

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 403**

21 Número de solicitud: 202130180

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.03.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**14.09.2022**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA  
PAZ (FIBHULP) (90.0%)**  
Paseo de la Castellana nº 261, Edificio Norte, 4ª  
planta  
28046 Madrid (Madrid) ES y  
**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA EN RED (10.0%)**

72 Inventor/es:

**CUBILLOS ZAPATA, Carolina;**  
**GARCÍA RÍO, Francisco;**  
**QUINTANA DIEZ, Manuel;**  
**NANWANI, Kapil Laxman y**  
**DÍAZ GARCÍA, Elena**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Biomarcadores para el pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH)**

57 Resumen:

Biomarcadores para el pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH).

La presente invención describe una serie de biomarcadores que permiten predecir de manera temprana el riesgo de que un paciente que ha sufrido SAH desarrolle una cardiomiopatía de tako-tsubo (TTC) de modo que se permita anticipar una estrategia terapéutica que evite o mitigue los efectos de dicha cardiomiopatía. La invención está dirigida también a un método ex vivo para predecir el riesgo de desarrollar TTC en pacientes que han sufrido SAH, así como a un kit para el pronóstico de pacientes que han sufrido SAH.

ES 2 922 403 A1

## DESCRIPCIÓN

Biomarcadores para el pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH)

5

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al campo del pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH). Más particularmente, la presente invención describe una serie de biomarcadores que permiten predecir de manera temprana el riesgo de que un paciente que ha sufrido SAH desarrolle una cardiomiopatía de tako-tsubo (TTC) de modo que se permita anticipar una estrategia terapéutica que evite o mitigue los efectos de dicha cardiomiopatía.

15 Asimismo, la invención está dirigida a un método ex vivo para predecir el riesgo de desarrollar TTC en pacientes que han sufrido SAH, así como a un kit para el pronóstico de pacientes que han sufrido SAH. La invención también incluye unos cebadores para la amplificación PCR del producto de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ .

### 20 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH, por sus siglas en inglés) representa una grave emergencia médica con alta mortalidad y morbilidad debido al temprano resangrado. La incidencia en la población es aproximadamente 10/100.000 personas por año [**Wardlaw JM et al. The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. Brain : a journal of neurology. 2000;123 (Pt 2):205-221**]. Aproximadamente el 11% de estos pacientes mueren antes de recibir atención médica y un 40% muere dentro de las 4 semanas posteriores al ingreso hospitalario [**Hijdra A. et al. H. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Complications and outcome in a hospital population. Stroke. 1987;18:1061-1067**]. Además, se estima que el 30% de los pacientes que sobreviven tendrán una limitación considerable para actividades de la vida diaria [**Wardlaw JM et al. The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. Brain : a journal of neurology. 2000;123 ( Pt 2):205-221**]. En esta línea, otros autores sugieren que el 50% de los sobrevivientes desarrollan disfunciones cognitivas [**Kreiter KT, et al . Predictors of cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage. Stroke. 2002;33:200-208**].

35

Los pacientes que han sufrido SAH suelen sufrir complicaciones cardiacas que se asocian con un mayor riesgo de muerte a corto plazo [**Norberg E, et al. *Impact of acute cardiac complications after subarachnoid hemorrhage on long-term mortality and cardiovascular events. Neurocritical care. 2018;29:404-412***]. En particular, la cardiomiopatía de TTC es la principal cardio-disfunción [**Finsterer J, et al. *Cns-disease affecting the heart: Brain-heart disorders. Journal of the neurological sciences. 2014;345:8-14***]. En efecto, TTC es una disfunción cardiaca tras un daño neurológico que se clasifica como miocardiopatía de estrés (síndrome de tako-tsubo con una afectación predominantemente apical) o miocardio neurogénicamente aturdido (afectación predominantemente basal, como un tako-tsubo invertido) [**Krishnamoorthy V, et al. *Cardiac dysfunction after neurologic injury: What do we know and where are we going? Chest. 2016;149:1325-1331***]. La prevalencia de TTC en pacientes que han sufrido SAH oscila entre el 20% a 30%, con mayor prevalencia en mujeres [**Krishnamoorthy V, et al. *Cardiac dysfunction after neurologic injury: What do we know and where are we going? Chest. 2016;149:1325-1331***; **Al-Mufti F, et al. *Novel management strategies for medically-refractory vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neurol Sci. 2018;390:44-51***; **Gianni M, et al. *Apical ballooning syndrome or takotsubo cardiomyopathy: A systematic review. European heart journal. 2006;27:1523-1529***]. Es por ello que, en pacientes con SAH, se recomienda la realización de ecografía cardiaca en la práctica clínica [**Kilbourn KJ, et al. *Clinical outcomes after neurogenic stress induced cardiomyopathy in aneurysmal sub-arachnoid hemorrhage: A prospective cohort study. Clin Neurol Neurosurg. 2015;128:4-9***]. Además, estos pacientes presentan un alto riesgo de daño neurológico tardío (DNT) [**Al-Mufti F, et al. *Novel management strategies for medically-refractory vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neurol Sci. 2018;390:44-51***], niveles elevados de troponinas, péptido natriurético cerebral (BNP / NT-Pro-BNP) y creatincinasa, presencia de taquicardia, descenso del segmento ST, alteraciones de la onda T y alteraciones de la contractilidad se asocian de manera significativa a mayor mortalidad y peor evolución clínica [**Krishnamoorthy V, et al. *Cardiac dysfunction after neurologic injury: What do we know and where are we going? Chest. 2016;149:1325-1331***; **Kilbourn KJ, et al. *Clinical outcomes after neurogenic stress induced cardiomyopathy in aneurysmal sub-arachnoid hemorrhage: A prospective cohort study. Clin Neurol Neurosurg. 2015;128:4-9***; **Vivancos J. et al. *J. Clinical management guidelines for subarachnoid haemorrhage. Diagnosis and treatment. Neurologia. 2014;29:353-370***; **Chadha S, et al. *Troponins in tako-tsubo cardiomyopathy. Heart Lung Circ. 2013;22:775-777***; **Mahadavan G, et al. *Brain natriuretic peptide: A biomarker for all cardiac disease? Curr Opin Cardiol. 2014;29:160-166***]. De manera

interesante, se ha descrito que el biomarcador ST2 plasmático (un receptor de la familia de la interleuquina IL-1) se asocia con un peor pronóstico en pacientes con miocardiopatía de tako-tsubo [Vriz O, et al. *St2 marker might help to stratify in-hospital high risk patients with tako-tsubo cardiomyopathy. Eur J Intern Med. 2015;26:144-145*]. En esta línea, se ha reportado que la inflamación puede tener un papel relevante ya que hay un exceso de catecolaminas neurogénicamente, sin embargo, se desconoce el mecanismo [Krishnamoorthy V, et al. *Cardiac dysfunction after neurologic injury: What do we know and where are we going? Chest. 2016;149:1325-1331; Champion S, et al. Stress (tako-tsubo) cardiomyopathy in critically-ill patients. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 2015;4:189-196*].

Se han encontrado evidencias sólidas de que el inflamasoma podría ser un modulador que desencadena el inicio de la cascada inflamatoria en pacientes con trastornos inflamatorios crónicos [Youm YH, et al. *Canonical nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. Cell metabolism. 2013;18:519-532*]. En concreto, NLRP3 (receptor 3 similar al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) controla la respuesta del inflamasoma relacionada con las vías de inflamación "estériles". En particular NLRP3 es el sensor que reconoce los DAMPS (patrones moleculares asociados a daño celular) capaz de activar la respuesta inflamatoria del inflamasoma [Latz E, et al. *Activation and regulation of the inflammasomes. Nature reviews. Immunology. 2013;13:397-411*]. Este sensor NLRP3 es intracelular y se encuentra en los monocitos y macrófagos. Una vez activado, NLRP3 recluta caspasa 1 en presencia de ASC [Lamkanfi M, et al. *Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell. 2014;157:1013-1022; Karasawa T, et al. Role of nlrp3 inflammasomes in atherosclerosis. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2017;24:443-451*]. Caspasa 1 procesa citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18, además, es capaz de escindir Gasdermin D (GSDMD); esta proteína es capaz de generar poros en la membrana celular dando lugar a una forma de muerte celular denominada piroptosis [Wu C, et al. *Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. Immunity. 2019;50:1401-1411 e1404; Shi J, et al. Cleavage of gsdmd by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature. 2015;526:660-665*]. En esta línea, Wu y sus colegas desarrollaron un modelo animal para demostrar que el factor tisular (TF, de sus siglas del inglés) es liberado por macrófagos piroptóticos y es capaz de iniciar el proceso de coagulación sistémico utilizando la permeabilidad de la membrana a través de GSDMD [Wu C, et al. *Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. Immunity. 2019;50:1401-1411 e1404*]. En particular, el principal rol de TF es la regulación de la hemostasia y el inicio de la

cascada de coagulación [Wu C, et al. *Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. Immunity. 2019;50:1401-1411 e1404*]. También, se han reportado evidencias de que TF tiene un papel en el inicio de la coagulación en respuesta a infecciones o inflamación [Lindmark E, et al. *Role of platelet p-selectin and cd40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2000;20:2322-2328*; Esmon CT, et al. *Innate immunity and coagulation. Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. 2011;9 Suppl 1:182-188*]. Curiosamente, Golanov y colegas informaron que los pacientes tras el evento de SAH aumentaron los niveles de TF en el líquido cefalorraquídeo y lo relacionaron con el infarto cerebral [Golanov EV, et al. *Subarachnoid hemorrhage - induced block of cerebrospinal fluid flow: Role of brain coagulation factor iii (tissue factor). Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2018;38:793-808*]. Del mismo modo, la liberación de TF y las citoquinas inflamatorias se asocian con la activación de NLRP3 [Wu C, et al. *Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. Immunity. 2019;50:1401-1411 e1404*].

La presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los inventores, de que en pacientes con SAH se activa el complejo del inflamasoma a través de NLRP3 en monocitos circulantes. Esto conlleva a un incremento de producción de citoquinas inflamatorias y TF y los autores de la presente invención han descubierto que la presencia de TF e IL-1 $\beta$  en circulación de los pacientes se asocia significativamente con el riesgo de padecer TTC. Los inventores han desarrollado un modelo in vitro para estudiar el efecto de la muerte celular de los eritrocitos en la activación del inflamasoma en monocitos circulantes. Los resultados de este modelo muestran que la lisis de los eritrocitos liberados en la hemorragia subaracnoidea es capaz de activar el complejo NLRP3 en monocitos circulantes, desencadenando una respuesta inflamatoria, un incremento en la frecuencia de piroptosis que permite la liberación de TF en la circulación, que finalmente desencadena la cascada de coagulación. Los datos obtenidos además demuestran que tanto el TF como el IL-1 $\beta$  por si mismos o ambos en combinación tienen un importante valor pronóstico para predecir el riesgo de complicaciones como el TTC en pacientes con SAH.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Expresión de NLRP3 en pacientes con SAH.

NLRP3 está sobreexpresado en los monocitos de los pacientes con SAH. Se analizaron los monocitos de voluntarios sanos y de pacientes con SAH.

5 A) Análisis de expresión de NLRP3 por citometría de flujo en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes con SAH (n=28). La comparación de la expresión del NLRP3 entre los grupos se realizó mediante una prueba T paramétrica no emparejada. Barras de error: SEM. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

10 B) Análisis de expresión de mRNA de NLRP3 por qPCR en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes con SAH (n=28, panel superior izquierdo). Análisis de expresión de mRNA de CASP-1 por qPCR en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes con SAH (n=28, panel superior derecho). Análisis de expresión de mRNA de ASC por qPCR en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes con SAH (n=28, panel inferior izquierdo). Análisis de expresión de mRNA de GSDMD por qPCR en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y  
15 pacientes con SAH (n=28), panel inferior derecho).

C) Análisis de expresión de mRNA de IL-1 $\beta$  por qPCR en monocitos en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes con SAH (n=28, panel izquierdo). Análisis de la expresión de mRNA de IL-18 por qPCR en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes  
20 con SAH (n=28, panel central). Análisis de expresión de mRNA de TF por qPCR en monocitos de voluntarios sanos (n=19) y pacientes con SAH (n=28, panel derecho).

Las comparaciones de la expresión de mRNA entre voluntarios y pacientes se realizaron mediante la prueba T paramétrica no apareada con la corrección de Welch. Barras de error:  
25 SEM. \*:  $p < 0,5$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

### **Figura 2: Curso temporal de la expresión de NLRP3 en pacientes SAH.**

30 El curso temporal de la expresión del NLRP3 en los monocitos de los pacientes con SAH mostró un incremento después del día de admisión.

A) Análisis de expresión de NLRP3 por citometría de flujo en monocitos de pacientes con SAH (n=28) en los días basal (BAS), intermedio (INT) y en el día 7 tras el evento de SAH. La comparación de la expresión del NLRP3 entre diferentes tiempos se realizó mediante la  
35 prueba T paramétrica emparejada. Barras de error: SEM. \*:  $p < 0,5$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

B) Los sueros de voluntarios sanos y pacientes con SAH se recogieron para evaluar la producción de citoquinas. La concentración IL-1 $\beta$  se cuantificó mediante un análisis de microesferas por citometría de flujo en los días basal (BAS), intermedio (INT) y en el día 7 tras el evento de SAH (SAH n=28, panel izquierdo). La concentración de GSDMD se cuantificó usando la técnica ELISA en los días basal (BAS), intermedio (INT) y en el día 7 tras el evento de SAH (SAH n=28 panel central). La concentración de TF se cuantificó usando la técnica ELISA en los días basal (BAS), intermedio (INT) y en el día 7 tras el evento de SAH (SAH n=28, HV n=20, panel derecho). Barras de error: SEM. \*:p<0.05.

### 10 **Figura 3: Expresión de citoquinas inflamatorias y TF en suero de pacientes con SAH.**

A) Se recogió el suero de pacientes con SAH y voluntarios sanos para evaluar la producción de citoquinas. La concentración IL-1 $\beta$  se cuantificó mediante un análisis de microesferas por citometría de flujo (SAH n=28, HV n=20, panel superior izquierdo). La concentración de GSDMD se cuantificó usando la técnica ELISA (SAH n=28, HV n=20, panel inferior izquierdo). La concentración de TF se cuantificó usando la técnica ELISA (SAH n=28, HV n=20, panel inferior derecho). Las comparaciones de los niveles de proteína entre los grupos se realizaron mediante una prueba de T paramétrica no emparejada con la corrección de Welch. Barras de error: SEM. Se muestra \*:p<0,05, \*\*:p<0,01.

20

B) Los sobrenadantes de monocitos de voluntarios sanos y pacientes con SAH se recogieron para evaluar la producción de citoquinas. La concentración IL-1 $\beta$  se cuantificó mediante un análisis de microesferas por citometría de flujo (SAH n=28, HV n=20, panel superior izquierdo). La concentración IL-18 se cuantificó usando la técnica ELISA (SAH n=28, HV n=20, panel superior derecho). La concentración de GSDMD se cuantificó usando la técnica ELISA (SAH n=28, HV n=20, panel inferior izquierdo). La concentración de TF se cuantificó usando la técnica ELISA (SAH n=28, HV n=20, panel inferior derecho). Las comparaciones de los niveles de proteína entre los grupos se realizaron mediante una prueba de T paramétrica no emparejada con la corrección de Welch. Barras de error: SEM. Se muestra \*\*\*:p<0,001.

30

### **Figura 4: La lisis de eritrocitos activa la expresión de NLRP3 en monocitos.**

Los monocitos aislados de voluntarios sanos seleccionados al azar se estimularon con lisado de eritrocitos a diferentes proporciones con respecto al medio de cultivo (1: 2(50%), 1: 5 (20%) y 1:10 (10%) durante la noche.

35

A) Análisis de NLRP3 mediante citometría de flujo (n=8), fueron analizados por citometría de flujo.

5 B) Análisis de expresión de mRNA de los distintos componentes del inflammasoma en monocitos estimulados con lisado de eritrocitos.

C) Los sobrenadantes de monocitos estimulados con lisado de eritrocitos se recogieron para evaluar la producción de citoquinas. La concentración IL-1 $\beta$  se cuantificó mediante un análisis de microesferas por citometría de flujo (n=8, panel izquierdo). La concentración IL-18 se  
10 cuantificó usando la técnica ELISA (n=8, panel central). La concentración de TF se cuantificó usando la técnica ELISA (n=8, panel derecho).

Barras de error: SEM. \*: p <0.5, \*\*: p <0.01 versus voluntarios sanos no estimulados.

La comparación de la expresión entre los grupos se realizó mediante una prueba T paramétrica emparejada.

15

**Figura 5: La expresión del componente inflamatorio NLRP3 indica un factor de riesgo de tako-tsubo en pacientes con SAH.**

Se comparó la expresión del mRNA de los diferentes componentes del inflammasoma de  
20 NLRP3 entre los pacientes de SAH con y sin tako-tsubo.

A) Los niveles de expresión del mRNA NLRP3 de los pacientes con SAH con o sin tako-tsubo.

25 B) Los niveles de expresión del mRNA CASP-1 en pacientes SAH con o sin tako-tsubo.

C) Los niveles de expresión de mRNA de ASC en pacientes SAH con o sin tako-tsubo.

D) Los niveles de expresión de mRNA IL-1 $\beta$  en pacientes SAH con o sin tako-tsubo.

30 E) Los niveles de expresión de mRNA IL-18 en pacientes SAH con o sin tako-tsubo.

F) Los niveles de expresión de mRNA GSDMD en pacientes SAH con o sin tako-tsubo.

G) Los niveles de expresión de mRNA TF en pacientes SAH con o sin tako-tsubo.

35

Se recogió el suero de los pacientes con SAH para cuantificar los niveles de proteína mediante ELISA.

H) Los niveles de proteína IL-1 $\beta$  en suero de pacientes con SAH con o sin tako-tsubo,

5

I) Los niveles de proteína GSDMD en suero de pacientes con SAH con o sin tako-tsubo,

J) Los niveles de proteína TF de pacientes con SAH con o sin tako-tsubo.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Con el fin de facilitar la comprensión y de aclarar el significado de determinados términos en el contexto de la presente invención se aportan las siguientes definiciones:

15 **“Biomarcador de pronóstico”**: hace referencia a un elemento que puede ser detectado y cuantificado en una muestra de un paciente, más particularmente en el contexto de la presente invención de un paciente que ha sufrido Hemorragia Subaracnoidea aneurismática (SAH), y cuya presencia y cantidad relativa proporciona información de valor pronóstico acerca del desarrollo de la enfermedad y más particularmente acerca del riesgo del paciente de desarrollar una cardiomiopatía de tako-tsubo (TTC) asociada al SAH. El biomarcador de la invención puede ser una proteína soluble en la muestra del paciente o una combinación de proteínas o un ácido nucleico normalmente mRNA producto de la expresión génica de un determinado gen o producto de la expresión génica de una combinación de genes. De manera más específica, el biomarcador de pronóstico en el contexto de la invención está representado por la proteína soluble TF o la proteína soluble IL-1 $\beta$  o la combinación de ambas. También se considera como biomarcador de pronóstico en el contexto de la presente invención el ácido nucleico en forma de mRNA producto de la expresión génica del gen que codifica la proteína TF o del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$  o el producto de la expresión génica de la combinación de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ .

30 **“Hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH)”**: Hemorragia en el espacio subaracnoideo, causada por la rotura de un aneurisma sacular en las arterias del polígono de Willis. Produce un síndrome de irritación meníngea (cefalea, vómitos, rigidez de nuca) y en casos graves que cursan con hipertensión intracraneal puede inducir un estado de coma y la muerte rápida del paciente.

35

“**Cardiomiopatía de tako-tsubo (TTC)**”: Síndrome coronario agudo que se manifiesta por angina prolongada en reposo, cambios electrocardiográficos con isquemia subepicárdica con ondas T negativas profundas en la cara anterolateral, elevación enzimática discreta y un comportamiento ecocardiográfico característico. En sístole, mientras se produce una  
5 contracción normal de los segmentos basales del ventrículo izquierdo, existe una discinesia apical o expansión de los segmentos apicales, lo que da al ventrículo una imagen en ánfora. Cuando se realiza la coronariografía no suelen existir lesiones obstructivas significativas. Clínicamente aparece más en mujeres posmenopáusicas que han sufrido una situación estresante importante.

10

“**Expresión génica**”: en el contexto de la invención se refiere al proceso por el cual una célula transcribe a partir del ADN nuclear copias complementarias de un determinado gen en forma de mRNA que puede ser detectado y cuantificado como biomarcador. De manera más específica en la presente invención se habla de expresión génica al referirse a las copias en  
15 forma de mRNA de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ .

