

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.05.02	(73) Titular(es): CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC. 140 WEST 57TH, SUITE 3B NEW YORK, NEW YORK 10019 US
(30) Prioridade(s): 2006.05.02 US 797285 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.02.04	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.04.15 168/2015	(72) Inventor(es): JAMES V. SNIDER US SVEN JACOBSON US
	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE DOENÇA PULMONAR E CARDIOVASCULAR**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITOS MÉTODOS E KITS PARA DETERMINAR A PROBABILIDADE DA PRESENÇA DE DOENÇA CARDIOVASCULAR (CVD) OU DOENÇA PULMONAR (PD) NUM SUJEITO UTILIZANDO ST2/RECETOR TIPO 1 DA INTERLEUCINA 1 (IL1RL1) E/OU INTERLEUCINA 33 (IL-33) E UM BIOMARCADOR PARA CVD, POR EXEMPLO, UM PÉPTIDO NATRIURÉTICO, POR EXEMPLO, PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL (BNP), PRÓ-HORMONA BNP (PROBNP), PROBNP N-TERMINAL (NT-PROBNP), PÉPTIDO NATRIURÉTICO ATRIAL (ANP), PROANP OU NT-PROANP.

DESCRIÇÃO

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE DOENÇA PULMONAR E CARDIOVASCULAR

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se a métodos para determinar a probabilidade da presença de doença cardiovascular (CVD) ou doença pulmonar (PD) num sujeito utilizando ST2 (que também é conhecida como Recetor tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1)) e um biomarcador diagnóstico, por exemplo, um péptido natriurético, por exemplo, péptido natriurético cerebral (BNP)..

ANTECEDENTES

Sintomas não específicos, tais como dispneia e dor no peito, são um problema comum no panorama de cuidados de saúde primários do paciente de ambulatório. Estabelecer um diagnóstico pode ser desafiante, porque o diagnóstico diferencial pode incluir múltiplas categorias de diagnóstico, incluindo doenças cardiovasculares e pulmonares. Distúrbios subjacentes podem variar de condições patológicas relativamente benignas (por exemplo, hiperventilação) a doenças mais sérias e até doenças com risco de vida (por exemplo, embolismo pulmonar ou insuficiência cardíaca), que são melhor respondidas num departamento de emergência. A avaliação atempada, diagnóstico preciso e início de terapêutica apropriada desempenham um papel crítico na otimização do tratamento e recuperação do paciente.

Weinberg et al., (2003) descreve um estudo para testar a hipótese de que níveis de ST2 solúvel no soro de pacientes com insuficiência cardíaca crónica severa são aumentados em pacientes com ativação neuro-hormonal. Os resultados do estudo sugeriram que o ST2 solúvel no soro é um biomarcador novo para ativação neuro-hormonal em pacientes com insuficiência cardíaca e que, além disso, em pacientes com insuficiência cardíaca crónica severa NYHA de classe III a IV, a alteração nos níveis de ST2 é um fator prognosticador independente de

mortalidade ou transplante subsequente.

Shimpo et al., (2004) descreve um estudo para testar a hipótese de que os níveis de ST2 no soro estão associados com o risco de morte ou insuficiência cardíaca em pacientes que apresentam enfarte do miocárdio elevado por ST (STEMI). Os resultados deste estudo sugeriram que os níveis de ST2 no soro predizem mortalidade e insuficiência cardíaca em pacientes com enfarte do miocárdio agudo.

O documento US 2004/0121343 descreve métodos e composições capazes de determinar a presença ou ausência de uma, preferencialmente uma pluralidade, de doenças, incluindo embolismo pulmonar e insuficiência cardíaca que exibe um ou mais sintomas semelhantes que podem incluir dispneia.

SUMÁRIO

A presente invenção inclui um método *in vitro* de fazer um diagnóstico diferencial entre doença cardiovascular (CVD) e doença pulmonar (PD) num sujeito com dor no peito ou dispneia, compreendendo o método:

- determinar um nível de ST2 solúvel (Recetor tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1)) numa amostra de um sujeito;

- determinar um nível de péptido natriurético cerebral (BNP) na amostra; e

- comparar o nível de ST2 solúvel a um nível de referência de ST2 solúvel num sujeito que não tem CVD nem PD, tem uma probabilidade elevada de ter PD ou CVD ou que tem CVD e/ou PD;

- comparar o nível de BNP na amostra a um nível limiar baixo de BNP de 100 pg/mL e um um nível limiar alto de BNP de 500 pg/mL; e

- diagnosticar um sujeito com dor no peito ou dispneia, um nível de ST2 solúvel inferior ao nível de referência de ST2 solúvel, e um nível de BNP igual a ou superior a 100 pg/mL como tendo CVD;

- diagnosticar um sujeito com dor no peito ou dispneia, um nível de ST2 igual a ou superior ao nível de referência de ST2

solúvel e um nível de BNP que é igual ou inferior a 500 pg/mL como tendo PD; ou

diagnosticar um sujeito com dor no peito ou dispneia, um nível de ST2 igual a ou superior ao nível de referência de ST2 solúvel e um nível de BNP superior a 500 pg/mL como tendo CVD; em que a amostra compreende sangue, soro ou plasma.

Também descrevemos aqui opcionalmente obter uma amostra biológica do sujeito; determinar um nível de um primeiro biomarcador selecionado do grupo que consiste em ST2 e/ou IL-33 em tal amostra; determinar um nível de um segundo biomarcador para a doença cardiovascular (CVD) na amostra; e comparar os níveis do primeiro e segundo biomarcadores na amostra aos níveis de referência. Os níveis dos biomarcadores na amostra conforme comparados com os níveis de referência estão correlacionados com (isto é, está estatisticamente correlacionado com) a probabilidade de que o sujeito tenha uma doença pulmonar ou CVD. Nalguns aspetos, o sujeito tem um sintoma não específico, por exemplo, dispneia ou dor no peito, que sugere um diagnóstico de uma doença pulmonar ou CVD e os níveis do biomarcador indicam qual das duas doenças, se alguma, o sujeito tem.

O biomarcador CVD é um biomarcador que é diagnóstico de uma condição patológica cardiovascular. O biomarcador CVD pode ser um péptido natriurético (NP), por exemplo, péptido natriurético cerebral (BNP), pró-hormona BNP (proBNP), proBNP N-terminal (NT-proBNP), péptido natriurético atrial (ANP), proANP ou NT-proANP. Num aspeto, o biomarcador CVD é BNP.

