

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 796**

21 Número de solicitud: 201030794

51 Int. Cl.:

C12Q 1/52

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación: **26.05.2010**

43

Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2011**

Fecha de la concesión: **11.09.2012**

45

Fecha de anuncio de la concesión: **21.09.2012**

45

Fecha de publicación del folleto de la patente: **21.09.2012**

73

Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
EDIFICIO EMPRENDIA-CAMPUS SUR
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA, A Coruña, ES;
SERVIZO GALEGO DE SAUDE y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN.
DESARROLLO E INNOVACIÓN DEL COMPLEJO
HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
(IDICHUS)**

72

Inventor/es:

**CASTILLO SÁNCHEZ, JOSÉ;
SOBRINO MOREIRAS, TOMÁS;
RAMOS CABRER, PEDRO;
CAMPOS PEREZ, FRANCISCO;
AGULLA FREIRE, JESUS y
ARGIBAY GONZALEZ, BARBARA**

74

Agente/Representante:

TORRENTE VILASÁNCHEZ, SUSANA

54

Título: **PROCEDIMIENTO DE PRONÓSTICO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL.**

57

Resumen:

Procedimiento de pronóstico de la isquemia cerebral. La invención se basa en la observación de paciente y análisis de variables. Establece un nuevo marcador de pronóstico, la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT).

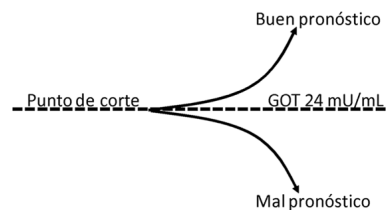


Figura 1

ES 2 370 796 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de pronóstico de la isquemia cerebral.

5 Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina para pronosticar el riesgo de isquemia cerebral.

10 Antecedentes

El ictus es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados que además puede generar una gran incapacidad, tanto por el grado de dependencia de los supervivientes como por afectar a muchas personas en edad laboral. Menos de la mitad de los pacientes que sufren infarto cerebral son capaces de retomar una vida normal (la prevalencia de recuperación incompleta es de 460/1000 supervivientes). Estos enfermos demandan cuidados que han de ser suplidos por su familia, lo que repercute en la calidad de vida del paciente y sus cuidadores, o por instituciones públicas y privadas, lo que conlleva una importante inversión económica.

El ictus tiene dos causas principales: la obstrucción trombótica de un vaso sanguíneo (ictus isquémico que da cuenta del 80% de los casos) y la hemorragia (ictus hemorrágico, por rotura de vasos, que da cuenta del 20% restante). Los síntomas del ictus (pérdida de fuerza en la mitad del cuerpo, dificultad para hablar o entender, pérdida parcial de la visión y vértigo, entre otros) aparecen de forma brusca. Sin embargo, ha de transcurrir un tiempo hasta que se produce la lesión cerebral por muerte neuronal. Este tiempo es la “ventana terapéutica”, en la que los neurólogos deben evitar la muerte neuronal en la parte del cerebro donde se produjo el infarto o la hemorragia.

El cerebro es un órgano con un alto contenido de glutamato, el más importante de los neurotransmisores excitatorios. El glutamato resulta de vital importancia para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, sin embargo, sus propiedades excitatorias lo convierten en una sustancia altamente deletérea para las neuronas en situaciones en las que su concentración alcanza niveles elevados ($< 200 \mu\text{M}$), y la isquemia cerebral es un claro ejemplo de este efecto. Durante un episodio de isquemia cerebral, se produce una alta liberación de glutamato en el medio extracelular del tejido cerebral, lo que desencadena una serie de eventos moleculares que conducen a la muerte neuronal. En consecuencia, debido al importante papel que juega el glutamato durante el episodio de isquemia, lo convierte en una buena diana para la búsqueda de nuevos agentes neuroprotectores para el ictus isquémico.

La escasa terapia existente para el tratamiento de esta enfermedad hace necesario desarrollar nuevas terapias que puedan ser aplicables al mayor número posible de pacientes, así como métodos de pronóstico que permitan intervenir o tratar con mayor eficacia al paciente tras la isquemia cerebral.

40 Descripción de la invención

La presente invención aporta un procedimiento pronóstico de isquemia cerebral basado en un nuevo marcador pronóstico.

