biomarcadores	AUC	Accidente cerebrovascular hemorrágico (HS)	
		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
GFAP	0,872	48	100
GFAP, IL-6 y VCAM-1	0,886	60	100
GFAP, CRP y VCAM-1	0,901	60	100
GFAP, CRP, VCAM-1, IL-6 (género) sTNFR1 (género)	0,914	72	100

25 Además, las Figuras 1-3 y la Tabla 4 muestran que el uso de una combinación de biomarcadores para clasificar a todos los pacientes con accidente cerebrovascular como pacientes con TIA, IS o HS, en este caso con utilizando la regresión logística multinomial, proporciona una mejor discriminación con respecto a cualquiera de los biomarcadores aislados.

Tabla 4

Variable	TIA				IS				HS			
	AUC	S.E.	Valor P	95% CI	AUC	S.E.	Valor P	95% CI	AUC	S.E.	Valor P	95% CI
VCAM1 (ng/ml)	0.224	0.051	0.000	0.125 0.324	0.652	0.056	0.011	0.543 0.761	0.594	0.064	0.165	0.469 0.718
GFAP (pg/ml)	0.367	0.059	0.043	0.252 0.481	0.318	0.055	0.002	0.211 0.425	0.875	0.052	0.000	0.774 0.976
IL-6 (ng/ml)	0.239	0.05	0.000	0.141 0.338	0.591	0.059	0.124	0.476 0.707	0.656	0.062	0.021	0.535 0.776
CRP (mg/l)	0.36	0.058	0.034	0.246 0.475	0.695	0.055	0.001	0.587 0.803	0.395	0.063	0.119	0.271 0.519
sTNFR1 (ng/ml)	0.336	0.064	0.013	0.211 0.461	0.629	0.057	0.030	0.518 0.74	0.506	0.07	0.933	0.368 0.643
Regresión logística GFAP, CRP, VCAM, IL-6 (género), sTNFR1 (género)	0.875	0.035	0.000	0.806 0.944	0.882	0.033	0.000	0.818 0.946	0.914	0.041	0.000	0.835 0.994

Además, los enfoques alternativos para diseñar algoritmos de categorización, tal como el uso de redes neuronales artificiales (véase Figura 9 y Tabla 5), muestran características de rendimiento similares.

Tabla 5

Área bajo la curva

Variable(s) de resultado del ensayo	Área	Error estándar <sup>a</sup>	Sig. Asintótica <sup>b</sup>	Intervalo de confianza asintótica del 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Regresión logística: GFAP, CRP, VCAM, IL-6 (género), sTNFR1 (género)	0,914	0,041	0,000	0,835	0,994
Red neuronal: GFAP, IL-6, CRP, VCAM, sTNFR1 y género	0,941	0,029	0,000	0,885	0,998

- 5 a. Bajo el supuesto no paramétrico  
 b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Esto ejemplifica aún más la naturaleza robusta al combinar los biomarcadores de interés en un algoritmo derivado por cualquier método conocido en la técnica.

Abreviaciones

- 10 GFAP-proteína gliofibrilar ácida  
 IL-6 – interleucina-6  
 ICAM-1 - molécula de adhesión intracelular-1  
 VCAM-1 - molécula de adhesión celular vascular-1  
 CRP – proteína reactiva C
- 15 FABP – proteína de unión a ácidos grasos  
 sTNFR1 – receptor 1 de TNF $\alpha$  soluble  
 L-selectina – molécula de adhesión celular de linfocitos (CD62L)  
 P-selectina – molécula de adhesión de células plaquetarias  
 D-dímero – producto de degradación de fibrina