A amostra biológica pode compreender sangue, soro, plasma, urina ou tecido corporal. Num aspeto a amostra é uma amostra de soro.

Nalguns aspetos dos métodos descritos aqui, os níveis de referência representam níveis num sujeito que não tem uma CVD ou a PD. Nalguns aspetos, os níveis de referência representam níveis num sujeito que tem uma CVD. Nalguns aspetos, os níveis de referência representam níveis num sujeito que tem uma PD ou

ambas uma PD e uma CVD.

Determinar um nível de um biomarcador na amostra pode incluir contactar uma composição ligante à amostra, em que a composição ligante se liga especificamente ao biomarcador e medir ou determinar a ligação específica da composição ligante à amostra. Composições ligantes adequadas incluem antibióticos que se ligam especificamente a um polipeptídeo biomarcador e sondas de oligonucleotídeos que se ligam especificamente a um polinucleotídeo que codifica um biomarcador.

Nalguns aspetos, o sujeito tem dispneia e a CVD diagnosticada por um método descrito aqui é insuficiência cardíaca congestiva, cardiopatia isquémica (CAD), arritmia, pericardite, enfarte do miocárdio agudo ou anemia.

Nalguns aspetos, o sujeito tem dispneia e a doença pulmonar diagnosticada por métodos descritos aqui é doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), asma, pneumonia, pneumotórax, embolismo pulmonar, efusão pleural, doença metastática, edema pulmonar, doença do refluxo gastroesofágico com aspiração ou doença pulmonar restritiva.

Nalguns aspetos, os métodos descritos aqui também incluem determinar um nível na amostra de um ou mais outros biomarcadores adicionais, por exemplo, biomarcadores selecionados do grupo que consiste em troponina, mioglobina, creatina quinase MB (CK-MB), albumina modificada por isquémia (IMA), Interleucina-6 (IL-6), proteína reativa C (CRP), creatinina, D-dímeros, nitrogénio ureico no sangue (BUN), enzimas da função hepática, albumina e endotoxina bacteriana.

Também descrevemos aqui kits para diagnosticar doenças pulmonares. Os kits incluem um ou mais anticorpos separados que cada se liga especificamente a um biomarcador utilizado nos métodos descritos aqui e/ou uma sonda oligonucleotídica que se liga especificamente a um ácido nucleico que codifica ditos biomarcadores e instruções para utilização num método descrito aqui.

Também são descritos aqui kits para determinar a

probabilidade da presença de doença cardiovascular (CVD) ou doença pulmonar (PD) num sujeito. Os kits incluem (i) uma ou ambas de uma composição ligante que se liga especificamente a IL-33 e uma composição ligante que se liga especificamente a ST2, (ii) uma composição ligante liga-se a um biomarcador para CVD e (iii) instruções para utilização num método de determinar a probabilidade da presença de CVD ou PD num sujeito descrito aqui. A IL-33 e/ou ST2 e o biomarcador CVD podem compreender polipeptídeos e a composição ligante inclui um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a cada um dos polipeptídeos. Nalguns aspetos, a IL-33 e/ou ST2 e o biomarcador CVD podem compreender um ácido nucleico ou uma sonda de ácido nucleico que se liga especificamente a cada um dos ácidos nucleicos.

Uma "doença cardiovascular," conforme utilizado aqui, refere-se a um distúrbio do coração e vasos sanguíneos e inclui distúrbios das artérias, veias, arteríolas, vénulas e capilares. Doenças cardiovasculares diagnosticadas por um método descrito aqui podem incluir insuficiência cardíaca (HF) congestiva, cardiopatia isquémica (CAD), arritmia, pericardite e enfarte do miocárdio agudo (MI).

Uma "doença pulmonar," conforme utilizado aqui, refere-se a um distúrbio dos pulmões. Doenças pulmonares diagnosticadas por métodos descritos aqui podem incluir doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), asma, pneumonia, pneumotórax, embolismo pulmonar, efusão pleural, doença metastática, edema pulmonar, doença do refluxo gastroesofágico com aspiração e/ou doença pulmonar restritiva.

"Regulado para cima," conforme utilizado aqui, refere-se a expressão aumentada de um gene e/ou do seu polipeptídeo codificado. "Expressão aumentada" refere-se a aumentar (isto é, para um nível detetável) replicação, transcrição e/ou tradução de um gene, por exemplo, ST2, uma vez que a regulação para cima de qualquer um destes processos resulta num aumento na concentração/quantidade do polipeptídeo codificado pelo

gene. Contrariamente, "regulação para baixo," ou "expressão diminuída", conforme utilizado aqui, refere-se a diminuição da replicação, transcrição e/ou tradução do gene e/ou do seu polipeptídeo codificado. A regulação para cima ou regulação para baixo da expressão génica pode ser determinada diretamente detetando um aumento ou diminuição, respetivamente, no nível de ARNm para o gene ou o nível de expressão génica do polipeptídeo codificado pelo gene, utilizando qualquer meio adequado conhecido na arte, tal como hibridização de ácido nucleico ou métodos de deteção de anticorpo, respetivamente, e em comparação com controlos. "Expressão," conforme utilizado aqui, refere-se a uma expressão de ácido nucleico e/ou polipeptídeo.

Conforme utilizado aqui, um "sujeito" é um mamífero, por exemplo, um humano ou mamífero não humano. Em geral, ácidos nucleicos e polipeptídeos humanos ou moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeos sintetizados ou gerados para terem sequências com base num ácido nucleico ou sequência polipeptídica humana correspondentes são preferidos para utilização no diagnóstico de sujeitos humanos.

Conforme utilizado aqui, uma "amostra" inclui um ou mais de sangue, soro, plasma, urina e tecido corporal. Nalguns aspetos, uma amostra é uma amostra de soro ou sangue.

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado conforme entendidos vulgarmente por alguém com habilitação comum na arte à qual pertence esta revelação. Métodos e materiais são descritos aqui para utilização na presente revelação, outros métodos e materiais adequados conhecidos na arte também podem ser utilizados. Os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não se pretende que sejam limitantes. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, controlarão.

Outras características e vantagens da invenção serão aparentes da descrição detalhada e figuras seguintes e das

reivindicações.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um quadro que ilustra o efeito da história COPD nas concentrações de ST2 em sujeitos com/sem HF aguda.