La invención se basa en la observación de pacientes que presentaban un episodio de ictus isquémico con menos de 12 horas desde el comienzo de los síntomas. La invención demuestra que pacientes con concentraciones elevadas de la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) presentan buen pronóstico después de un episodio de isquemia cerebral; y al contrario, los pacientes con concentraciones bajas de GOT un mal pronóstico después de un episodio de isquemia cerebral, evolucionan peor.

Por lo tanto, la GOT es un factor relevante para pronosticar la evolución de un paciente con isquemia cerebral, y así la invención proporciona un procedimiento para su pronóstico estableciendo un punto de corte de los valores de GOT.

Una ventaja adicional de la invención es disponer de GOT como un marcador útil para determinar si un paciente tendrá un buen o mal pronóstico, ya que permitirá estratificar los pacientes de forma que aquellos pacientes con mal pronóstico serán candidatos a recibir terapias más agresivas que aquellos con buen pronóstico.

De este modo, la invención se dirige a un procedimiento para pronosticar la isquemia cerebral, que comprende

- i) medir en una muestra de un paciente la concentración de enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), y
- ii) comparar la concentración de GOT con el valor de punto de corte establecido,

de forma que cuando la concentración de GOT es superior o igual al valor del punto de corte, entonces el paciente presenta una predisposición favorable para un buen pronóstico, y cuando la concentración de GOT es inferior al valor del punto de corte el paciente presenta una predisposición favorable para un mal pronóstico.

En un aspecto particular, el valor del punto de corte establecido es de 24 mU/mL, con una sensibilidad de 91% y una especificidad del 83%, determinado mediante un análisis estadístico de los datos obtenidos por observación de pacientes (área de la curva ROC 0.802, IC95%: 0.748-0.856 (p>0.001)).

- 5 Niveles de GOT superiores o iguales a 24 mU/m, predicen buen pronóstico funcional, con una sensibilidad del 91% y especificidad del 83%.

En la presente invención se entiende por “buen pronóstico” una puntuación en la Escala de Rankin Modificada menor o igual a 2, a los 3 meses de evolución. Definiéndose la Escala de Rankin Modificada como la escala que evalúa la situación funcional del paciente. Esta escala va de 0-6, siendo 0 un paciente sin ninguna discapacidad funcional y 6 es indicativo de muerte. El punto de corte de menor o igual a 2 en esta Escala de Rankin nos indica que el paciente es independiente.

15 Niveles de GOT inferiores a 24 mU/m, predicen mal pronóstico funcional, con una sensibilidad del 91% y especificidad del 83%.

En la presente invención se entiende por “mal pronóstico” una puntuación en la Escala de Rankin Modificada superior a 2, a los 3 meses de evolución. Indica que el paciente vivirá sin independencia física con riesgo de muerte.

20 En otro aspecto particular, el paciente sufrió previamente un episodio de ictus isquémico. En un aspecto más particular, el paciente sufrió un episodio de ictus isquémico entre 2 y 4 meses antes. Más preferiblemente, el paciente sufrió un episodio de ictus isquémico tres meses antes.

25 Descripción detallada de la invención

Para la presente invención se entiende por “pronosticar” procedimientos mediante los cuales los expertos en la técnica pueden predecir el curso o resultado de una afección en un paciente.

30 Se entiende que “buen pronóstico” se refiere a un aumento en la probabilidad de que una afección evolucione de forma favorable permitiendo la recuperación del paciente. En este sentido, el valor de un marcador de buen pronóstico asociado a la patología de ictus isquémico permite determinar la probabilidad de que un paciente evolucione con buen o mal pronóstico.

35 En la invención se entiende por “muestra de un paciente” a una muestra obtenida de un mamífero con el propósito de diagnóstico o pronóstico o evaluación, en un procedimiento *in vitro*. En un aspecto particular, la muestra del paciente es una muestra de sangre o suero. En otro aspecto particular, el paciente es humano.

40 Para la presente invención se entiende por “terapias agresivas” aquellas que suponen un riesgo sobre el paciente sobre el que se aplique, pero que en el caso de los pacientes con mal pronóstico, la probabilidad de éxito en la aplicación de estas técnicas es mayor que si no se realizara. Son terapias agresivas, por ejemplo, la técnica de neurointervencionismo que consiste en una intervención quirúrgica en la que se introduce un catéter a través de la arteria femoral hasta llegar al lugar del trombo para eliminarlo, lo que supone un riesgo para el paciente por la complejidad de la técnica.