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para ayudar al diagnóstico diferencial del accidente cerebrovascular hemorrágico, accidente cerebrovascular isquémico y ataque isquémico transitorio en un paciente que ha sufrido o está sufriendo un accidente cerebrovascular, que comprende
- 5 i) determinar la concentración de los biomarcadores VCAM-1, GFAP y CRP en una muestra *ex vivo* obtenida del paciente; y
- ii) establecer la importancia estadística de la concentración de los biomarcadores.
2. Un método según la reivindicación 1, que comprende además
- 10 iii) determinar la concentración de los biomarcadores IL-6 y sTNFR1 en una muestra *ex vivo* obtenida del paciente;
- iv) determinar el género del paciente; y
- v) establecer la importancia estadística de la concentración de los cinco biomarcadores, en relación con el género del paciente.
3. Un método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde cada uno de los valores de concentración de los biomarcadores se introduce en un algoritmo o algoritmos estadístico para producir un valor de salida que se correlaciona con un diagnóstico diferencial del accidente cerebrovascular hemorrágico, accidente cerebrovascular isquémico o ataque isquémico transitorio.
- 15 4. Un método según la reivindicación 3, en donde el método se utiliza para diagnosticar diferencialmente entre un accidente cerebrovascular hemorrágico y un accidente cerebrovascular isquémico/ataque isquémico transitorio.
- 20 5. Un método según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el algoritmo estadístico incluye una ecuación de regresión logística.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente ha sido diagnosticado que sufre de, o que ha sufrido de, un accidente cerebrovascular.
- 25 7. Un método según la reivindicación 6, en donde el paciente ha sido diagnosticado que sufre de, o ha sufrido de, un accidente cerebrovascular mediante la determinación de la concentración de al menos dos biomarcadores en una muestra *ex vivo* obtenida del paciente y el establecimiento de la importancia estadística de la concentración de los biomarcadores por comparación del valor de la concentración para cada biomarcador con un valor de control correspondiente, en donde al menos dos biomarcadores se seleccionan de ICAM-1, L-selectina, P-selectina, VCAM-1, IL-6, sTNFR1, D-dímero y CRP, y en donde al menos uno de los dos biomarcadores se selecciona de ICAM-1, L-selectina, P-selectina y VCAM-1, en donde cada uno de los valores de concentración del biomarcador del paciente y de control se introduce en un algoritmo o algoritmos estadísticos para producir un valor de salida que indica si ha ocurrido un accidente cerebrovascular.
- 30 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.