A Figura 2 é um diagrama de caixa que ilustra níveis de ST2 em sujeitos com COPD/Asma e/ou HF.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O diagnóstico preciso de sujeitos que apresentam sintomas não específicos pode ser difícil, já que os sintomas podem ter etiologia muito diferente. Por exemplo, sujeitos com dispneia (perda de fôlego ou respiração desconfortável) podem padecer de uma doença pulmonar ou uma doença cardiovascular, de ambas ou nenhuma.

Metodologia geral

Em geral, os métodos descritos aqui incluem avaliar níveis de um primeiro biomarcador (ST2 e/ou IL-33) e um segundo biomarcador CVD (por exemplo, um péptido natriurético (NP)) numa amostra biológica (por exemplo, uma amostra de sangue, soro, plasma, urina ou tecido corporal) de um sujeito, por exemplo, um mamífero, por exemplo, um humano. Estes níveis podem providenciar informação diagnóstica, por exemplo, indicando se o sujeito tem uma doença pulmonar (PD) ou a doença cardiovascular (CVD), conforme descrito aqui. Nalguns aspetos, o segundo biomarcador é péptido natriurético cerebral (BNP).

Num exemplo, o diagnóstico de CVD versus PD pode ser feito referindo-se ao Quadro 1.

Quadro 1: Diagnóstico de CVD vs PD

	ST2 baixo (por exemplo, < 0,20 ng/mL soro)	ST2 alto (por exemplo, > 0,20 ng/mL soro)
BNP baixo (< 100 pg/mL)	Baixa probabilidade de CVD ou PD	PD provável
BNP moderado (100–500 pg/ml)	CVD possível	PD possível

	ST2 baixo (por exemplo, < 0,20 ng/mL soro)	ST2 alto (por exemplo, > 0,20 ng/mL soro)
BNP alto (> 500 pg/ml)	CVD provável	CVD altamente provável

Assim, para um sujeito que tem níveis baixos de ambos biomarcador CVD, por exemplo, BNP, e de ST2, existe uma probabilidade baixa da presença de CVD ou de PD. Níveis baixos do biomarcador CVD e níveis altos de ST2 indicam uma probabilidade superior de PD do que de CVD.

Para um sujeito que tem níveis moderados de BNP, níveis baixos de ST2 indicam que a presença de CVD é possível (e mais provável do que a de PD), ao passo que níveis elevados de ST2 indicam que a presença de PD é possível (e mais provável do que a de CVD).

Finalmente, para um sujeito que tem níveis altos de um biomarcador CVD, níveis baixos de ST2 indicam que CVD é provável (e mais provável do que PD) e níveis altos de ST2 indicam que CVD é altamente provável (e mais provável do que PD).

Utilizando os métodos descritos aqui, os diagnósticos podem ser aceites ou descartados para um dado sujeito, permitindo ao prestador de cuidados de saúde concentrar os esforços de diagnóstico, e, assim, esforços terapêuticos, apropriadamente. Apesar de ser possível que ambas etiologias possam existir simultaneamente num sujeito, em qualquer dado momento no tempo (e particularmente numa situação de cuidados agudos, tal como apresentação com dispneia), é provável que uma etiologia seja mais "dominante" do que a outra e, assim, seria o alvo primário para tratamento.

Os níveis dos biomarcadores podem ser determinados uma vez, por exemplo, no momento da apresentação. Nalguns aspetos, os níveis dos biomarcadores são determinados em qualquer um ou mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 18 e/ou 24 horas e/ou aos 1-7 dias ou mais tarde, após o aparecimento dos sintomas.

Onde os níveis dos biomarcadores são determinados mais de

uma vez, podem ser utilizados o nível mais alto ou uma média ou a alteração nos níveis pode ser determinada e utilizada. Os níveis dos biomarcadores também podem ser determinados múltiplas vezes para avaliar a resposta de um sujeito a um tratamento. Por exemplo, níveis, por exemplo, de IL-33 e/ou ST2, que são tomados após a administração de um tratamento, por exemplo, uma ou mais doses ou rondas de um tratamento, podem ser comparadas com níveis tomados antes do tratamento ser iniciado, por exemplo, níveis de base. A alteração nos níveis indicaria se o tratamento foi eficaz; por exemplo, uma redução nos níveis indicaria que o tratamento foi eficaz.

Avaliar os níveis do biomarcador num sujeito inclui tipicamente obter uma amostra biológica, por exemplo, soro ou sangue, do sujeito. Os níveis do biomarcadores na amostra podem ser determinados medindo os níveis de polipeptídeos do biomarcador na amostra, utilizando métodos conhecidos na arte e/ou descritos aqui, por exemplo, imunoensaios, tais como ensaios imunossorbentes ligados a enzima (ELISA). Em alternativa, podem ser medidos os níveis de ARNm que codifica os biomarcadores, de novo utilizando métodos conhecidos na arte e/ou descritos aqui, por exemplo, por PCR quantitativa ou análise Northern blot.

Por exemplo, um método conforme descrito aqui, por exemplo, para diagnóstico diferencial de doença pulmonar, pode incluir contactar uma amostra de um sujeito, por exemplo, uma amostra incluindo sangue, soro, plasma, urina ou tecido corporal do sujeito, com uma composição ligante (por exemplo, um anticorpo ou sonda oligonucleotídica) que se liga especificamente a um polipeptídeo ou ácido nucleico dos biomarcadores conforme descrito aqui. Os métodos também podem incluir contactar uma amostra de um sujeito controlo, sujeito normal ou tecido ou fluido normal do sujeito teste com a composição ligante, por exemplo, para providenciar uma referência ou controlo. Além disso, o método pode adicionalmente incluir comparar a ligação específica da

composição ao sujeito teste com a ligação específica da composição ao sujeito normal, sujeito controlo ou tecido ou fluido normal do sujeito teste. Expressão ou atividade de biomarcadores numa amostra teste ou num sujeito teste também pode ser comparada com a da amostra controlo ou sujeito controlo. Uma amostra controlo pode incluir, por exemplo, uma amostra de um sujeito não afetado ou um sujeito que tem uma condição patológica conhecida, por exemplo, uma doença pulmonar ou uma doença cardiovascular. Expressão ou atividade de um sujeito controlo ou amostra controlo pode ser providenciada como um valor pré-determinado, por exemplo, adquirido a partir de um grupo estatisticamente apropriado de sujeitos controlo.