“**Factor Tisular o TF**”: El factor tisular, también denominado factor tisular de tromboplastina o factor III es una glicoproteína presente en los fibroblastos de la pared de los vasos sanguíneos y en otras células como por ejemplo los monocitos.

20

“**Inteleuquina 1 $\beta$  o IL-1 $\beta$** ”: es un tipo de citocina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por macrófagos activados. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda.

25

“**Sangre**”: Líquido que ocupa el aparato circulatorio. Consta de elementos formes, eritrocitos, leucocitos y plaquetas, suspendidos en un líquido, el plasma sanguíneo. Transporta oxígeno y nutrientes a los tejidos, remueve el anhídrido carbónico y los desechos metabólicos, vehicula metabolitos y hormonas, e interviene en la regulación de la temperatura corporal y del  
30 equilibrio ácido-básico y osmótico.

“**Suero**”: Parte líquida de la sangre después de coagularse, por lo que es equivalente al plasma sin fibrinógeno.

35 “**Líquido cefalorraquídeo (LCR)**”: Líquido incoloro que ocupa el espacio subaracnoideo, los cuatro ventrículos cerebrales y el conducto central medular.

5 **“Predicción del riesgo”**: se refiere a la capacidad de los biomarcadores y al método de la invención de anticipar en pacientes que han sufrido SAH la probabilidad de desarrollar complicaciones asociadas a dicha patología. En el contexto de la invención los biomarcadores y el método de la invención permiten anticipar el riesgo de desarrollar TTC en pacientes de SAH.

10 **“Predicción temprana”**: Se refiere a la capacidad de los biomarcadores y al método de la invención de anticipar en pacientes que han sufrido SAH la probabilidad de desarrollar complicaciones asociadas a dicha patología desde las primeras horas del evento vascular que dio lugar al SAH. En el contexto de la invención los biomarcadores y el método de la invención permiten anticipar de forma temprana el riesgo de desarrollar TTC en pacientes de SAH.

15 **“Muestra de un paciente”**: se refiere al tejido o fluido de un paciente que ha sufrido SAH que se obtiene para su procesamiento en el método de la invención y sobre el cual se llevan a cabo ensayos para detectar y cuantificar los niveles del biomarcador de la invención.

20 **“Cuantificación de los niveles de un biomarcador”**: se refiere de manera general a la aplicación de cualquier técnica apropiada dirigida a determinar los niveles de concentración de un determinado biomarcador en una muestra. De manera particular en la presente invención se refiere a la determinación de los niveles de concentración de las proteínas TF o IL-1 $\beta$  o la combinación de ambas proteínas o de los niveles de concentración del producto de expresión en forma de mRNA de los genes que codifican las proteínas TF o IL-1 $\beta$  o la combinación de los productos de expresión en forma de mRNA de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ .

25 **“Patrón de control”**: se refiere a los niveles de concentración medios del biomarcador de la invención obtenida a partir de un grupo estadísticamente representativo de pacientes sanos que sirve para en base a un análisis comparativo determinar si un determinado paciente de SAH tiene riesgo de desarrollar TTC.

30 **“Un mayor nivel del biomarcador”**: se refiere a la presencia en una muestra analizada de un paciente con SAH de una cantidad significativamente superior desde el punto de vista estadístico del biomarcador de la invención en comparación con el patrón control.

35 **“Alto riesgo”**: en el contexto de la invención se refiere a una probabilidad de por lo menos el 50% de desarrollar TTC en pacientes con SAH, preferiblemente superior al 60% más preferiblemente superior al 70% y aún más preferiblemente superior al 80%.

**“Riesgo de desarrollar TTC de al menos 50%”:** esta expresión implica un alto riesgo de desarrollar TTC en el paciente que ha sufrido SAH que en el mejor de los casos será una probabilidad de 50% y en el peor de los casos del 100%.

5 **“Riesgo de desarrollar TTC de en torno al 100%”:** esta expresión implica un alto riesgo de desarrollar TTC en el paciente que ha sufrido SAH y una probabilidad de entre un 95% y un 100% de que el paciente desarrollará TTC.

10 **“ELISA”:** se refiere a un inmunoensayo diseñado para detectar la presencia y cuantificar un antígeno en una muestra siendo primero el antígeno inmovilizado mediante un anticuerpo primario que se detecta posteriormente mediante un anticuerpo secundario enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable y cuantificable, como por ejemplo por medio de un cambio de color o de algún otro tipo.

15 **“CBA”:** se refiere a un inmunoensayo diseñado para detectar la presencia y cuantificar un antígeno en una muestra siendo primero el antígeno capturado mediante un anticuerpo primario unido a microesferas fluorescentes detectables por citometría que se detecta posteriormente mediante un anticuerpo secundario enlazado a un fluorocromo distinto al de las microesferas. Esta técnica permite la cuantificación multiparamétrica en una solución  
20 (varias citocinas pueden cuantificarse simultáneamente).

**“Western blot”:** es una técnica analítica usada para identificar y cuantificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas como puede ser una muestra de un paciente. La técnica utiliza tres etapas para lograr esto: separación por tamaño,  
25 transferencia a un soporte sólido y, finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios o secundarios apropiados. La cuantificación se realiza mediante la medición de la intensidad de la señal obtenida.

30 **“RT-qPCR”:** es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación que en el caso de la presente invención sería la amplificación del mRNA producto de la expresión génica del gen que codifica la proteína TF o IL-1 $\beta$  o la combinación de ambas. Para la cuantificación se adiciona una sustancia (con nucleótidos) marcada con un fluoróforo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos y cuya intensidad lumínica se puede medir.

35 **“Cebadores para la amplificación PCR”:** son oligonucleótidos de entre 5 y 25 bases nucleotídicas específicamente diseñados para hibridar con una determinada secuencia

nucleotídica diana (hebra molde) y cuya función es servir de iniciador para la reacción de polimerización a partir de la hebra molde que resulta en la producción de multitud de copias de dicha hebra molde. En el contexto de la invención, los inventores han desarrollado los pares de cebadores de SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3/ SEQ ID NO 4 para la  
5 amplificación PCR de los productos de expresión de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  respectivamente.

“**Anticuerpos monoclonales**”: en el contexto de la invención refiere a los anticuerpos capaces de unirse específicamente a las proteínas TF o IL-1 $\beta$  y que tiene la particularidad de  
10 haberse obtenido a partir de un solo clon de linfocitos B.

“**Anticuerpos policlonales**”: en el contexto de la invención refiere a los anticuerpos capaces de unirse específicamente a las proteínas TF o IL-1 $\beta$  y que tiene la particularidad de haberse  
15 obtenido a partir de de diferentes clones de linfocitos B.

“**Sondas nucleotídicas o sondas de hibridación**”: se refieren a un fragmento de ADN o RNA de longitud variable que se utiliza en el estudio de muestras que contengan ácidos nucleicos, para detectar la presencia de una secuencia de nucleótidos complementarias a la  
20 secuencia de la sonda.

20

#### Los biomarcadores

El primer aspecto de la invención se refiere a un biomarcador de pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH) donde dicho biomarcador se  
25 selecciona entre el Factor Tisular (TF), la IL-1 $\beta$ , una combinación del TF e IL-1 $\beta$  o la expresión génica de los respectivos genes que codifican estas proteínas por sí solas, es decir, de manera independiente o en combinación.

Los biomarcadores de la invención tienen la capacidad de predecir el riesgo de que un  
30 paciente que ha sufrido SAH desarrolle una cardiomiopatía de tako-tsubo (TTC). De hecho, los biomarcadores de la invención permiten la detección temprana del riesgo a desarrollar TTC desde las primeras horas después del evento cardiovascular que da lugar al SAH. La detección y predicción temprana del riesgo de sufrir TTC en un paciente con SAH puede tener relevancia en el abordaje terapéutico del paciente y un impacto importante en la evolución de  
35 la enfermedad, siendo, por tanto, una herramienta terapéutica de gran utilidad y alto valor predictivo para el correcto enfoque global de la terapia de pacientes con SAH. La evolución final del SAH y la esperanza de vida de estos pacientes depende en gran medida de la

capacidad de controlar y minimizar los efectos adversos de las patologías asociadas al SAH como el TTC, de ahí la relevancia de los biomarcadores de la presente invención.

5 Aunque el biomarcador de la presente invención puede detectarse en diferentes fluidos y muestras biológicas del paciente, de manera preferente es de utilidad como biomarcador a partir de muestras de sangre, suero, líquido cefalorraquídeo o también a partir de la fracción purificada de células mononucleares de sangre periférica. Las muestras preferidas son el suero o la fracción purificada de células mononucleares de sangre periférica del paciente.

10 El biomarcador de la invención puede detectarse de forma directa en forma de proteína soluble en las muestras de los pacientes o de manera indirecta a partir del producto de expresión de los genes que codifican dichas proteínas. Así los marcadores proteicos se pueden detectar y cuantificar con técnicas de proteómica como inmunoensayos (ELISA), CBA (cytometric Bead  
15 assay), western blot o espectrometría de masas. Por su parte, para la detección del producto de expresión de los genes que codifican TF o IL-1 $\beta$  se utilizan técnicas genéticas que permiten la identificación y cuantificación del mRNA, principalmente qPCR, RTqPCR.

En una realización particular de la invención, el biomarcador utilizado para el pronóstico de enfermos de SAH es la proteína TF o la expresión génica del gen que codifica la proteína TF.  
20 Este biomarcador puede detectarse tanto en forma de proteína soluble en la muestra del paciente como en forma de mRNA, esto es, como producto de la expresión génica del gen que codifica la proteína TF. Este biomarcador por sí solo, ya sea en su forma proteica o como ácido nucleico tiene un valor predictivo de al menos el 50%. Es decir, es capaz de predecir al menos en el 50% de los pacientes que han sufrido SAH si van a desarrollar TTC.