35

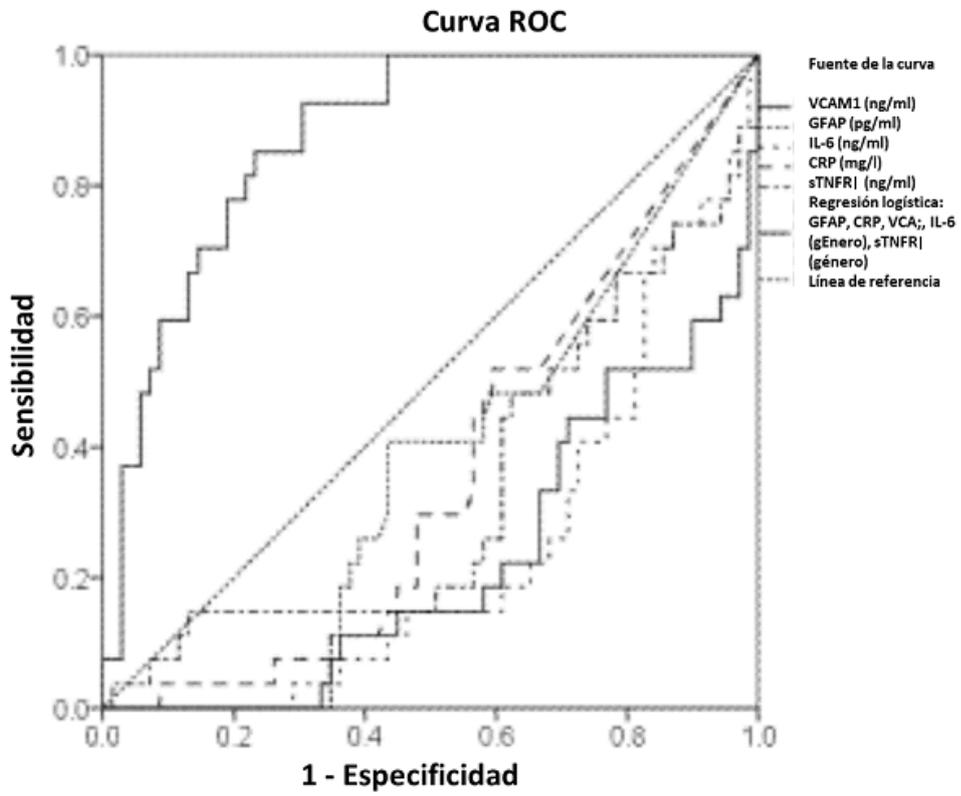


Figura 1