Um anticorpo que "se liga especificamente a" um antígeno, liga-se preferencialmente ao antígeno numa amostra que contém outras proteínas. O termo "anticorpo", conforme utilizado aqui, refere-se a uma molécula de imunoglobulina ou porção imunologicamente ativa da mesma, isto é, uma porção de ligação ao antígeno. Exemplos de porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina incluem fragmentos F(ab) e F(ab')₂ que podem ser gerados tratando o anticorpo com uma enzima tal como pepsina. O anticorpo pode ser policlonal, monoclonal, recombinante, por exemplo, um quimérico ou humanizado, completamente humano, não humano, por exemplo, murino, monoespecífico ou um anticorpo de cadeia única. Nalguns aspetos tem função efetora e pode fixar complemento.

Uma "sonda oligonucleotídica" (também referida simplesmente como uma "sonda") é um ácido nucleico que tem pelo menos 10, e menos de 200 (tipicamente menos de cerca 100 ou 50) pares de bases de comprimento. Uma sonda que "se liga especificamente a" um ácido nucleico alvo hibridiza com o alvo em condições de elevado rigor. Conforme utilizado aqui, o termo "hibridiza em condições de elevado rigor" descreve condições para hibridização e lavagem. Conforme utilizado aqui, condições de elevado rigor são 0,5 M fosfato de sódio, 7% SDS

a 65°C, seguido de uma ou mais lavagens a 0,2X SSC, 1% SDS a 65°C. Métodos para realizar ensaios de hibridização de ácido nucleico são conhecidos daqueles habilitados na arte e podem ser encontrados em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1989), 6.3.1-6.3.6.

A detecção pode ser facilitada acoplando (isto é, ligando fisicamente) o anticorpo ou sonda a uma substância detetável (isto é, rotulagem e anticorpo). Exemplos de substâncias detetáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina, p-galactosidase ou acetilcolinesterase; Exemplos de complexos de grupo prostético adequado incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; Exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo, pontos quânticos ou ficoeritrina; um Exemplo de um material luminescente inclui luminol; Exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina e Exemplos de material radioativo adequado ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Ensaio diagnóstico podem ser utilizados com matrizes biológicas tais como células vivas, extratos celulares, lisados celulares, células fixas, culturas celulares, fluidos corporais ou amostras forenses. Anticorpos conjugados úteis para fins diagnósticos ou de kit, incluem anticorpos unidos a corantes, isótopos, enzimas e metais, ver, por exemplo, Le Doussal et al., *New Engl. J. Med.* 146:169-175 (1991); Gibellini et al., *J. Immunol.* 160:3891-3898 (1998); Hsing e Bishop, *New Engl. J. Med.* 162:2804-2811 (1999); Everts et al., *New Engl. J. Med.* 168:883-889 (2002). Existem vários formatos de ensaio, tais como radioimunoensaios (RIA), ELISA e dispositivo de microfluidos (Patentes U.S. N.ºs 6 176 962 e 6 517 234).

Técnicas conhecidas em bioquímica e biologia molecular

podem ser utilizadas nos métodos descritos aqui (ver, por exemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1982); Sambrook e Russell, *Molecular Cloning*, 3ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (2001); Wu, *Recombinant DNA*, Volume 217, Academic Press, San Diego, Calif (1993); e Ausbel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumes 1-4, John Wiley e Sons, Inc. Nova Iorque, Nova Iorque (2001)).

Assim que um nível de um biomarcador é determinado, o nível pode ser comparado com um nível de referência. Nalguns aspetos, o nível de referência representará um nível limiar, acima do qual o sujeito pode ser diagnosticado com doença CVD ou PD. O nível de referência escolhido pode depender da metodologia utilizada para medir os níveis dos biomarcadores. Nalguns aspetos, o nível de referência é um intervalo de níveis.

Também descrevemos aqui que ambos níveis de ST2 e IL-33 podem ser determinados e a informação da comparação de ambos biomarcadores com os seus respetivos níveis de referência providencia informação cumulativa relativamente à presença de doença pulmonar no sujeito e/ou a presença de uma doença severa no sujeito. Nalguns aspetos, a razão de ST2 para IL-33 pode ser determinada e a razão comparada com uma razão referência que representa uma razão limiar acima da qual o sujeito tem CVD ou PD, por exemplo, conforme mostrado no Quadro 1.

ST2/Recetor Tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1)

O gene ST2 é um membro da família de recetores de interleucina-1, cujo produto proteico existe tanto na forma transmembranar como um recetor solúvel que é detetável no soro (Kieser et al., *FEBS Lett.* 372(2-3):189-93 (1995); Kumar et al., *J. Biol. Chem.* 270(46):27905-13 (1995); Yanagisawa et al., *FEBS Lett.* 302(1):51-3 (1992); Kuroiwa et al., *Hybridoma* 19(2):151-9 (2000)). ST2 foi recentemente descrito como sendo marcadamente regulado para cima num modelo experimental de insuficiência cardíaca (Weinberg et al., *Circulation*

106(23):2961-6 (2002)) e resultados preliminares sugerem que concentrações de ST2 podem ser elevadas naqueles com HF severa crónica (Weinberg et al., *Circulation* 107(5):721-6 (2003)) bem como naqueles com enfarte do miocárdio agudo (MI) (Shimpo et al., *Circulation* 109(18):2186-90 (2004)).

Pensa-se que a forma transmembranar de ST2 desempenha um papel na modulação de respostas de células T auxiliares tipo 2 (Lohning et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(12):6930-5 (1998); Schmitz et al., *Immunity* 23(5):479-90 (2005)) e pode desempenhar um papel no desenvolvimento de tolerância em estados de inflamação crónica ou severa (Brint et al., *Nat. Immunol.* 5(4):373-9 (2004)), ao passo que a forma solúvel de ST2 é regulada para cima em fibroblastos estimulados pelo crescimento (Yanagisawa et al., 1992, *supra*). Dados experimentais sugerem que o gene ST2 é marcadamente regulado para cima em estados de distensão dos miócitos (Weinberg et al., 2002, *supra*) de uma forma análoga à indução do gene BNP (Bruneau et al., *Cardiovasc. Res.* 28(10):1519-25 (1994)).

Tominaga, *FEBS Lett.* 258:301-304 (1989), isolou genes murinos que foram expressos especificamente por estímulo do crescimento em células BALB/c-3T3; eles designaram um destes genes St2 (para Gene 2 expresso por estímulo do crescimento). O gene St2 codifica dois produtos proteicos: ST2 (IL1RL1), que é uma forma segregada solúvel; e ST2L, uma forma de recetor transmembranar que é muito semelhante aos recetores da interleucina-1. O Comité de Nomenclatura HUGO designou o homólogo humano, a clonagem do qual foi descrita em Tominaga et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1171:215-218 (1992), como Recetor Tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1). Os dois termos (ST2 e IL1RL1) são utilizados alternadamente aqui.