25 En otra realización particular de la invención, el biomarcador utilizado para el pronóstico de enfermos de SAH es la proteína IL-1 $\beta$  o la expresión génica del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$ . Este biomarcador puede detectarse tanto en forma de proteína soluble en la muestra del paciente como en forma de mRNA, esto es, como producto de la expresión génica del gen  
30 que codifica la proteína IL-1 $\beta$ . Este biomarcador, por sí solo, ya sea en su forma proteica o como ácido nucleico tiene un valor predictivo de al menos el 50%. Es decir, es capaz de predecir al menos en el 50% de los pacientes que han sufrido SAH si van a desarrollar TTC. La realización preferida de la invención contempla el uso combinado de las proteínas TF e IL-1 $\beta$  o de la expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  como  
35 biomarcadores para el pronóstico de SAH. La combinación de biomarcadores puede detectarse tanto en forma de proteínas solubles en la muestra del paciente como en forma de

mRNA, esto es, como producto de la expresión génica del gen que codifica las proteínas TF e IL-1 $\beta$ . La combinación de estos dos biomarcadores, ya sea en su forma proteica o como ácido nucleico tiene un valor predictivo del 100%. Es decir, la combinación de ambos biomarcadores es capaz de predecir en todos los casos de forma inequívoca si los pacientes  
5 que han sufrido SAH van a desarrollar TTC.

#### Método para predecir el riesgo de desarrollar TTC en pacientes con SAH

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método ex vivo para predecir el riesgo de  
10 desarrollar TTC en pacientes que han sufrido SAH que comprende:

- a) Tomar una muestra de un paciente que ha sufrido SAH y cuantificar los niveles de un biomarcador seleccionado entre el Factor Tisular (TF), la IL-1 $\beta$ , una combinación del TF e IL-1 $\beta$  o la expresión génica de los respectivos genes que codifican estas proteínas por sí solas o en combinación; y
- 15 b) comparar los niveles del biomarcador de la etapa a), con un patrón control de los niveles del biomarcador en sujetos sanos;

donde un mayor nivel del biomarcador en los pacientes que han sufrido SAH implica un alto riesgo de desarrollar TTC.

20 La primera etapa del método (etapa a) implica la toma de muestras y cuantificación de los niveles del biomarcador.

En cuanto a la toma de muestras, éstas pueden ser de cualquier fluido o tejido biológico del paciente, aunque de manera preferente, las muestras utilizadas para la detección y  
25 cuantificación de los biomarcadores de la invención son muestras de sangre, suero, líquido cefalorraquídeo o de la fracción de células mononucleares de sangre periférica.

En una realización particular, el método de la invención contempla detectar y cuantificar los niveles de las proteínas TF, IL-1 $\beta$  o de la combinación de TF e IL-1 $\beta$ . Para ello se pueden  
30 usar diferentes técnicas, inmunoquímicas o no. De manera preferente, la cuantificación de los biomarcadores proteicos de la invención se lleva a cabo mediante ELISA, CBA (cytometric bead array), western blot o espectrometría de masas. Dentro de esta realización particular del método, la detección y cuantificación se hace preferentemente en muestras de suero del paciente. De igual manera dentro de esta realización, la cuantificación se hace  
35 preferiblemente mediante un inmunoensayo de tipo ELISA.

Otra realización particular del método de la invención comprende detectar y cuantificar los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF o IL-1 $\beta$  de manera individual e independiente, o la combinación de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ . Para ello se pueden usar diferentes técnicas de análisis genético. Dentro de esta realización particular del método, la cuantificación de los biomarcadores implica la detección de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF o IL-1 $\beta$  o la combinación de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  en forma de mRNA, mediante qPCR o RT-qPCR, preferiblemente por RT-qPCR. Para llevar a cabo la qPCR o la RT-qPCR, la presente invención proporciona unos cebadores de utilidad para la amplificación tanto del producto de expresión génica del gen que codifica TF como del que codifica IL-1 $\beta$ . En particular, para amplificar y cuantificar el producto de expresión del gen que codifica TF, en el método de la invención pueden usarse el par de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO2 y para amplificar y cuantificar el producto de expresión del gen que codifica IL-1 $\beta$ , la invención proporciona el par de cebadores SEQ ID NO 3/SEQ ID NO4. Dentro de esta realización particular del método, la detección y cuantificación se hace preferentemente en muestras de la fracción de células mononucleares de sangre periférica del paciente.

La segunda etapa del método de la invención (etapa b) contempla comparar los niveles del biomarcador del paciente, con un patrón control de los niveles del biomarcador en sujetos sanos. Si el resultado de esta etapa comparativa resulta en que los niveles del biomarcador en el paciente son significativamente superiores a los del patrón de control, esto es indicativo de que el paciente con SAH tiene un alto riesgo de desarrollar TTC.

El método de la presente invención tiene un valor predictivo que va desde el 50% hasta el 100%. Es decir, en el peor de los casos, el método de la invención permite predecir que los pacientes que tienen un nivel elevado los biomarcadores TF o IL-1 $\beta$  o un nivel de elevado del producto de expresión de los genes que los codifican con respecto al patrón de control, tienen un riesgo de desarrollar TTC de al menos 50%. Dicho de otro modo, cuando el método de la invención se lleva a cabo cuantificando los biomarcadores TF o IL-1 $\beta$  o el producto de su expresión génica de estos genes de manera individual y separada se puede esperar que la probabilidad de predecir el riesgo de desarrollar TTC será de al menos el 50%. No obstante, cuando se evalúan de manera combinada los niveles de los biomarcadores TF e IL-1 $\beta$  o los niveles del producto de expresión de los genes que codifican estas proteínas esta probabilidad aumenta hasta el 100%.

Así pues, en una realización particular de la invención, el método implica cuantificar el biomarcador TF o el nivel del producto de expresión génica del gen que codifica la proteína TF y el mayor nivel de TF o del producto de expresión génica del gen que codifica la proteína TF en los pacientes que han sufrido SAH frente a los niveles correspondientes en el patrón de control implica un riesgo del paciente de desarrollar TTC de al menos el 50%.

De manera similar, otra realización del método de la invención implica cuantificar el biomarcador IL-1 $\beta$  o el nivel del producto de expresión génica del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$  y el mayor nivel de IL-1 $\beta$  o del producto de expresión génica del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$  en los pacientes que han sufrido SAH frente a los niveles correspondientes en el patrón de control implica un riesgo del paciente de desarrollar TTC de al menos el 50%.

La realización preferida del método de la invención contempla cuantificar como biomarcador la combinación de TF e IL-1 $\beta$  o nivel del producto de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  donde el mayor nivel tanto de TF como de IL-1 $\beta$  o de la expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  en los pacientes que han sufrido SAH frente a los niveles correspondientes en el patrón de control implica un riesgo del paciente de desarrollar TTC del 100%.

#### 20 Cebadores para la amplificación PCR

Un tercer aspecto de la invención se relaciona con los cebadores para la amplificación PCR del producto de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  que se caracterizan por tener las secuencias SEQ ID NO1/SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 respectivamente.

El par de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2 tienen la capacidad de unirse de manera específica al producto de expresión del gen que codifica la proteína TF y permitir su amplificación por PCR. De manera particular este par de cebadores son de utilidad en el método de predicción de la invención por cuanto permiten identificar la presencia y cuantificar el mRNA que se produce cuando el gen que codifica el TF es expresado. Este par de cebadores sirven tanto para la realización del método en que solo se cuantifica la expresión del gen que codifica TF como para aquella en la que se detecta y cuantifica en combinación con el producto de expresión del gen que codifica IL-1 $\beta$ .

35

Por su parte, el par de cebadores SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 tienen la capacidad de unirse al producto de expresión del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$  y permitir su amplificación por PCR. De manera particular, este par de cebadores son de utilidad en el método de predicción de la invención por cuanto permiten identificar la presencia y cuantificar el mRNA que se produce cuando el gen que codifica eIL-1 $\beta$  es expresado. Este par de cebadores sirven tanto para la realización del método en que solo se cuantifica la expresión del gen que codifica IL-1 $\beta$  como para aquella en la que se detecta y cuantifica en combinación con el producto de expresión del gen que codifica TF.

#### 10 Kit para el pronóstico de pacientes con SAH

Un último aspecto de la presente invención se refiere a un kit para el pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH) que comprende medios para detectar y/o cuantificar los niveles de Factor Tisular (TF), de IL-1 $\beta$ , de la combinación del TF e IL-1 $\beta$  o de la expresión génica de los respectivos genes que codifican estas proteínas por sí solas o en combinación. De manera particular, el kit de la invención sirve para predecir el riesgo de un paciente que ha sufrido SAH de desarrollar TTC.

En una realización particular, el kit de la invención está enfocado a detectar y/o cuantificar los biomarcadores proteicos y así, comprende medios para detectar y cuantificar los niveles de TF y/o IL-1 $\beta$  o la combinación de ambos en las muestras de análisis. Una realización preferida dentro de esta realización del kit comprende el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales anti-TF y/o anti-IL-1 $\beta$ , es decir, capaces de detectar y unirse específicamente a estas proteínas.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende medios para detectar y/o cuantificar los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF y/o IL-1 $\beta$  o de la combinación de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ . Así, dentro de esta realización el kit puede comprender sondas nucleotídicas marcadas que permitan la identificación y/o cuantificación del producto de expresión de estos genes y/o cebadores para la amplificación PCR. De manera preferida, el kit de la invención comprende los pares de cebadores con secuencia SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2 y/o SEQ ID NO 3/ SEQ ID NO 4 para su uso en una qPCR o RT-qPCR.

Los siguientes ejemplos tienen la función de ilustrar la invención, pero no tienen intención de ser limitativos de la misma.

**EJEMPLOS****Materiales y métodos**5 **Pacientes y sujetos sanos:**

Se incluyeron en el estudio pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico de aneurisma subaracnoidea siguiendo las directrices de la Organización Europea de Accidentes Cerebrovasculares para el tratamiento de aneurismas intracraneales y hemorragia subaracnoidea [*Steiner T, et al. European stroke organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. Cerebrovasc Dis. 2013;35:93-112*]. El estudio se realizó de acuerdo con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario de La Paz (PI-3405). Todos los participantes dieron su consentimiento por escrito para el estudio. Los pacientes reclutados en nuestra cohorte fueron mayores de 18 años que ingresaron en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario La Paz (HULP), habiendo sido informados del estudio y previa aprobación por parte del Comité de Ética correspondiente, dieron su permiso para ser incluidos en el estudio. Los criterios de exclusión fueron pacientes menores de 18 años o en situación de muerte encefálica, así como aquellos pacientes que retiraron el consentimiento informado para el estudio. El trabajo corresponde a un estudio prospectivo, observacional, descriptivo y unicéntrico.

Las características de los pacientes y voluntarios sanos (HV) se resumen en la Tabla 1.