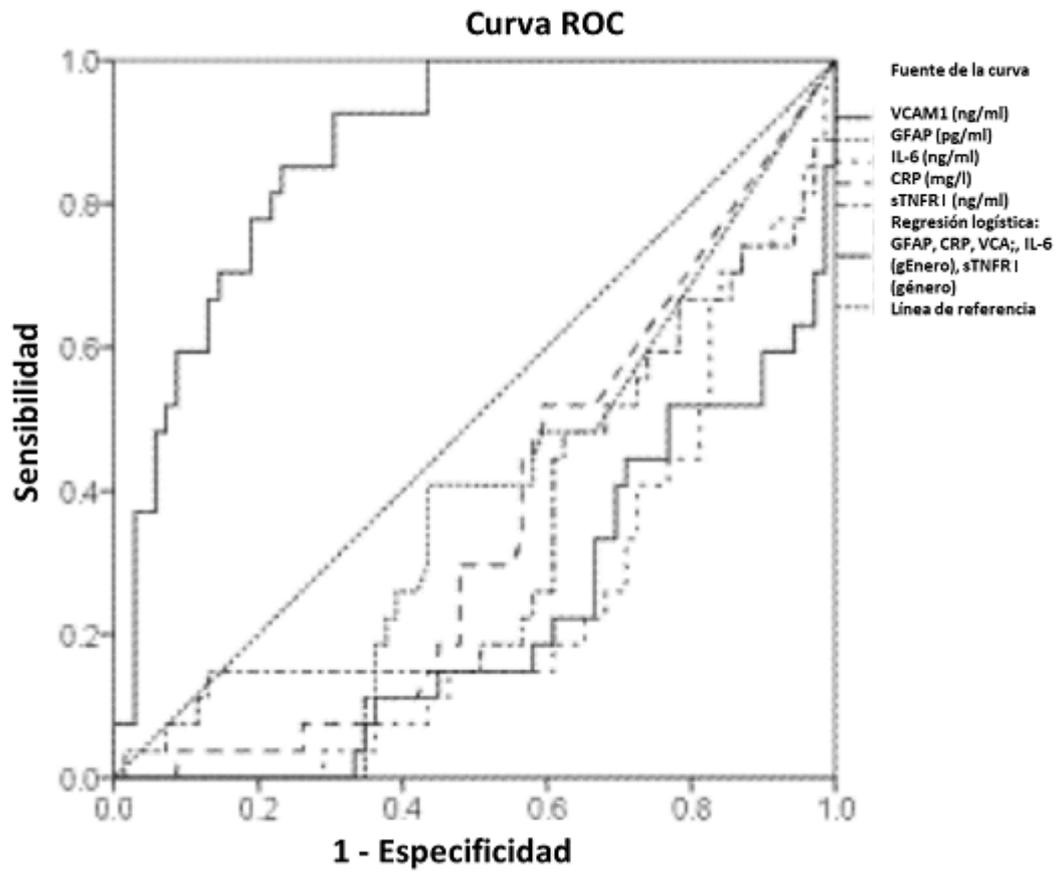
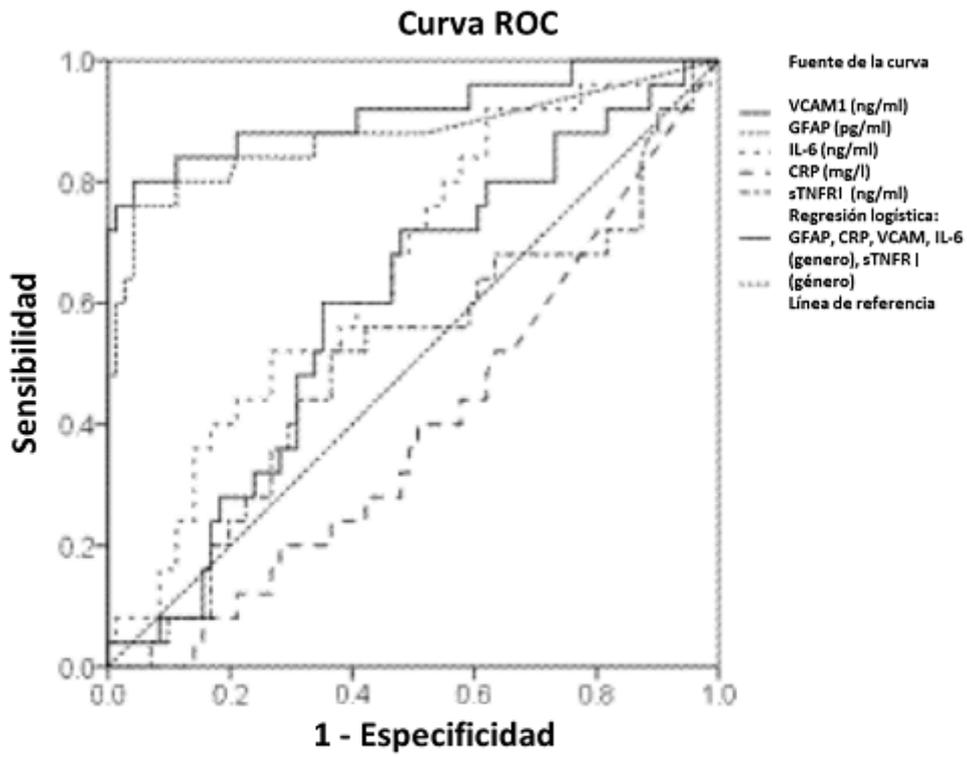