A sequência de ARNm da isoforma solúvel, mais curta da ST2 humana pode ser encontrada no N.º de acesso do GenBank NM_003856.2 e a sequência polipeptídica está no N.º de acesso do GenBank NP_003847.2; a sequência de ARNm para a forma mais longa da ST2 humana está no N.º de acesso do GenBank

NM_016232.4; a sequência polipeptídica está no N.º de acesso do GenBank NP_057316.3. Está disponível informação adicional nas bases de dados públicas em GeneID: 9173, MIM ID # 601203, e UniGene N.º Hs.66. Em geral, nos métodos descritos aqui, é medida a forma solúvel do polipeptídeo ST2.

Métodos para detetar e medir ST2 são conhecidos na arte, por exemplo, conforme descritos nas Publicações de Patente U.S. N.ºs 2003/0124624, 2004/0048286 e 2005/0130136. Kits para medir o polipeptídeo ST2 também estão comercialmente disponíveis, por exemplo, o Kit ST2 ELISA fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), N.º 7638. Além disso, são descritos dispositivos para medir ST2 e outros biomarcadores na Publicação de Patente U.S. N.º 2005/0250156.

Num aspeto, o nível de ST2 é determinado uma vez, por exemplo, no momento da apresentação. Nalguns aspetos, o nível de ST2 é determinado em um ou mais de 2, 4, 6, 8, 12, 18 e/ou 24 horas e/ou 1-7 dias após o aparecimento dos sintomas.

Também descrevemos aqui que o nível de ST2 pode ser determinado mais de uma vez; nesse caso, pode ser utilizada a medida mais alta. Onde o nível de ST2 é determinado mais do que essa vez, pode ser utilizado o nível mais alto ou a alteração nos níveis pode ser determinada e utilizada. Os níveis de ST2 também podem ser determinados múltiplas vezes para avaliar a resposta de um sujeito a um tratamento. Por exemplo, um nível de ST2 tomado após administração de um tratamento, por exemplo, uma ou mais doses ou rondas de um tratamento, pode ser comparado com níveis de ST2 antes do tratamento ter sido iniciado, por exemplo, um nível base. A alteração nos níveis de ST2 indicaria se o tratamento foi eficaz; por exemplo, uma redução nos níveis de ST2 indicaria que o tratamento foi eficaz.

Os métodos também podem incluir determinar a identidade da sequência nucleotídica a RefSNP ID. rs1041973. Interleucina-33 (IL-33)

A IL-33 foi recentemente identificada como o ligando para

ST2 e foi descrita a presença de níveis aumentados de IL-33 em vários distúrbios inflamatórios (ver Schmitz et al., Immunity 23(5):479-90 (2005); Publicação da Patente U.S. N.º 2005/0203046). Nos métodos descritos aqui, ST2 pode ser medida além de IL-33. A razão de ST2 para IL-33 também pode ser determinada, da mesma forma que o podem ser razões de complexos ligados para ligados e/. A proteína IL-33 é expressa como uma molécula inativa, pré-IL-33, que é ativada após clivagem pela Caspase I resultando no péptido IL-33 ativo, bem como no produto peptídico da clivagem, pró-IL-33. Logo, os métodos descritos aqui podem incluir medir uma, duas ou todas as três das IL-33 madura, pré-IL-33 e/ou pró-IL-33, todas as quais estão incluídas no termo "IL-33."

A sequência de ácido nucleico da IL-33 pode ser encontrada no N.º de acesso do GenBank NM_033439.2 e a sequência polipeptídica está no N.º de acesso do GenBank NP_254274.1. Está disponível informação adicional nas bases de dados públicas em GeneID: 90865, MIM ID # *608678 e UniGene N.º Hs.348390. IL-33 também é conhecida como fase de leitura aberta 26 do cromossoma 9 (C9ORF26); fator nuclear das vénulas endoteliais superiores (NFHEV); e Interleucina 33. Ver também Baekkevold et al., Am. J. Path. 163: 69-79 (2003).

Métodos para medir os níveis de polipeptídeo IL-33 e ácido nucleico são conhecidos na arte, ver, por exemplo, Schmitz et al., Immunity 23(5):479-90 (2005); Publicação da Patente U.S. N.º 2005/0203046.

Biomarcadores CVD

Os métodos descritos aqui incluem medir níveis de biomarcadores CVD além de IL1RL1 (ST2) e/ou IL-33. Biomarcadores adequados para CVD incluem troponina, NT-proBNP, BNP NT-proANP e ANP.

Nalguns aspetos, o biomarcador CVD diagnóstico é péptido natriurético tipo B (BNP), um marcador de stress hemodinâmico característico de insuficiência cardíaca. Os níveis de BNP podem ser determinados, por exemplo, no sangue inteiro ou soro,

utilizando metodologias convencionais. Por exemplo, estão comercialmente disponíveis um número de ensaios, por exemplo, o Teste Triage BNP (Biosite, Inc., San Diego, CA), um teste laboratorial remoto que sangue inteiro ou plasma e produz resultados em cerca de 15 minutos; um imunoensaio quimioluminescente tipo sandwich (Bayer HealthCare Diagnostics, Tarrytown, Nova Iorque) para BNP que é corrido nas plataformas ADVIA Centaur e ACS:180; um imunoensaio baseado em micropartículas (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) para BNP que é corrido na plataforma AxSYM; e um ensaio quimioluminescente imunoenzimático (Biosite, Inc., San Diego, CA) para BNP que é corrido nas seguintes plataformas Beckman Coulter: Access, Access 2, Synchron LXI e a UniCel DXI. Em ensaio eletroquimioluminescente (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) disponível para medir NT-proBNP.

Os intervalos de referência para BNP e NTproBNP variam dependendo de um número de fatores. Os intervalos seguintes são para utilização onde os níveis de BNP são medidos utilizando um método tipo ELISA e alguém habilitado na arte será capaz de determinar que níveis obtidos utilizando outros métodos são equivalentes. Se o nível de BNP é >500 pg/mL, então HF é altamente provável. Níveis de BNP de 100-500 pg/mL são, com frequência, descritos como uma "zona cinzenta," na qual o diagnóstico é mais duvidoso. Em sujeitos magros, se o BNP é <100 pg/mL, então HF é pouco provável, contudo, a obesidade influencia a expressão de BNP na HF crônica (Mehra et al., J Am Coll Cardiol. 43(9):1590-1595 (2004)), por isso níveis de <100 pg/mL não descartam insuficiência cardíaca em sujeitos obesos (Silver et al., Cong. Heart Fail. 10(5 suppl. 3):1-30 (2004)).