25 **Tabla 1.** Demografía, historia clínica, datos de admisión y escalas de pronóstico. IQR significa rango intercuartílico, p25 - p75. Los datos se presentan como n, n (%) o media.

<b>Características basales</b>	<b>n=28</b>
<b>Edad (años)</b>	56 ± 12,2
<b>Mujer</b>	14 (66,67%)
<b>Raza</b>	
<b>Caucásica</b>	17 (80,95%)
<b>Asiática</b>	2 (9,52%)
<b>Negra</b>	1 (4,76%)
<b>Hispánica</b>	1 (4,76%)
<b>Historial Médico:</b>	
<b>Habito de fumar</b>	11 (52,38%)
<b>Fumador frecuente</b>	7 (33,33%)
<b>Hipertensión</b>	11 (52,38%)
<b>Diabetes Mellitus</b>	2 (9,52%)
<b>Dislipidemia</b>	5 (23,81%)

<b>Datos de admisión:</b>	
<b>Escala de Glasgow Coma</b>	11,74 ± 4,19
<b>Intubación</b>	6 (28,57%)
<b>Escalas de pronóstico:</b>	
<b>APACHE II</b>	11,05 ± 8,33
<b>Hunt and Hess</b>	2 (IQR 2-4)
<b>WFNS</b>	2 (IQR 1-4)
<b>PAASH</b>	2 (IQR 1-3)
<b>Modified Fisher</b>	4 (IQR 3-4)

Se extrajo un total de 23 ml de sangre de una vena periférica en el momento de la inscripción. Como sujetos de control, incluimos 20 (HV) del mismo sexo y edad sin antecedentes de SAH ni ninguna otra enfermedad importante. Se recogieron variables socio-demográficas, clínicas y analíticas de la historia clínica electrónica.

La monitorización de complicaciones clínicas se realizaron durante el periodo que el paciente permaneció ingresado en la unidad de cuidados intensivos (UCI), mediante tomografía axial computarizada (TAC) seriada (resangrado, hidrocefalia, lesiones isquémicas y DNT), evaluación clínica y neurológica diaria (vasoespasmos, DNT, resangrado, hidrocefalia, alteraciones endocrinas, crisis convulsivas), doppler transcraneal diario (vasoespasmos, hidrocefalia), ecografía doppler de miembros inferiores seriado (ETE), ecografía ocular y fondo de ojo si procediera (síndrome de Terson), ecocardiografía si procediera (ETE, disfunción cardiopulmonar), electroencefalografía si procediera (crisis convulsivas) y angiogramografía computarizada (angioTAC) y/o arteriogramografía diagnóstica y/o terapéutica si procediera (vasoespasmos) además de la monitorización avanzada de la UCI (presión arterial invasiva, diuresis horaria, EKG continuo, etc.) y la neuromonitorización específica en los pacientes seleccionados (presión intracraneal y drenaje ventricular).

El DNT se definió como la aparición de un deterioro neurológico focal (hemiparesia, afasia, apraxia, hemianopsia o negligencia), o una disminución de al menos 2 puntos en la GCS, de una duración de al menos 1 hora (no siendo evidente inmediatamente después de la oclusión del aneurisma no pudiéndose atribuir a otras causas descartables por clínica, analítica o por pruebas de imagen [*Lamkanfi M, et al. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell. 2014;157:1013-1022*] y/o la aparición de infartos cerebrales en las pruebas de imagen en las 6 primeras semanas tras la SAH que no estuvieran presentes en las pruebas de imagen a las 24-48 horas post-oclusión del aneurisma no atribuibles al proceso quirúrgico o endovascular [*Vergouwen MD, et al. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: Proposal of a multidisciplinary research group. Stroke.*

**2010;41:2391-2395].** El manejo de los pacientes se realizó acorde a las guías europeas para el manejo de la SAH (ESO) [**Steiner T, et al. European stroke organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. Cerebrovasc Dis. 2013;35:93-112].**

5 Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes en varios momentos: basal, 3 días y 7 días después del ingreso. La línea de base se define como la recolección de la muestra en el momento del ingreso, antes de cualquier tratamiento, y la SAH se confirmó mediante datos clínicos y analíticos.

10 Aislamiento de células:

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus singlas en inglés) se aislaron usando gradiente de Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) mediante centrifugación. Las PBMC aisladas se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y sin suero fetal bovino (FBS) en una superficie adherente durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con el fin de enriquecer el cultivo con monocitos. Para ello se sembraron 0,5 x 10<sup>6</sup> monocitos por pocillo en placas de 6 pocillos. Luego, el medio se reemplazó con medio RPMI 1640 que contenía 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 10% de FBS.

20 Citometría de flujo:

Las PBMC se marcaron con el anti-CD14 humano conjugado con alofococianina (APC) de Immunostep, (España) después del aislamiento. Para la tinción intracelular, se siguió el protocolo de permeabilización del kit Transcription Factor Buffer Set de BD Bioscience (Bélgica) y luego las células se marcaron con anti-NLRP3 de Myltenyi Biotec (EE. UU.). Se utilizó controles de isotipo apropiados para cada experimento. Después del marcaje se incubaron las células durante 30 minutos a 4° C en la oscuridad, luego se adquirieron usando el citómetro de flujo, BD FACS Calibur de BD Biosciences (Bélgica), y los datos recolectados se analizaron usando el software FlowJo vX.0.7 (FlowJo, LLC, EE. UU.).

30 Aislamiento y cuantificación de mRNA:

La purificación del RNA total se hizo a partir de monocitos adheridos como se ha descrito anteriormente. Las células se lavaron usando solución salina tamponada con fosfato para aislar el RNA siguiendo el kit de aislamiento de RNA de alta pureza (Roche Diagnostics, Países Bajos). El cDNA se obtuvo mediante transcripción inversa siguiendo el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, EE. UU.). Los niveles de expresión génica de cuantificación de mRNA se analizaron mediante PCR cuantitativa (q)

en tiempo real utilizando el sistema LightCycler (Roche Diagnostics). Las qPCR en tiempo real se realizaron utilizando el kit QuantiMix Easy SYG de Biotools (España) y cebadores específicos. Los datos de expresión de mRNA se normalizaron según la expresión del gen 18S y se determinó el número de copias de cDNA de cada gen de interés usando una curva estándar de 5 puntos.

Los cebadores utilizados fueron: **NLRP3**.5'-TGCCCGTCTGGGTGAGA-3' (SEQ ID NO 5) y 5'-CCGGTGCTCCTTGATGAGA-3' (SEQ ID NO 6); **IL-1 $\beta$** .5'-GGATATGGAGCAACAAGTGG-3' (SEQ ID NO 3) y 5'-ATGTACCAGTTGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 4); **ASC**.5'-AACCCAAGCAAGATGCGGAAG-3' (SEQ ID NO 7) y 5'-TTAGGGCCTGGAGGAGCAAG-3' (SEQ ID NO 8); **CASP1**.5'-GGAAACAAAAGTCGGCAGAG-3' (SEQ ID NO 9) y 5'-ACGCTGTACCCAGATTTTG-3' (SEQ ID NO 10); **18S**.5'-CGGCGACGACCCATTCGAAC-3' (SEQ ID NO 11) y 5'-GAATCGAACCTGATTCCCCGTC-3' (SEQ ID NO 12); **GSDMD**.5'-GTGTGTCAACCTGTCTATCAAGG-3' (SEQ ID NO 13) y 5'-CATGGCATCGTAGAAGTGAAG-3' (SEQ ID NO 14); y **TF**.5'-CCCAAACCGTCAATCAAGTC-3' (SEQ ID NO 1) y 5'-CCAAGTACGTCTGCTTCACAT-3' (SEQ ID NO 2). Todos los oligos utilizados fueron sintetizados, desalados y purificados por Bonsai Biotech.

## 20 Determinación de niveles séricos de proteínas solubles.

La extracción de muestras de sangre venosa fue entre las 08:00 y las 10:00 h. Las muestras de suero fueron inmediatamente alicuoteadas, congeladas y almacenadas a -80°C. Las citoquinas inflamatorias evaluadas: IL-1 $\beta$  e IL-6 se cuantificaron utilizando la tecnología array de citoquinas (CBA, de sus siglas en inglés) utilizando el kit comercial Ref. 551811 de BD Bioscience (Bélgica), siguiendo el protocolo del fabricante. La GSDMD (MBS2705515 de MyBioSource, San Diego, EE. UU.), IL-18 (CSB-E07450, Houston, EE. UU) y TF (CSB-E07913, Houston, EE. UU), se ensayaron utilizando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) respectivamente. Todas las medidas se realizan por duplicado. El límite de detección de los ensayos fue 0,312 ng / ml en GSDMD, 31,25 pg / ml en IL-18 y 3,12 pg / ml en TF. Las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo fueron inferiores al 20% en los tres ensayos diferentes.

**Ejemplo 1: el SAH activa inflammasoma a través de NLRP3**

Se ha descrito que los pacientes con SAH presentan un alto grado de estrés oxidativo y apoptosis celular [Zhou C, et al. *Caspase inhibitors prevent endothelial apoptosis and cerebral vasospasm in dog model of experimental subarachnoid hemorrhage. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2004;24:419-431*; Zhou ML, et al. *Potential contribution of nuclear factor-kappab to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2007;27:1583-1592*; Vecchione C, et al. *Tumor necrosis factor-alpha mediates hemolysis-induced vasoconstriction and the cerebral vasospasm evoked by subarachnoid hemorrhage. Hypertension. 2009;54:150-156*; Lo EH. *A new penumbra: Transitioning from injury into repair after stroke. Nature medicine. 2008;14:497-500*]. Por otra parte, el componente NLRP3 del inflammasoma, es un sensor especializado en la activación de este complejo en patologías relacionadas con la inflamación estéril [Latz E, et al. *Activation and regulation of the inflammasomes. Nature reviews. Immunology. 2013;13:397-411*]. Los datos de expresión intracelular de NLRP3 en monocitos aislados de pacientes con SAH mostraron un aumento significativo de esta proteína en comparación con los monocitos de HV (Figura 1A). Este aumento del NLRP3 también se corroboró cuantificando el mRNA (Figura 1B). Se ha descrito ampliamente que la activación de NLRP3 inicia la activación del inflammasoma a través de ASC y CASP-1, para ensamblar un complejo citosólico de múltiples proteínas que activa, entre otros, el sustrato piroptótico Gasdermin D (GSDMD) [Latz E, et al. *Activation and regulation of the inflammasomes. Nature reviews. Immunology. 2013;13:397-411*; Shi J, et al. *Cleavage of gsdmd by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature. 2015;526:660-665*; Sutterwala FS, et al. *The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. Journal of leukocyte biology. 2007;82:259-264*; Lamkanfi M. *Emerging inflammasome effector mechanisms. Nature reviews. Immunology. 2011;11:213-220*]. Por todo ello, se ha evaluado la expresión de mRNA de CASP-1, ASC, y GSDMD en monocitos (Figura 1B). El resultado de la activación del inflammasoma impulsa la maduración y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 [Lamkanfi M, et al. *Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell. 2014;157:1013-1022*; Schroder K, et al. *The inflammasomes. Cell. 2010;140:821-832*]. Además, se ha reportado que la activación del inflammasoma induce el mecanismo piroptótico de liberación TF a través del GSDMD [Wu C, et al. *Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. Immunity. 2019;50:1401-1411 e1404*]. Con estas evidencias, se evaluó la expresión de mRNA de las citoquinas (IL -1 $\beta$  e IL-18), y TF (Figura 1C), estos

resultados muestran un incremento de todas ellas en muestras de pacientes SAH con respecto a HV.