Figura 2



Los segmentos diagonales son producidos por lazos

Figura 3

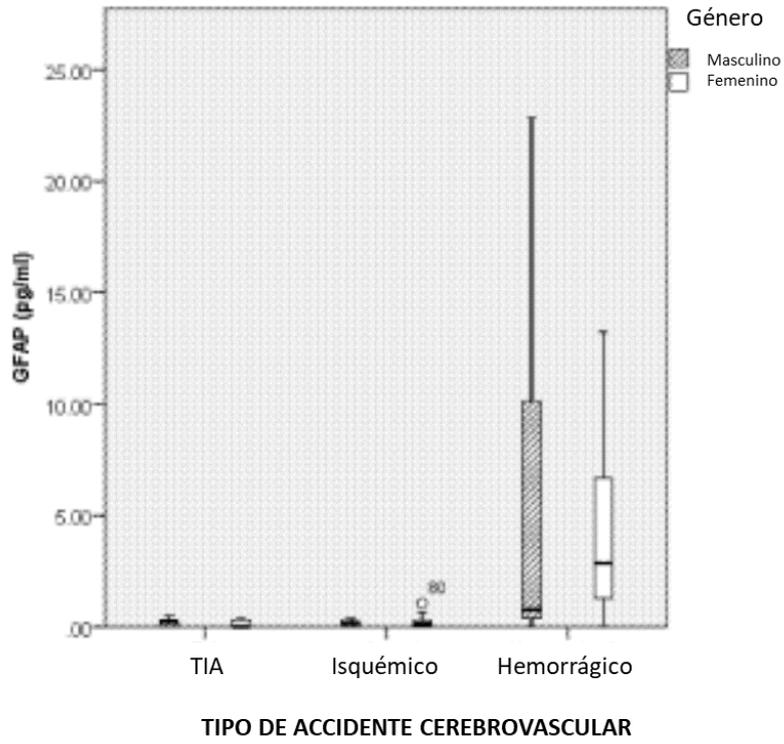


Figura 4

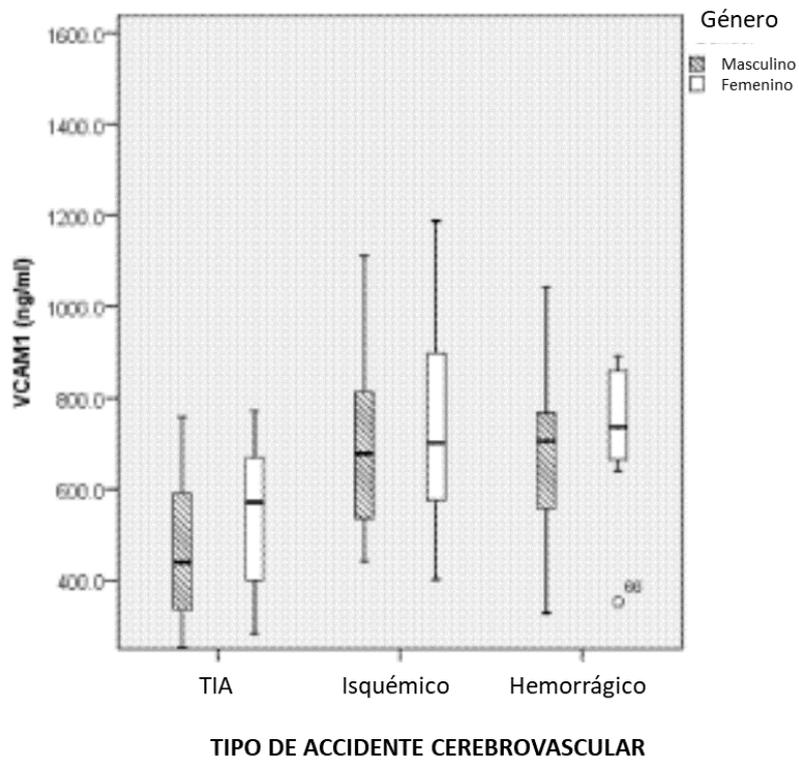


Figura 5