Outros Biomarcadores

Também descrevemos aqui métodos para medir níveis de outros biomarcadores, por exemplo, um ou mais de: troponina, creatina quinase MB (CK-MB), Mioglobina (Myo), albumina modificada por isquemia (IMA), Interleucina-6 (IL-6), proteína

reativa C (CRP), creatinina, D-dímeros, nitrogénio ureico no sangue (BUN), enzimas da função hepática, albumina e/ou endotoxina bacteriana. Métodos para medir estes biomarcadores são conhecidos na arte, ver, por exemplo, Publicações de Patente U.S. N.ºs 2004/0048286 e 2005/0130136 para Lee et al.; Dhalla et al., Mol. Cell Biochem. 87:85-92 (1989); Moe et al., Am. Heart J. 139:587-95 (2000).

Kits

Também são descritos aqui kits que incluem um reagente que compreende uma composição ligante para a deteção de um ou mais polipeptídeo(s) ou ácido nucleico de IL-33 ou ST2, por exemplo, um anti-IL-33 ou anticorpo ST2 (isto é, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a IL-33 ou ST2), ou uma sonda de ácido nucleico complementar a toda ou parte de IL-33 ou ácido nucleico ST2), bem como um reagente que compreende uma composição ligante para a deteção de um ou mais de um biomarcador CVD, por exemplo, um biomarcador CVD polipeptídeo ou um ácido nucleico que codifica um biomarcador CVD e instruções para utilização num método descrito aqui. Também pode ser incluído um controlo, por exemplo, um epítipo de IL-33 ou ST2 e do biomarcador CVD.

Os kits são geralmente compostos dos seguintes elementos principais: embalagem, reagentes compreendendo composições ligantes, conforme descrito anteriormente, opcionalmente um controlo e instruções. O embalagem pode ser uma estrutura tipo caixa para segurar um tubo (ou número de tubos) contendo ditas composições ligantes, um tubo (ou número de tubos) contendo um controlo e instruções para utilização num método descrito aqui. Indivíduos habilitados na arte podem prontamente modificar o embalagem para se ajustar às necessidades individuais.

Como um Exemplo, o kit pode conter um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a ST2 (ou IL-33) e um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a

um biomarcador CVD, por exemplo, BNP, proBNP, NT-proBNP, ANP, proANP ou NT-proANP.

Também descrevemos que podem ser utilizados outros métodos de detecção, por exemplo, ensaios colorimétricos, radioimunoensaios ou ensaios quimioluminescentes. Ensaios tipo sandwich também podem ser utilizados, por exemplo, utilizando dois anticorpos monoclonais, um rotulado com iodo 125 e o outro adsorvido em contas, por exemplo, conforme utilizado no kit IRMA-BNP2 de CISBIO International (França) e nos kits ShionORIA BNP ou ANP (SHIONOGI EUA Inc.).

Por exemplo, o kit pode ser desenhado para utilização num ensaio é um imunoensaio de micropartículas quimioluminescente (CMIA), tais como os ensaios ARCHITECT de Abbot Diagnostics (Abbott Park, IL), e pode conter, assim, micropartículas paramagnéticas revestidas com anticorpos anti-BNP e micropartículas paramagnéticas revestidas com anticorpos anti-ST2. Estas micropartículas são contactadas com uma amostra e o BNP e ST2 presentes na amostra ligam-se com as micropartículas revestidas. Opcionalmente, a amostra pode ser dividida em pelo menos duas aliquotas e cada tipo de micropartícula pode ser contactada com uma alíquota separada. Após lavagem, pode ser adicionado conjugado rotulado com acridínio anti-BNP e anti-ST2 para criar uma mistura da reação na segunda etapa. Após outro ciclo de lavagem, são adicionadas soluções pré-gatilho e gatilho à mistura da reação. A reação quimioluminescente resultante é medida, por exemplo, utilizando o ARCHITECT i System optics (Abbot Diagnostics, Abbott Park, Illinois). Existe uma relação direta entre a quantidade de BNP ou ST2 na amostra e a quimioluminescência detetada.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Detecção e medição de ST2 no soro

Este Exemplo utiliza o kit ST2 ELISA fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), N.º 7638. Este kit é um ensaio ELISA tipo sandwich

que utiliza anticorpos monoclonais para ambas captura e detecção. Este procedimento pretende-se que analise uma placa completa de amostras testadas em réplicas a um fator de diluição de 1:3 e segue atentamente o protocolo do fabricante. Os kits deveriam ser armazenados a 4°C até utilização. O procedimento descrito neste Exemplo está otimizado para soro ou plasma humano recolhido em citrato ou tubos anticoagulantes EDTA. Plasma recolhido em tubos anticoagulantes de heparina não deveria ser utilizado neste ensaio, uma vez que a heparina se liga a ST2 e inibe a medição por este protocolo ELISA. Podem ser utilizadas amostras de plasma ou soro frescas ou armazenadas congeladas. Este ensaio não é afetado de forma adversa até 3 ciclos de congelamento e descongelamento das amostras de plasma.

Os reagentes deveriam ser preparados frescos a partir de um novo kit imediatamente antes de realizar os ensaios. Permitir o kit equilibrar à temperatura ambiente antes da utilização. Os reagentes não discutidos explicitamente a seguir são providenciados pelo fabricante prontos a utilizar.

1. Solução de lavagem - a solução de lavagem é providenciada pelo fabricante como uma solução concentrada 10X. Para perfazer 1 litro de solução de lavagem diluir 100 ml do concentrado 10X providenciado com 900 ml de água destilada.
2. Solução detetora - a solução detetora é preparada diluindo o concentrado detetor 1:101 com o diluente detetor. Para uma placa com 96 poços completa de amostras, é necessário 10 ml de solução detetora. Para preparar 10 ml de solução detetora utilizar uma pipeta para transferir 10 ml do diluente detetor de cor azul para um tubo de polipropileno com topo laranja de 15 ml. Adicionar 100 µl do concentrado detetor a este volume de diluente detetor.

a. NOTA: este reagente deveria ser preparado durante a primeira etapa de incubação do ensaio.