La aparición de TTC en pacientes con SAH se produce en una ventana de tiempo desde el día de ingreso hasta el día 3-5 (denominado tiempo intermedio) [*Wilkins RH. Cerebral vasospasm. Critical reviews in neurobiology. 1990;6:51-77; Talahma M, et al. Takotsubo cardiomyopathy in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Institutional experience and literature review. Clinical neurology and neurosurgery. 2016;141:65-70*]. Es por ello que se evaluó la expresión de NLRP3 a lo largo de esta ventana de tiempo. Los datos obtenidos mostraron que la expresión intracelular de NLRP3 aumenta a día intermedio en monocitos de SAH (Figura 2A). Para determinar el efecto de la activación de NLRP3, evaluamos la expresión de citoquinas inflamatorias y TF en suero de pacientes SAH (Figura 2B), encontrando un aumento de todas ellas a día 7. El conjunto de estos datos indica que la activación de NLRP3 aumenta con el tiempo.

15

### **Ejemplo 2: Efecto de la activación de NLRP3 en pacientes SAH**

La evaluación de citoquinas inflamatorias en suero mostró un aumento significativo de IL-1 $\beta$ , GSDMD y TF en pacientes con SAH en comparación con los sueros de HV (Figura 3A). En esta línea, de manera complementaria, se ha encontrado que sueros de pacientes tenían una mayor concentración de IL-6 (datos no mostrados). Para tener una aproximación del papel de los monocitos en este contexto, se cultivaron los monocitos de pacientes durante 16 horas con el fin de evaluar la capacidad de producción de citoquinas. Los resultados obtenidos corroboraron una mayor concentración de IL-1 $\beta$ , IL-18, GSDMD y TF en sobrenadante de cultivo de monocitos de pacientes en comparación con los datos obtenidos de sujetos sanos (Figura 3B). Finalmente, también evaluamos la concentración de IL-6 (datos no mostrados). Estos datos corroboran el rol inflamatorio de los monocitos en este contexto.

### **Ejemplo 3: La muerte de eritrocitos activa NLRP3**

30

Los pacientes con SAH han sufrido un evento de hemorragia en la zona subaracnoidea, es por ello que los inventores se plantearon utilizar un modelo in vitro para evaluar el efecto de la muerte celular y la lisis de eritrocitos en la respuesta inmune de los monocitos. Para ello se cultivaron monocitos de donantes sanos y se pusieron en contacto con lisado de eritrocitos autólogos a distintos ratios. La primera aproximación para evaluar el efecto de la lisis de los eritrocitos fue el estudio de la expresión de NLRP3 utilizando citometría de flujo, donde se

35

observó que a mayor concentración de lisado de eritrocitos aumentaba la expresión de NLRP3. Estos datos fueron corroborados mediante un análisis de expresión de mRNA, donde se encontró un aumento significativo de la expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3, CASP-1 y ASC y de GSDMD tras la activación con el lisado de eritrocitos. (Figura 4 A-B). Por último, se evaluó el efecto de la lisis eritrocitaria en la producción de citoquinas y se observó un aumento de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TF (Figura 4C). El conjunto de los resultados del modelo in vitro sugiere el mecanismo de activación de NLRP3 de los pacientes tras el evento de la hemorragia subaracnoidea.

#### 10 **Ejemplo 4: Los niveles de TF e IL-1 $\beta$ permiten predecir tako-tsubo**

Los inventores proponen que el tako-tsubo puede estar asociado con la activación del inflammasoma a través de NLRP3. La primera aproximación que se utilizó fue usando los datos de mRNA en pacientes con SAH con o sin TTC en el momento basal. Los datos mostraron un aumento significativo de la expresión de mRNA de NLRP3, CASP-1, GSDMD, IL-1 $\beta$  y TF en 15 pacientes con TTC en comparación con los pacientes sin TTC (Figura 5 A-G). Estos datos en conjunto muestran que la activación de NLRP3 juega un papel en pacientes con SAH con TTC en comparación con pacientes que no presentan TTC.

20 De manera complementaria, se evaluaron los niveles de proteína en suero de IL-1 $\beta$  y GSDMD de los pacientes con y sin TTC no encontrando una diferencia significativa entre los dos grupos de pacientes (Figura 5 H-I). Aunque la diferencia de los niveles de IL-1 $\beta$  en suero no se mostró estadísticamente significativa, el hecho de que se mostrase lo suficientemente clara y evidente, junto con el hecho de que los datos de mRNA de IL-1 $\beta$  si fueron significativos, sirvió 25 para que este marcador se tomara en consideración para su evaluación posterior en una correlación binaria de este marcador con el riesgo de padecer TTC. Por su parte, los valores de TF en pacientes con TTC sí mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con y sin TTC (Figura 5J).

30 Por último, se evaluaron las escalas clínicas que se utilizan frecuentemente en la práctica clínica como herramienta para clasificar pacientes con factores de riesgo. Los resultados mostraron que los marcadores relacionados con la actividad de NLRP3 se correlacionan con TTC. Por el contrario, la correlación entre las escalas clínicas que se utilizan actualmente para la predicción de TTC (GoSE, Fisher, PAAS, WFNS, Hunt-Hess, Apache, IOT) y el riesgo de 35 TTC no muestran una predicción significativa entre ellas. Solo en el caso de TF e IL-1 $\beta$ , haciendo una correlación logística binaria se ha encontrado que TF (pg/ml) en suero es capaz

de predecir el 50% de los pacientes con TTC de manera independiente, de igual manera IL-1 $\beta$  (pg/ml) en suero es capaz de predecir el 50% de los pacientes con TTC. Esta predicción predice el 100% de los pacientes utilizando la combinación de los dos marcadores. En definitiva, estos datos indican que los indicadores que se proponen en este estudio muestran una mejor predicción de TTC en pacientes SAH en este estudio con respecto a las escalas clínicas.

Finalmente, se correlacionaron los niveles séricos de TF e IL-1 $\beta$  con los niveles de troponina que también se han utilizado como indicadores de TTC o síndrome cardiovascular [Yayehd K, et al Management of takotsubo cardiomyopathy in non-academic hospitals in france: The observational french syndromes of takotsubo (ofsett) study. Archives of cardiovascular diseases. 2016;109:4-12; Liesirova K, Abela E, Pilgrim T, Bickel L, Meinel T, Meisterernst J, Rajeev V, Sarikaya H, Heldner MR, Dobrocky T, Siqueira E, El-Koussy M, Fischer U, Gralla J, Arnold M, Mattle HP, Hsieh K, Jung S. Baseline troponin t level in stroke and its association with stress cardiomyopathy. PloS one. 2018;13:e0209764]. Los datos muestran una correlación entre los niveles de troponina desde el día de ingreso con los niveles de TF e IL-1 $\beta$ (pg/ml) en suero, siendo valores relevantes y estadísticamente significativos en los tres tiempos estudiados (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación entre Troponina desde el día 1 hasta el día 7 con valores de proteína de TF e IL-1 $\beta$  en suero de pacientes con SAH. Se muestran valores de correlación de Spearman's como (r) y los valores de P como (P).

	Troponina día 1		Troponina día 3		Troponina día 7	
	Valor Spearman's	Valor de P	Valor Spearman's	Valor de P	Valor Spearman's	Valor de P
TF pg/ml	0,9393	<0.0001	0,9393	<0.0001	0,9587	<0.0001
IL-1 $\beta$ pg/ml	0,9393	<0.0001	0,9393	<0.0001	0,9587	<0.0001

Todos estos resultados muestran el sólido y alto valor predictivo que tanto TF como IL-1 $\beta$  de manera independiente entre sí o de su combinación proporcionan en el pronóstico de enfermos de SAH y en particular, en la predicción de la aparición de TTC.

## REIVINDICACIONES

- 1- Biomarcador de pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH) donde dicho biomarcador se selecciona entre el Factor Tisular (TF), la IL-1 $\beta$ , una combinación del TF e IL-1 $\beta$  o la expresión génica de los respectivos genes que codifican estas proteínas por sí solas o en combinación.
- 2- Biomarcador de acuerdo con la reivindicación 1 donde el biomarcador es el TF o la expresión génica del gen que codifica la proteína TF.
- 3- Biomarcador de acuerdo con la reivindicación 1 donde el biomarcador es la IL-1 $\beta$  o la expresión génica del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$ .
- 4- Biomarcador de acuerdo con la reivindicación 1 donde el biomarcador es la combinación de TF e IL-1 $\beta$  o la expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$ .
- 5- Biomarcador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por ser un biomarcador en sangre, suero, líquido cefalorraquídeo o en la fracción de células mononucleares de sangre periférica, preferiblemente en suero o en la fracción de células mononucleares de sangre periférica.
- 6- Biomarcador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que permite predecir el riesgo de que un paciente que ha sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática desarrolle cardiomiopatía de tako-tsubo (TTC).
- 7- Biomarcador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que permite una predicción temprana del riesgo a desarrollar TTC en un paciente tras la SAH.
- 8- Método ex vivo para predecir el riesgo de desarrollar TTC en pacientes que han sufrido SAH que comprende:
- Tomar una muestra de un paciente que ha sufrido SAH y cuantificar los niveles de un biomarcador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
  - comparar los niveles del biomarcador de la etapa a), con un patrón control de los niveles del biomarcador en sujetos sanos;
- donde un mayor nivel del biomarcador en los pacientes que han sufrido SAH implica un alto riesgo de desarrollar TTC.