45 En la presente invención, se entiende por la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) aquella que está presente normalmente en las células del hígado y del corazón y se libera en la sangre cuando estos órganos están dañados, con variaciones significativas entre sujetos (Lin, J.D., *et al.*, Serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) levels in children and adolescents with intellectual disabilities. *Res Dev Disabil.* **31**(1): p. 172-7; Ladue, J.S., F. Wroblewski, and A. Karmen, Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science*, 1954. **120**(3117): p. 497-9); que fue aislada por primera vez de tejido cardíaco de cerdo en el año 1968 (Banks, B.E.C. and Vernon, C.A. Transamination. Part I. The isolation of the apoenzyme of glutamic-aspartic transaminase from pig heart muscle. *J. Chem. Soc. (Lond.)* (1961) 1698-1705) y sus propiedades bioquímicas se determinaron en años posteriores a partir de su aislamiento también de tejido muscular (Bertland, L.H. and Kaplan, N.O. Chicken heart soluble aspartate aminotransferase. Purification and properties. *Biochemistry* **7** (1968) 134-142. Henson, C.P. and Cleland, W.W. Kinetic studies of glutamic oxaloacetic transaminase isozymes. *Biochemistry* **3** (1964) 338-345. Jenkins, W.T., Yphantis, D.A. and Sizer, I.W. Glutamic aspartic transaminase. I. Assay, purification, and general properties. *J. Biol. Chem.* **234** (1959) 51-57). La GOT se clonó por primera vez a partir de *Escherichia coli* K-12, denominándose al gen codificante aspC, el cual presenta 1.188 residuos de nucleótidos y la proteína codificada 396 aminoácidos (Kuramitsu S, Okuno S, Ogawa T, Ogawa H, Kagamiyama H. Aspartate aminotransferase of *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the aspC gene. *J Biochem.* 1985 Apr; **97**(4): 1259-62).

65 Existen dos tipos de isoformas, la GOT1 de procedencias citosólica la cual deriva principalmente de eritrocitos y del tejido muscular cardíaco, y la isoforma GOT2, presenta principalmente en hígado, es por ello que esta enzima se utiliza como biomarcador de daño hepático o muscular.

La GOT metaboliza la reacción glutamato+oxalacetato \rightleftharpoons aspartato+alpha-cetoglutarato. El símbolo \rightleftharpoons significa que dicha reacción puede producirse en ambos sentidos, glutamato+oxalacetato \rightarrow aspartato+ α -cetoglutarato ó aspartato+ α -cetoglutarato \rightarrow glutamato+oxalacetato, dependiendo de la concentración de los sustratos, es por ello que esta enzima se le conozca también con el nombre de aspartato transaminasa o transferasa (AST). En situaciones de isquemia cerebral los niveles de glutamato en sangre alcanzan niveles muy superiores a los niveles normales, lo que hace que la reacción quede desplazada hacia la formación de aspartato+ α -cetoglutarato, produciendo la eliminación del glutamato.

Los siguientes ejemplos son útiles para ilustrar la invención y no deben de interpretarse como una limitación de la misma.

Ejemplos

15 *Estudio poblacional y características de los pacientes*

Entre los meses de febrero de 2009 y agosto del 2009, 155 pacientes con un episodio de ictus isquémicos con menos de 12 horas desde el comienzo de los síntomas fueron prospectivamente evaluados para determinar su posible inclusión en el estudio. Pacientes con ictus al despertar (n=16), pacientes con dependencia (n=7), pacientes con daño hepático (n=3), pacientes con daño renal (n=2), pacientes con enfermedades hematológicas (n=1), cáncer (n=3), y pacientes incluidos en algún estudio clínico (n=7) fueron excluidos. Además, 4 pacientes no aceptaron ser incluidos en el estudio y el seguimiento de 1 paciente se perdió durante el estudio. Por lo tanto, un total de 111 pacientes fueron finalmente incluidos en el análisis.