3. Stock calibrador - reconstituir a proteína calibradora dissolvendo a proteína liofilizada na quantidade de água

destilada definida pelo fabricante para este lote de fabrico para produzir uma solução stock de 8 ng/ml. Esta especificação de volume está incluída na inserção do produto.

Preparação de padrões e amostras:

- Todos os seguintes deveriam ser preparados em tubos de polipropileno de 1,5 ml rotulados para serem transferidos para a placa de ensaio com a pipeta P200.

Padrões:

A curva padrão é preparada fazendo diluições em série 2 vezes da solução stock 8 ng/ml.

1. Utilizando uma pipeta P1000 transferir 250 µl de Diluente de ensaio para 8 tubos de polipropileno de 1,5 ml rotulados S1-S8

2. Utilizando a mesma pipeta P1000 transferir 250 µl da solução stock calibradora 8 ng/ml para o tubo S1. Este tubo é agora proteína calibradora 4 ng/ml.

a. Misturar completamente pipetando gentilmente 3 vezes sendo cuidadoso para não criar bolhas.

3. Utilizando a mesma pipeta P1000 e uma ponta nova para cada dos seguintes, transferir 250 do reagente no tubo S1 para o tubo S2, repetir a mistura.

4. Repetir etapa 3 para S2 para S3, S3 para S4, S4 para S5, S5 para S6 e S6 para S7. S8 será o branco do reagente por isso não transfira a proteína calibradora para este poço.

a. Os tubos S1-S6 e S8 terão agora 250 µl de reagente e o tubo S7 terá quase 450 µl

Amostras:

A placa é montada para que cada amostra seja analisada como uma diluição 1:3 em duplicado.

1. Rotular um tubo de polipropileno de 1,5 ml para cada amostra.

2. Utilizar a pipeta P200 transferir 160 µl de Diluente de ensaio para cada tubo.

3. Utilizar a pipeta P200 transferir 80 µl de soro ou plasma da amostra 1 para o tubo 1. Misturar cuidadosamente pipetando

3 vezes sem fazer bolhas.

4. Continuar a transferir amostras para os tubos de amostra repetindo a etapa 2 para cada amostra.

Procedimento:

1. Utilizar a pipeta P200 transferir os padrões e amostras de soro diluídas rapidamente para a placa de ensaio com 96 poços. Uma disposição exemplar é mostrada a seguir no Quadro 2.

a. Posicionar a pipeta P200 em 100 µl

b. Transferir 100 µl das diluições da curva padrão para cada das colunas 1 & 2 na placa de ensaio

c. Transferir 100 µl de cada das amostras de soro para a placa de ensaio exatamente nas mesmas posições, conforme mostrado no mapa da placa a seguir.

2. Cobrir a placa de ensaio com o escudo providenciado e incubar à temperatura ambiente durante 60 minutos.

3. Utilizar a auto-lavagem da placa lavar a placa 4 vezes.

4. Detetor: utilizar a pipeta multi-canal com 8 canais transferir 100 µl da solução detetora a cada poço e incubar à temperatura ambiente durante 60 minutos.

a. NOTA: este reagente deveria ser preparado durante a primeira etapa de incubação.

b. NOTA: utilizar um vaso de reagente descartável para esta adição de reagente.

Utilizar SEMPRE um vaso de reagente descartável fresco para cada reagente. Não é necessário mudar as pontas da pipeta durante esta etapa.

5. Lavar a placa como na etapa 3

6. Substrato: utilizar a pipeta multi-canal com 8 canais transferir 100 µl do Substrato a cada poço e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos.

a. O reagente substrato é providenciado pronto a utilizar pelo fabricante.

7. Paragem: na conclusão da incubação do substrato utilizando a pipeta multi-canal com 8 canais transferir 100 µl da solução

Stop a cada poço.

a. O reagente da solução Stop é providenciado pronto a utilizar pelo fabricante.

8. Ler a placa a 450 nm com correção de fundo a 620 nm.

a. A placa deveria ser lida nos primeiros 30 minutos após parar a reação.

9. Inserir as leituras de absorvância na folha providenciada para análise.

Quadro 2: Mapa de Placa de ensaio exemplar com 96 poços

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,0		1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	2,0		2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	1,0		3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	0,5		4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	0,25		5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	0,125		6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	0,0625		7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	0,0		8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

Exemplo 2: Detecção e medição de IL-33 no soro

Uma amostra de sangue é recolhida de um sujeito e soro é preparado da amostra utilizando métodos convencionais. Um anticorpo monoclonal rotulado para IL-33 (por exemplo, conforme descrito na Publicação do Pedido de Patente U.S. N.º 2005/020304) é adicionado à amostra e incubado durante uma quantidade de tempo suficiente para que a ligação ocorra. Os complexos anticorpo/IL-33 são depois detetados utilizando métodos convencionais e a quantidade de IL-33 presente é quantificada. Espera-se que os níveis de IL-33 estejam correlacionados com doença de uma forma semelhante à de ST2, conforme descrito aqui.

Exemplo 3: Concentrações de COPD e ST2

O efeito da história de COPD nas concentrações de ST2 em sujeitos com/sem HF agudo foi avaliado em sujeitos do estudo

PRIDE.

600 sujeitos sem fôlego foram admitidos no estudo PRIDE para analisar a utilidade de NT-proBNP para o diagnóstico e prognóstico de insuficiência cardíaca (HF) aguda. No momento da admissão, foi obtida uma amostra cega de sangue, processada e congelada a -80°C . Para os fins da análise de ST2, foi descongelada uma aliquota de sangue citrado (segundo ciclo de congelamento-descongelamento) e analisada em relação à concentração de proteína ST2, conforme descrito no Exemplo 1.

Os resultados são mostrados nas Figuras 1-2 e demonstram que níveis elevados de ST2, por exemplo, acima dos 0,2 ng/ml de soro quando determinado conforme descrito no Exemplo 1, podem ser utilizados para prever uma probabilidade da presença de doença pulmonar, por exemplo, em sujeitos sem insuficiência cardíaca descompensada aguda, por exemplo, com níveis baixos ou moderados de BNP.

Exemplo 4: Concentrações de ST2 elevadas em pacientes sem Insuficiência cardíaca

As concentrações de ST2 foram determinadas conforme descrito no Exemplo 1, anterior, numa população de 350 pacientes que se apresentaram na ED com dor no peito. Foram obtidas amostras de soro e foram feitas medições de ST2 na linha de base e 90 e 180 minutos mais tarde para a maioria dos pacientes. Também para a maioria dos pacientes, a amostra de base foi recolhida nas 2 horas após o aparecimento dos sintomas.