9- Método de acuerdo con la reivindicación 8 donde el biomarcador cuantificado es el TF o la expresión génica del gen que codifica la proteína TF y donde el mayor nivel de TF o de la expresión génica del gen que codifica la proteína TF en los pacientes que han sufrido SAH implica un riesgo de desarrollar TTC de al menos 50%.

5

10- Método de acuerdo con la reivindicación 8 donde el biomarcador es la IL-1 $\beta$  o la expresión génica del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$  y donde el mayor nivel de IL-1 $\beta$  o de la expresión génica del gen que codifica la proteína IL-1 $\beta$  en los pacientes que han sufrido SAH implica un riesgo de desarrollar TTC de al menos 50%.

10

11- Método de acuerdo con la reivindicación 8 donde el biomarcador es la combinación de TF e IL-1 $\beta$  o la expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  donde el mayor nivel tanto de TF como de IL-1 $\beta$  o de la expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  en los pacientes que han sufrido SAH implica un riesgo de desarrollar  
15 TTC del 100%.

12- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde la muestra es una muestra de sangre, suero, líquido cefalorraquídeo o la fracción de células mononucleares de sangre periférica.

20

13- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 donde la cuantificación comprende la detección de los niveles de las proteínas TF, IL-1 $\beta$  o de la combinación de TF e IL-1 $\beta$  mediante ELISA, CBA (cytometric bead array), western blot o espectrometría de masas.

25

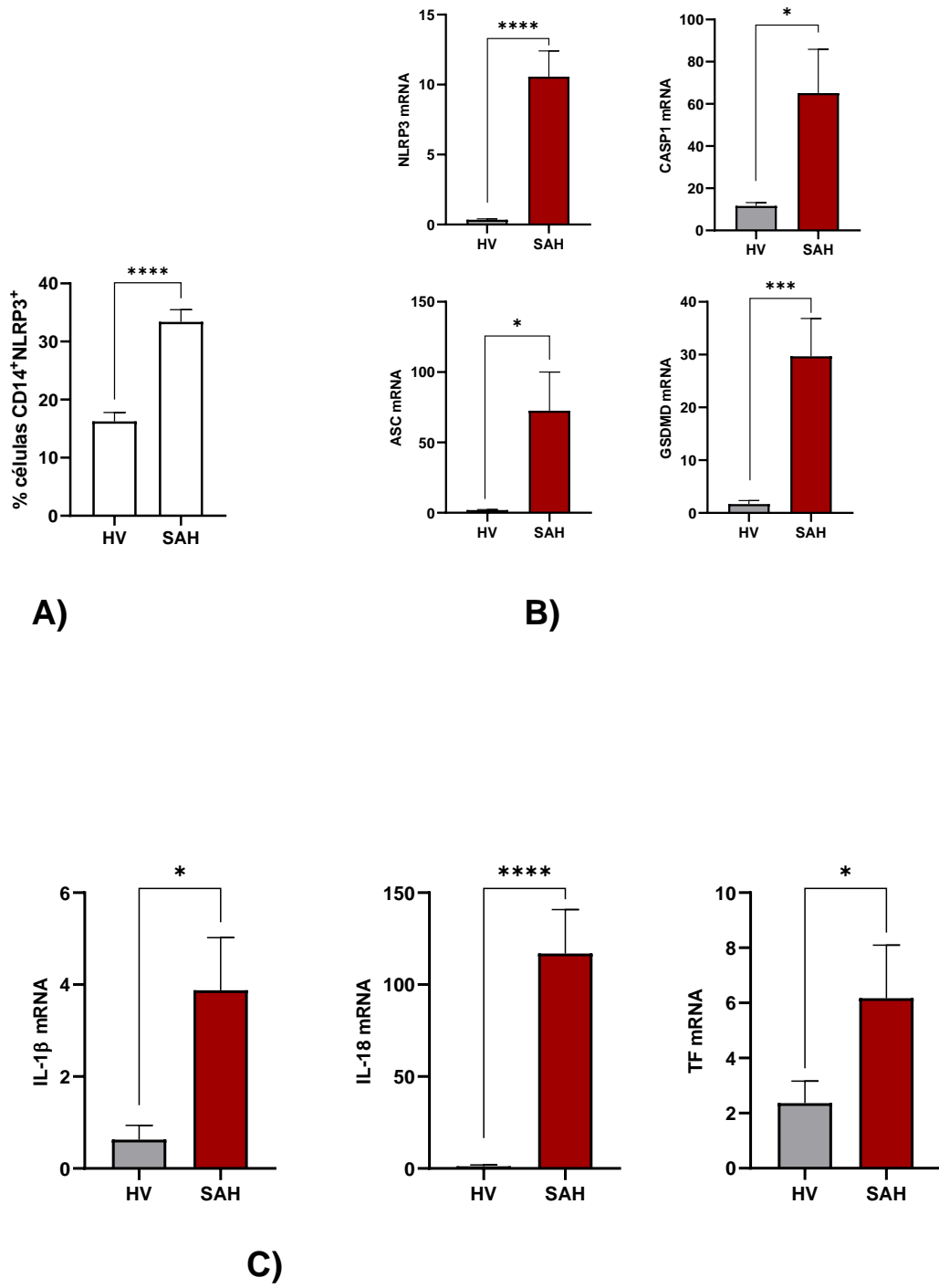
14- Método de acuerdo con la reivindicación 13 donde la cuantificación se lleva a cabo en muestras de suero.

15- Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 donde la cuantificación  
30 comprende la detección de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF, IL-1 $\beta$  o de la combinación de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  mediante q-PCR o RT-qPCR.

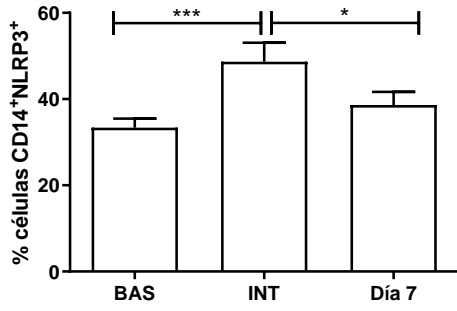
35

16- Método de acuerdo con la reivindicación 15 donde la cuantificación se lleva a cabo en la fracción de células mononucleares de sangre periférica.

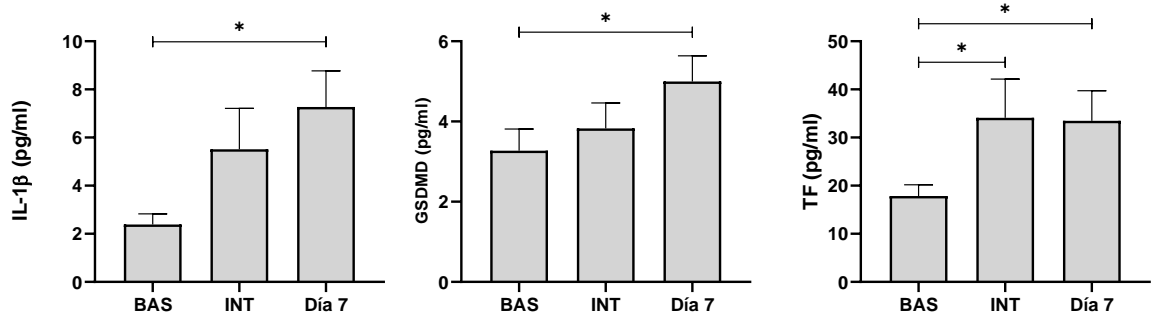
- 17- Cebadores para la amplificación PCR del producto de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  caracterizados por tener las secuencias SEQ ID NO1/SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 respectivamente.
- 5 18- Kit para el pronóstico de pacientes que han sufrido una hemorragia subaracnoidea aneurismática (SAH) que comprende medios para detectar y/o cuantificar los niveles de Factor Tisular (TF), de IL-1 $\beta$ , de la combinación del TF e IL-1 $\beta$  o de la expresión génica de los respectivos genes que codifican estas proteínas por sí solas o en combinación.
- 10 19- Kit de acuerdo con la reivindicación 18 donde los medios para detectar y/o cuantificar los niveles de TF, de IL-1 $\beta$  o de la combinación del TF e IL-1 $\beta$  comprenden anticuerpos monoclonales o policlonales.
- 15 20- Kit de acuerdo con la reivindicación 18 donde los medios para detectar y/o cuantificar los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF, de IL-1 $\beta$  o de la combinación de los niveles de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  comprenden sondas nucleotídicas y/o cebadores para la amplificación PCR.
- 20 21- Kit de acuerdo con la reivindicación 20 donde los cebadores para la amplificación PCR del producto de expresión génica de los genes que codifican las proteínas TF e IL-1 $\beta$  son los definidos en la reivindicación 17.