25 Todos los pacientes fueron prospectivamente evaluados usando tomografía computarizada craneal (CT) y escalas neurológicas y funcionales. El tamaño de la muestra analizada, fue calculada utilizando EPIDAT 3.1. El protocolo utilizado fue aprobado por el comité ético y el consentimiento informado y consentido fue dado por los pacientes y familiares.

30 *Variables clínicas*

Todos los pacientes fueron admitidos en la Unidad Aguda de Ictus y tratados por el mismo personal sanitario siguiendo la Guías de la Sociedad Española de Neurología para enfermedades cerebrovasculares (Comité *ad hoc* del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Prous Science. Barcelona 2004). La historia médica recogida incluía factores de riesgo vascular, test de coagulación, ECG, radiografía del tórax y ultrasonido carotideo, parámetros todos ellos recogidos en el momento de la admisión. La severidad de ictus fue evaluada por el médico neurólogo usando la escala NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale) en el momento de la admisión, al 1 día, y a los 3, 7 ± 1 y 90 ± 7 días después del episodio isquémico (Brott, T., *et al.*, Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. Stroke, 1989. **20**(7): p. 864-70). El tipo de ictus fue clasificado de acuerdo con el criterio TOAST (Adams, H.P., Jr., *et al.*, Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke, 1993. **24**(1): p. 35-41). El pronóstico funcional fue evaluado a los 3 meses usando la escala de ranking modificada (mRS) (Bessenyei, M., *et al.*, Characteristics of 4 stroke scales for the detection of changes in clinical signs in the acute phase of stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2001. **10**(2): p. 70-8; Lyden, P.D. and L. Hantson, Assessment scales for the evaluation of stroke patients. J Stroke Cerebrovasc Dis, 1998. **7**(2): p. 113-27).

50 *Estudios de neuroimagen*

Escaneos con CT fueron realizados en el ingreso y entre los días 4 y 7 de hospitalización. Los análisis de CT así como la determinación de los volúmenes de infarto fueron evaluados por un neurorradiólogo ciego al estudio y a los datos analizados.

55 *Variables del pronóstico*

La principal variable pronóstico fue la evaluación funcional a los 3 meses ($mRS \leq 2$). La correlación entre los niveles de GOT y el volumen de infarto fue considerada como variable secundaria del pronóstico.

Análisis de laboratorio

65 Las muestras de sangre de los pacientes fueron recogidas a las 24 y 72 horas y los niveles de glutamato y GOT fueron analizados sobre estas muestras en un laboratorio independiente, ciego al estudio y a los datos analizados, mediante un sistema automatizado de autoanálisis (ADVIA 2400, Bayer Diagnostics).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados en porcentaje como variables categóricas y como media (SD) o mediana [cuartil] para variables continuas dependiendo de su distribución normal o no. Las proporciones fueron comparadas usando un test de chi-cuadrado y el test de t-Student o el test de Mann-Whitney para variables continuas entre grupos. Análisis de Spearman o Pearson se utilizaron para correlaciones bivariadas.

En los estudios clínicos, la influencia de GOT y los niveles de glutamato sobre el pronóstico funcional se realizó mediante un análisis de regresión logístico, después de ajustar por la media de las variables relacionadas con el pronóstico en el análisis univariado ($p < 0.05$)

La influencia de la GOT y los niveles glutamato sobre el volumen de infarto fueron evaluados con un modelo lineal después de ajustar por las variables asociadas obtenidas de la comparación bivariada.

El test estadístico se realizó usando el programa SPSS 16.0 para Windows XP.

En el estudio, de los 111 pacientes analizados se observó que: (60.4% eran hombres, con edad media de 70.9 ± 11.2 años), una NIHSS media [cuartiles] en el ingreso de 11 [5, 16], y el tiempo medio desde comienzo de los síntomas de 3.9 ± 2.3 horas. En función del subtipo de ictus se obtuvieron aterotrombóticos (10.8%), cardioembólicos (37.8%), indeterminados (37.8%), y lacunares (13.6%).

Los niveles de glutamato en el momento de la admisión fueron significativamente mayores [$274.2 \pm 134.1 \mu\text{mol/L}$] que a la 24 horas [$133.6 \pm 64.0 \mu\text{mol/L}$] y que a las 72 horas [$109.0 \pm 59.3 \mu\text{mol/L}$] (todas las $p < 0.0001$). Sin diferencias entre las 24 y 72 horas. Los niveles de GOT se correlacionaron con los niveles de plasmáticos de glutamato al ingreso ($r = -0.435$, $p < 0.0001$), pero no a las 24 ($r = -0.204$, $p < 0.063$) y 72 horas ($r = -0.161$, $p = 0.161$).