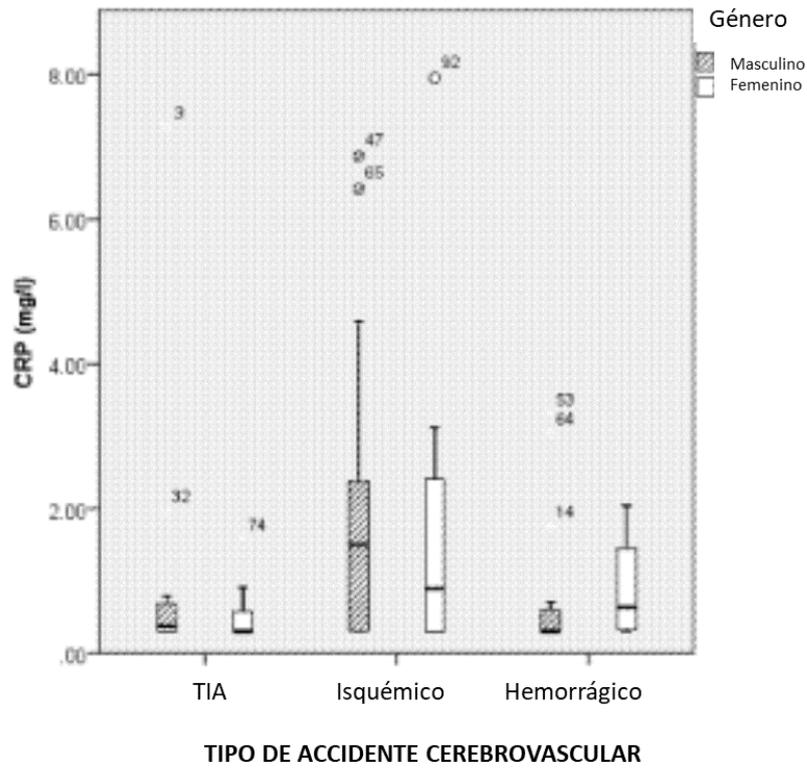


Figura 6

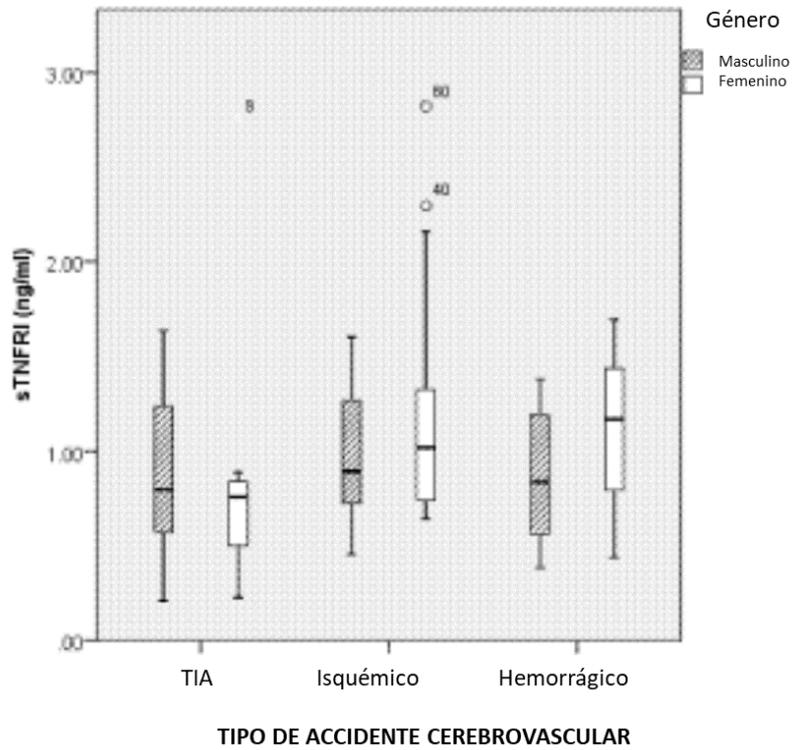


Figura 7

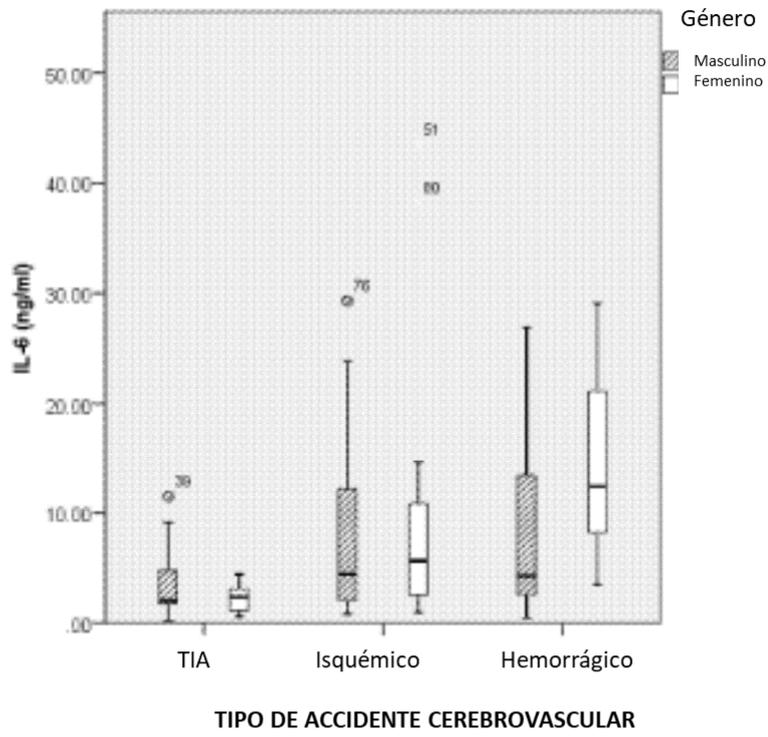


Figura 8

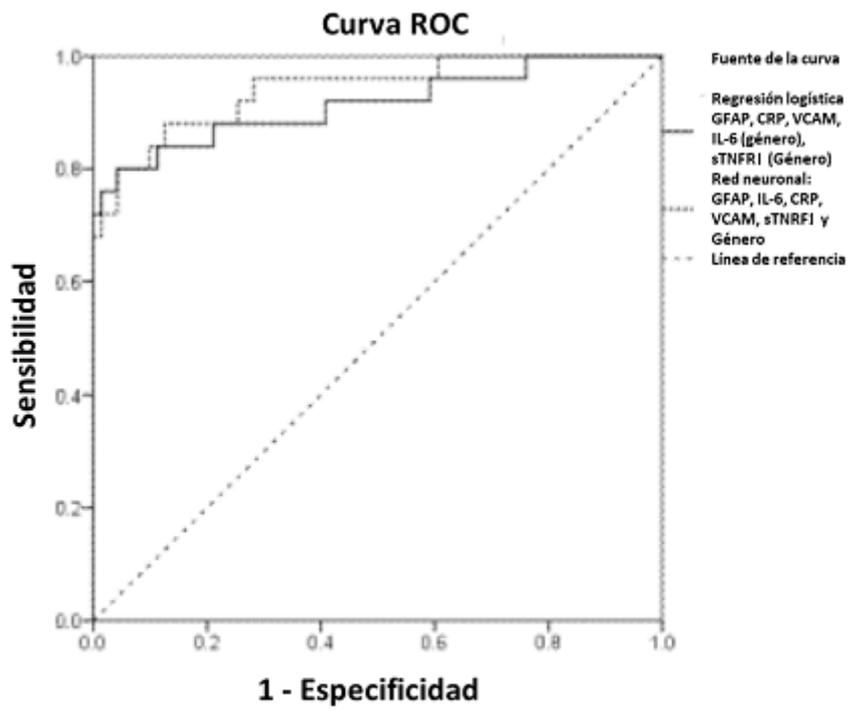


Figura 9