**Fig. 1**

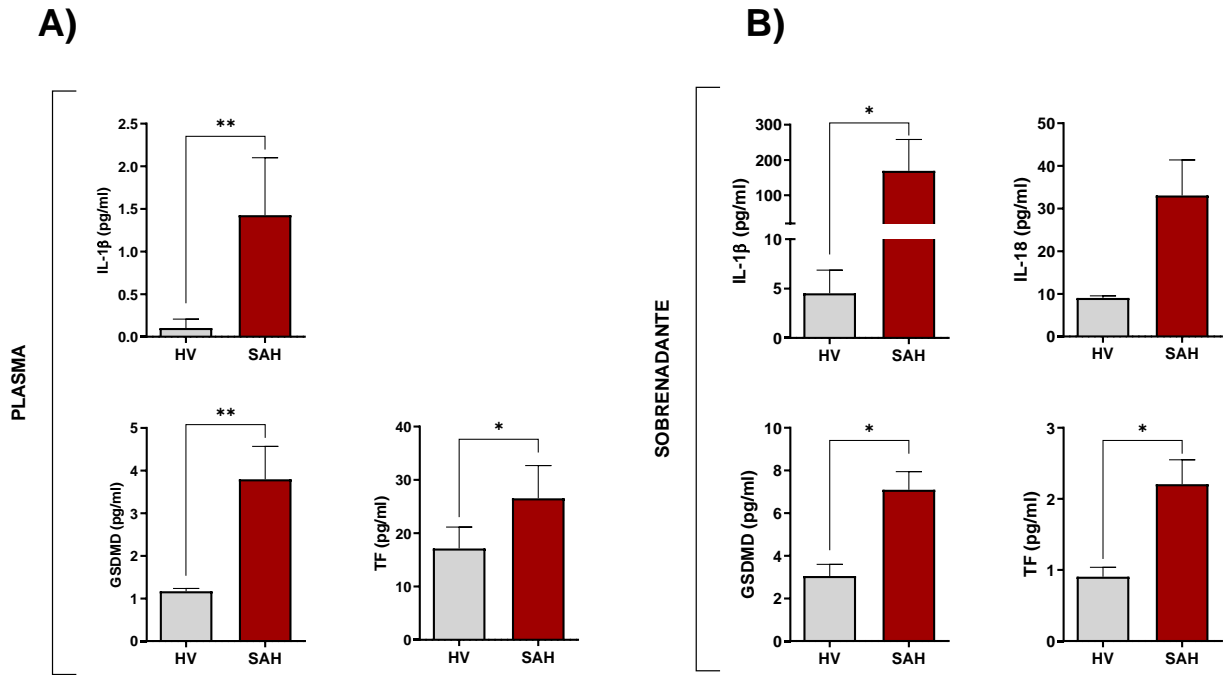


A)

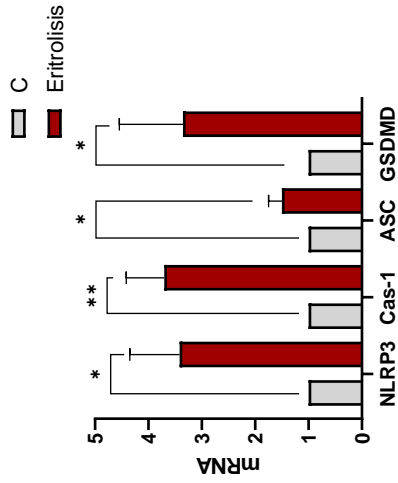


B)

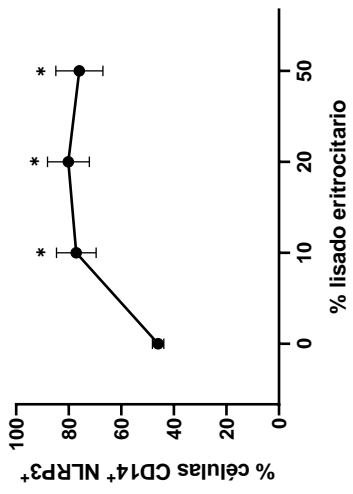
**Fig.2**



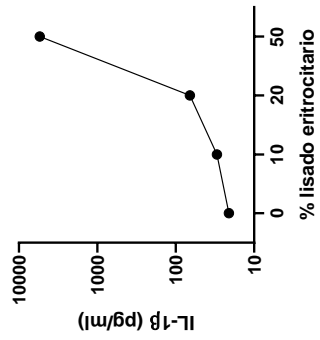
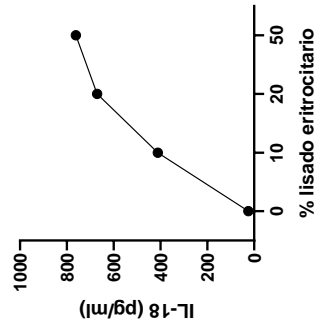
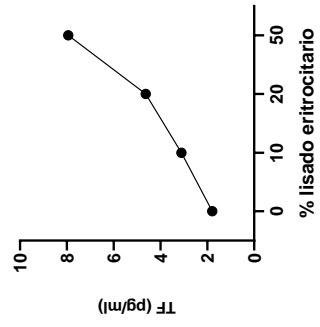
**Fig. 3**



B)

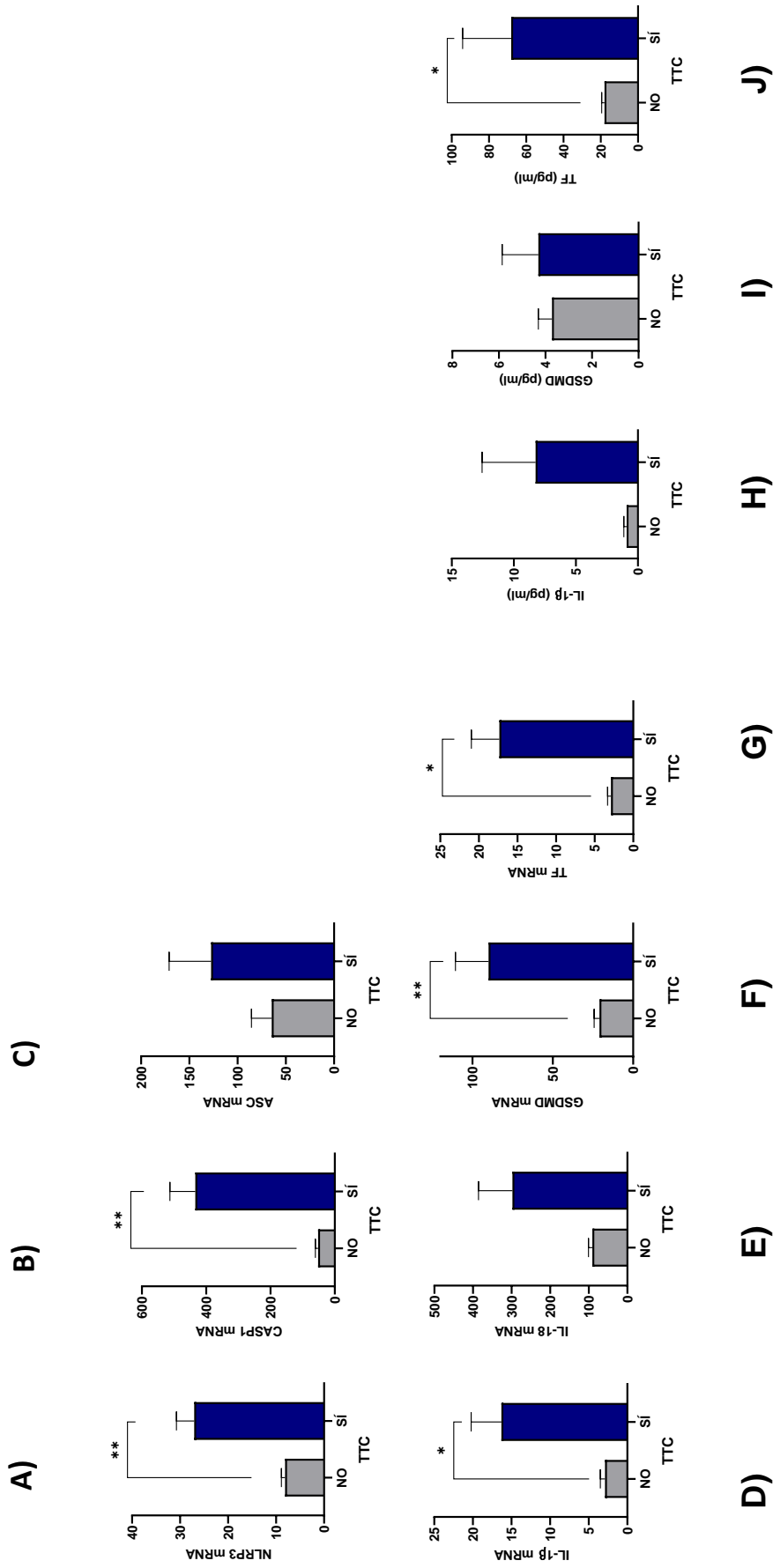


A)



C)

Fig. 4



**Fig. 5**



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202130180  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.03.2021  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. ci.: **C12Q1/6883** (2018.01)  
**G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HIRASHIMA YUTAKA et al., "Cerebrospinal fluid tissue factor and thrombin-antithrombin III complex as indicators of tissue injury after subarachnoid hemorrhage". Stroke (1997), Vol. 28, Nº 9, Páginas 1666-1670, ISSN 0039-2499, todo el documento.	1-5, 18-21
X	LV SHENG-YIN et al., "Levels of Interleukin-1 beta, Interleukin-18, and Tumor Necrosis Factor-alpha in Cerebrospinal Fluid of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Patients May Be Predictors of Early Brain Injury and Clinical Prognosis". World Neurosurgery (2018), Vol. 111, Páginas E355-E366, ISSN 1878-8750(print) ISSN 1878-8769(electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.wneu.2017.12.076>, todo el documento.	1-5, 18-21
X	PAREKH N et al "Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage". Journal of the American College of Cardiology (2000), Vol. 36, Páginas 1328 - 1335, ISSN 0735-1097 (Print), <DOI: pubmed:11028491>. todo el documento.	1-5, 18-21
X	WO 2018152435 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL) 23/08/2018, todo el documento.	1-5, 18-21
X	CHAUDHRY SR. "Role of Damage Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (aSAH). Int J Mol Sci. (2018) 13;19(7):2035. doi: 10.3390/ijms19072035, todo el documento.	1-5, 18-21

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  
14.12.2021

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/3



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202130180

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.03.2021

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/6883** (2018.01)  
**G01N33/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WU QI ET AL., "Inflammasome Proteins in Cerebrospinal Fluid of Patients with Subarachnoid Hemorrhage are Biomarkers of Early Brain Injury and Functional Outcome. World neurosurgery (2016), Vol. 94, Páginas 472 - 479, ISSN 1878-8769 (Electronic), <DOI: doi:10.1016/j.wneu.2016.07.039 pubmed:27443226>, todo el documento.	1-5, 18-21
X	WO 03016910 A1 (BIOSITE INC et al.) 27/02/2003	1-5, 18-21
X	CN 105646698 A (UNIV DALIAN) 08/06/2016, SEQ ID NO:3; SEQ ID NO: 4	17
X	WO 2012162211 A2 (UNIV RUSH MEDICAL CENTER et al), 29/11/2012, Párrafos 44 y 45	17
A	LAMKANFI MOHAMED ET AL., "Mechanisms and functions of inflammasomes." Cell (2014), Vol. 157, Páginas 1013 - 1022, ISSN 1097-4172 (Electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007 pubmed:24855941>, todo el documento.	1-21

#### 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 n.º:

Fecha de realización del informe  
14.12.2021

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
2/3

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

C12Q, G01N

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, REGISTRY