Ejemplo 1

Efecto de los niveles de GOT y glutamato sobre el pronóstico funcional en pacientes isquémicos

La Tabla 1 muestra las principales características que afectan a los pacientes en función del buen y mal pronóstico. Se observa como niveles de altos de glutamato y bajos niveles de GOT afectan de forma significativa ($p < 0.0001$) al mal pronóstico funcional a los 3 meses.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Niveles de GOT y pronóstico funcional a los 3 meses

5 Análisis univariado del pronóstico funcional a los 3 meses

	Bueno n = 59	Malo n = 52	p
10 Edad (años)	66.9 ± 12.2	74.4 ± 7.8	0.001
Hombres (%)	74.1	44.2	0.002
15 Tiempo desde el inicio (horas)	3.6 ± 2.3	3.9 ± 2.4	0.734
Antecedente de hipertensión arterial (%)	51.7	65.4	0.177
Antecedente de diabetes (%)	24.1	21.2	0.821
20 Antecedente de dislipemia (%)	18.6	28.8	0.263
Antecedente de tabaquismo (%)	23.7	7.7	0.037
25 Antecedente de enolismo (%)	6.5	3.9	0.254
Antecedente de cardiopatía isquémica (%)	15.3	13.5	0.503
Antecedente de fibrilación auricular (%)	22.0	26.9	0.352
30 Tensión arterial sistólica al ingreso (mm Hg)	154.4 ± 22.7	145.2 ± 19.0	0.262
35 Tensión arterial diastólica al ingreso (mm Hg)	84.3 ± 13.2	77.2 ± 10.2	0.070
40 Temperatura axilar máxima en las primeras 24 h (°C)	36.6 ± 0.3	36.8 ± 0.5	0.038
Glucemia al ingreso (mg/dL)	125.5 ± 61.1	134.7 ± 35.7	0.126
45 Leucocitos al ingreso (x 10 ³ /mL)	8.2 ± 2.5	8.7 ± 2.6	0.526
Plaquetas al ingreso (x 10 ³ /mL)	227.7 ± 70.7	224.5 ± 66.3	0.571
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	397.9 ± 104.1	440.6 ± 144.8	0.071
50 NIHSS al ingreso	7 [4, 10]	15 [12, 18]	<0.0001
Tratamiento con rtPA intravenoso (%)	35.4	21.9	0.514
55 TOAST			0.03
Aterotrombótico (%)	11.9	9.6	
Cardioembólico (%)	27.1	50.0	
60 Lacunar (%)	23.7	1.9	
Indeterminado (%)	37.3	38.5	
Glutamato sérico al ingreso (μmol/L)	178.2 ± 79.2	381.3 ± 105.5	<0.0001
65 GOT (mU/mL)	17 [13,24]	11 [10, 14]	<0.0001

La Tabla 2, el Modelo 1 se muestra que en el análisis univariado los niveles de GOT a las 24 horas aparecen asociados de forma independiente con el mal pronóstico (OR, 0.81; CI 95%, 0.71 a 0.93, p = 0.003), después de ajustar por edad, genero, temperatura, ser fumador, gravedad y subtipo de ictus. Sin embargo la inclusión de glutamato en el análisis Tabla 2, Modelo 2, hace que la variable GOT deje de ser un valor independiente en relación con el pronóstico (OR, 1.02; CI 95%, 1.00 a 1.03, p = 0.001) (Tabla 2).

TABLA 2

Análisis multivariado (regresión logística múltiple) del pronóstico funcional a los 3 meses

Modelo 1

	OR	CI 95%	p
Edad	1.06	0.99 - 1.12	0.085
Hombre	0.51	0.14 - 1.77	0.287
Tabaquismo	0.89	0.14 - 5.80	0.907
Temperatura máxima 24 horas	2.19	0.51 - 9.47	0.229
NIHSS basal	1.29	1.14 - 1.44	<0.0001
Cardioembólico vs no cardioembólico	0.71	0.18 - 2.79	0.629
GOT	0.81	0.71 - 0.93	0.003

Modelo 2

	OR	CI 95%	p
Edad	1.07	0.98 - 1.15	0.106
Hombre	0.44	0.09 - 2.21	0.321
Tabaquismo	0.61	0.06 - 6.67	0.682
Temperatura máxima 24 horas	1.22	0.18 - 8.21	0.836
NIHSS basal	1.19	1.02 - 1.36	0.025
Cardioembólico vs no cardioembólico	1.95	0.33 - 11.59	0.463
GOT	0.91	0.79 - 1.05	0.199
Glutamato basal	1.02	1.00 - 1.03	0.001

Esto significa que la GOT resulta ser un buen marcador de pronóstico funcional. Resulta lógico que al incluir los niveles de glutamato en el análisis, la GOT deje de ser un buen indicador pronóstico, ya que la GOT, media a través de su efecto sobre el glutamato.

Ejemplo 2

Efecto de los niveles de GOT y glutamato sobre el volumen de infarto en pacientes isquémicos

5 Tabla 3. De igual modo a lo observado con el pronóstico funcional a los tres meses, en la tabla 3 se muestra que entre las principales variables que afectan de forma significativa ($p < 0.0001$) al volumen de infarto se encuentran los niveles de glutamato y niveles de GOT.

TABLA 3

10 *Niveles de GOT y volumen del infarto*

Análisis univariado del volumen del infarto

	p
Edad (años)	0.131
Hombres (%)	0.005
Tiempo desde el inicio (horas)	0.618
Antecedente de hipertensión arterial (%)	0.302
Antecedente de diabetes (%)	0.938
Antecedente de dislipemia (%)	0.909
Antecedente de tabaquismo (%)	0.002
Antecedente de enolismo (%)	<0.0001
Antecedente de cardiopatía isquémica (%)	0.655
Antecedente de fibrilación auricular (%)	0.273
Tensión arterial sistólica al ingreso (mm Hg)	0.468
Tensión arterial diastólica al ingreso (mm Hg)	0.795
Temperatura axilar máxima en las primeras 24 h (°C)	0.004
Glucemia al ingreso (mg/dL)	0.271
Leucocitos al ingreso ($\times 10^3/\text{mL}$)	0.154
Plaquetas al ingreso ($\times 10^3/\text{mL}$)	0.690
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	0.030
NIHSS al ingreso	<0.0001
Tratamiento con rtPA intravenoso (%)	0.277
Cardioembólico vs No-cardioembólico	0.001
Glutamato sérico al ingreso ($\mu\text{mol/L}$)	<0.0001
GOT (mU/mL)	<0.0001

65 En el análisis univariado (Tabla 4, modelo 1), los niveles de GOT al ingreso se asociaron de forma independiente con el volumen de infarto (B, -0.98; CI 95%, -1.71 a -0.24, $p = 0.010$), ajustado por género, temperatura, hábitos de fumar, consumo de alcohol, severidad del ictus, niveles de fibrinógeno y subtipo de ictus (cardioembólicos VS no cardioembólicos). La inclusión del glutamato en el modelos univariado (Tabla 4, modelo 2), hizo que el GOT dejara de ser una variable independiente (B, 0.10; CI 95%, 0.05 a 0.16, $p = 0.001$) (Tabla 4).

TABLA 4

Análisis multivariado (regresión lineal múltiple) del volumen del infarto

Modelo 1

	B	CI 95%	p
Sexo	0.97	-13.01 a 14.95	0.891
Antecedente de tabaquismo	-14.20	-37.66 a 9.26	0.232
Antecedente de enolismo	1.80	-14.36 a 17.97	0.825
Temperatura máxima 24 horas	13.85	-1.32 a 29.02	0.073
Fibrinógeno	0.03	-0.02 a 0.07	0.249
NIHSS al ingreso	2.33	1.16 a 3.49	<0.0001
Cardioembólico vs No-cardioembólico	-1.73	-15.52 a 12.05	0.803
GOT	-0.98	-1.71 a -0.24	0.010

Análisis multivariado (regresión lineal múltiple) del volumen del infarto

Modelo 2

	B	CI 95%	p
Sexo	-1.64	-15.43 a 12.14	0.813
Antecedente de tabaquismo	-12.93	-35.77 a 9.91	0.263
Antecedente de enolismo	0.97	-14.67 a 16.61	0.902
Temperatura máxima 24 horas	10.34	-4.59 a 25.28	0.172
Fibrinógeno	0.05	-0.00 a 0.09	0.075
NIHSS al ingreso	1.36	0.09 a 2.63	0.030
Cardioembólico vs No-cardioembólico	-6.19	-20.20 a 7.81	0.381
GOT	-0.39	-1.17 a 0.39	0.325
Glutamato basal	0.10	0.05 a 0.16	0.001

De igual modo a la conclusión obtenida con el pronóstico funcional, estos resultados indican que la GOT resulta ser un buen marcador del volumen de infarto, es decir a menores niveles de GOT mayor será el volumen de infarto y en consecuencia la gravedad de la lesión cerebral. Resulta igualmente lógico que al incluir los niveles de glutamato en el análisis, la GOT deje de ser un buen indicador pronóstico, ya que la GOT, media a través del glutamato en su efecto sobre el volumen de infarto.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para pronosticar la isquemia cerebral, que comprende

- 5
- i) medir en una muestra de un paciente la concentración de enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), y
 - ii) comparar la concentración de GOT con el valor de punto de corte establecido,

10 de forma que cuando la concentración de GOT es superior o igual al valor del punto de corte, entonces el paciente presenta una predisposición favorable para un buen pronóstico, y cuando la concentración de GOT es inferior al valor del punto de corte el paciente presenta una predisposición favorable para un mal pronóstico.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el punto de corte es 24 mU/mL.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, donde la muestra es de sangre o suero.

20 4. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, donde el paciente es humano.

5. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, donde el paciente sufrió previamente un episodio de ictus isquémico.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

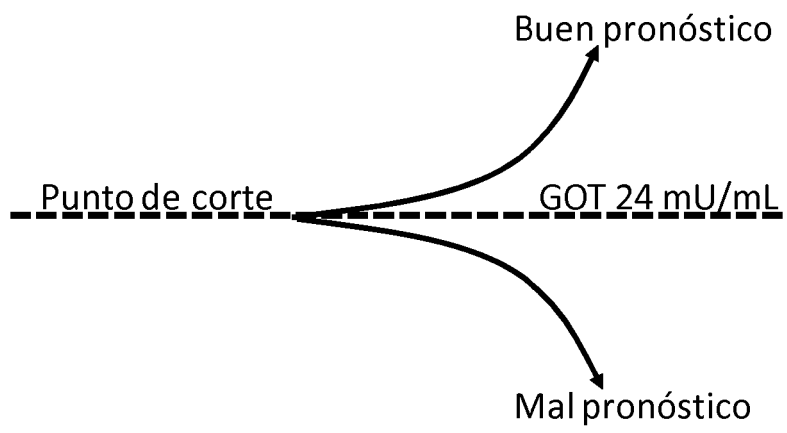


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030794

②² Fecha de presentación de la solicitud: 26.05.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/52** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZLOTNIK, A., GUREVICH, B., TKACHOV, S. et al. Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. <i>Experimental neurology</i> . Enero de 2007. Vol 203, Nº 1, páginas 213-220. ISSN 0014-4886.	1-5
A	GOTTLIEB, M.; WANG, Y., TEICHBERG, V. Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. <i>Journal of Neurochemistry</i> . Octubre de 2003. Vol 87, Nº 1, páginas 119-126. ISSN 0022-3042.	1-5
A	CASTILLO, J.; DAVALOS, A.; NAVEIRO, J., et al. Neuroexcitatory Amino Acids and Their Relation to Infarct Size and Neurological Deficit in Ischemic S troke. <i>Stroke</i> . Junio de 1996. Vol 27, Nº 6, páginas 1060-1065. ISSN 0039-2499.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.10.2011

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT, MEDLINE, NPL, BIOSIS, EMBASE, GOOGLE ACADEMICO

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZLOTNIK, A., GUREVICH, B., TKACHOV, S. et al. Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. Experimental neurology. Enero de 2007. Vol 203, Nº 1, páginas 213-220. ISSN 0014-4886.	Ene-2007
D02	GOTTLIEB, M.; WANG, Y., TEICHBERG, V. Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. Journal of Neurochemistry. Octubre de 2003. Vol 87, Nº 1, páginas 119-126. ISSN 0022-3042.	Oct-2003
D03	CASTILLO, J.; DAVALOS, A.; NAVEIRO, J., et al. Neuroexcitatory Amino Acids and Their Relation to Infarct Size and Neurological Deficit in Ischemic Stroke. Stroke. Junio de 1996. Vol 27, Nº 6, páginas 1060-1065. ISSN 0039-2499.	Jun-1996

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un procedimiento para pronosticar la isquemia cerebral que comprende medir en una muestra de un paciente la concentración de la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y comparar el valor de la concentración con un punto de corte establecido, de tal forma que si la concentración de dicha enzima es superior o igual al punto de corte, el paciente presenta una predisposición favorable para un buen pronóstico y viceversa (Reivindicación 1). Concretamente el punto de corte es 24 mU/mL (Reivindicación 2).

El documento D01 divulga un estudio que se lleva a cabo en ratas, cuyo objetivo es analizar si la eliminación del glutamato de la sangre mediada por oxalacetato (co-sustrato de la enzima GOT), presenta un efecto neuroprotector en condiciones patológicas que se caracterizan por un exceso de glutamato en el cerebro. Se observa que el tratamiento con oxalacetato (1 mmol/100 g peso), implica mejoras significativas en el status neurológico y conlleva una disminución del 40% del glutamato en sangre. También se observa que la administración de oxalacetato a dosis bajas (0.005mmol/100 g) sin efecto terapéutico, presenta efecto neuroprotector cuando se administra junto con la enzima recombinante GOT (0.14 nmol/100g), observándose una recuperación neurológica prácticamente completa. Se concluye, que el oxalacetato tiene efecto neuroprotector y se señala que su efecto terapéutico se debe principalmente a su implicación en la eliminación de glutamato de la sangre, a través de la enzima GOT.

El documento D02 divulga un estudio en el que se analiza si la disminución de los niveles de glutamato en sangre aumenta la capacidad del cerebro para eliminar glutamato del fluido cerebroespinal. Para ello se fuerza la eliminación de glutamato de la sangre administrando los co-sustratos de las enzimas plasmáticas GOT y GPT, oxalacetato y piruvato respectivamente. Se concluye que los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro pueden ser controlados en parte, por los niveles de glutamato en sangre, y se señala la posibilidad de utilizar los co-sustratos de las enzimas plasmáticas GOT y GPT con fines terapéuticos en condiciones patológicas caracterizadas por una acumulación de glutamato en el cerebro.

El documento D03 divulga un estudio en pacientes que han sufrido un infarto cerebral, cuyo objetivo es examinar los niveles de los aminoácidos excitatorios, entre los que se encuentra el glutamato, durante la fase aguda del infarto cerebral y su relación con el tamaño del infarto y el déficit neurológico. Se observa que existe una acumulación de glutamato durante la fase aguda del infarto cerebral y que existe una buena correlación entre los niveles de glutamato en cerebro y sangre. Así mismo, se concluye que niveles elevados de glutamato en sangre se asocian a una mayor severidad en el déficit neurológico.

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art 6 y 8 Ley 11/1986).

Los documentos D01 y D02 se consideran los documentos del estado de la técnica más próximos a la invención.

En estos documentos se anticipa el hecho de que la eliminación del glutamato de la sangre presenta efectos neuroprotectores (D01 y D02), y que esta eliminación del glutamato es llevada a cabo, al menos en parte, por la enzima GOT.

No obstante, estos efectos neuroprotectores, se observan cuando los sujetos son tratados, bien con oxalacetato o con oxalacetato combinado con un aporte exógeno de la propia enzima GOT, lo que supone un aumento en 30 veces su concentración basal.

Sobre la base de lo divulgado en estos documentos, no resulta obvio, que si existen diferencias de concentración de la enzima entre los sujetos tras sufrir la lesión cerebral, estas diferencias sean suficientes como para explicar o establecer una relación con el buen o mal pronóstico del paciente.

En conclusión, se considera que el procedimiento de pronóstico de la isquemia cerebral objeto de las reivindicaciones 1-5, es nuevo e implica actividad inventiva, en el sentido del artículo 6 y 8 de la Ley de patentes 11/86.