17 pacientes com diagnóstico final de MI e 5 desses tinham $\text{ST2} > 0,23$ (0,25 - 0,65). Dois destes pacientes eram negativos à troponina. 11 pacientes apresentaram níveis muito elevados de ST2 (0,97 - 9,22), mas nenhum desses pacientes tiveram diagnóstico final confirmado de MI e todos eram negativos à troponina, apesar de todos terem doenças severas, incluindo COPD, linfoma, sépsia, alcoolismo e embolismo pulmonar. Os níveis de ST2 e diagnósticos para estes 11 pacientes são mostrados no Quadro 3; ST2 1 é o nível base, ST2 2 é 90 minutos mais tarde e ST2 3 é aos 180 minutos.

Quadro 3: Pacientes não MI com elevados níveis de ST2

Paciente	ST2 ¹ (linha de base) (ng/ml)	ST2 2 (90 mins) (ng/ml)	ST2 ³ (180 Mins) (ng/ml)	Diagnóstico Final
811	1,43	1,62	1,63	COPD com insuficiência cardíaca após cirurgia de enxerto de desvio da artéria coronária e hipertensão pulmonar
847	2,37	4,44	3,53	Embolismo pulmonar
873	2,36	2,42	2,74	Doença das vias respiratórias reativa (RAD)
898	1,32	1,24	1,66	História de insuficiência cardíaca após cirurgia de desvio da artéria coronária
920	6,03	9,22		Sépsia por bacteremia
928	3,80	4,69	3,99	Hipertensão e alcoolismo
952	6,76			Alcoolismo, gastrite e hipertensão pulmonar
953	3,77			História de insuficiência cardíaca após cirurgia de desvio da artéria coronária
1055	1,42	1,28	1,13	Infeção respiratória superior (URI)
1213	0,97	1,19	1,07	Embolismo pulmonar e pericardite
1245	4,11	6,46		e hipertensão
1280	1,30	1,33		COPD

Estes resultados demonstram que a presença de ST2 elevado (por exemplo, acima de 0,2 ng/ml) em pacientes com dor no peito que são negativos à troponina está associada a uma elevada probabilidade de doença pulmonar.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 20040121343 A [0005]
- US 6176962 B [0039]
- US 6517234 B [0039]
- US 20030124624 A [0047]
- US 20040048286 A [0047] [0057]
- US 20050130136 A [0047] [0057]
- US 20050250156 A [0047]
- US 20050203046 A [0051] [0053]
- US 2005020304 A [0069]

Documentos de não patente citados na descrição

- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1989, 6.3.1-6.3.6 [0037]
- **LE DOUSSAL et al.** *New Engl. J. Med.*, 1991, vol. 146, 169-175 [0039]
- **GIBELLINI et al.** *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 3891-3898 [0039]
- **HSING; BISHOP.** *New Engl. J. Med.*, 1999, vol. 162, 2804-2811 [0039]
- **EVERTS et al.** *New Engl. J. Med.*, 2002, vol. 168, 883-889 [0039]
- **MANIATIS et al.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982 [0040]
- **SAMBROOK ; RUSSELL.** *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0040]
- **WU.** *Recombinant DNA.* Academic Press, 1993, vol. 217 [0040]

- **AUSBEL et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc, 2001, vol. 1-4 [0040]
- **KIESER et al.** *FEBS Lett.*, 1995, vol. 372 (2-3), 189-93 [0043]
- **KUMAR et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270 (46), 27905-13 [0043]
- **YANAGISAWA et al.** *FEBS Lett.*, 1992, vol. 302 (1), 51-3 [0043]
- **KUROIWA et al.** *Hybridoma*, 2000, vol. 19 (2), 151-9 [0043]
- **WEINBERG et al.** *Circulation*, 2002, vol. 106 (23), 2961-6 [0043]
- **WEINBERG et al.** *Circulation*, 2003, vol. 107 (5), 721-6 [0043]
- **SHIMPO et al.** *Circulation*, 2004, vol. 109 (18), 2186-90 [0043]
- **LOHNING et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, vol. 95 (12), 6930-5 [0044]
- **SCHMITZ et al.** *Immunity*, 2005, vol. 23 (5), 479-90 [0044] [0051] [0053]
- **BRINT et al.** *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5 (4), 373-9 [0044]
- **BRUNEAU et al.** *Cardiovasc. Res.*, 1994, vol. 28 (10), 1519-25 [0044]
- **TOMINAGA.** *FEBS Lett.*, 1989, vol. 258, 301-304 [0045]
- **TOMINAGA et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, vol. 1171, 215-218 [0045]
- **BAEKKEVOLD et al.** *Am. J. Path.*, 2003, vol. 163, 69-79 [0052]
- **MEHRA et al.** *J Am Coll Cardiol.*, 2004, vol. 43 (9), 1590-1595 [0056]
- **SILVER et al.** *Cong. Heart Fail.*, 2004, vol. 10 (5), 1-30 [0056]
- **DHALLA et al.** *Mol. Cell Biochem.*, 1989, vol. 87, 85-92 [0057]
- **MOE et al.** *Am. Heart J.*, 2000, vol. 139, 587-95 [0057]

Lisboa, 13 de Julho de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método *in vitro* de fazer um diagnóstico diferencial entre doença cardiovascular (CVD) e doença pulmonar (PD) num sujeito com dor no peito ou dispneia, compreendendo o método:
 - determinar um nível de ST2 solúvel (Recetor tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1)) numa amostra de um sujeito;
 - determinar um nível de péptido natriurético cerebral (BNP) na amostra; e
 - comparar o nível de ST2 solúvel a um nível de referência de ST2 solúvel num sujeito que não tem CVD nem PD, tem uma elevada probabilidade de ter PD ou CVD, ou tem CVD e/ou PD;
 - comparar o nível de BNP na amostra a um nível limiar baixo de BNP de 100 pg/mL e um nível limiar alto de BNP de 500 pg/mL;
 - e
 - diagnosticar um sujeito com dor no peito ou dispneia, um nível de ST2 solúvel inferior ao nível de referência de ST2 solúvel, e um nível de BNP igual a ou superior a 100 pg/mL como tendo CVD;
 - diagnosticar um sujeito com dor no peito ou dispneia, um nível de ST2 igual a ou superior ao nível de referência de ST2 solúvel, e um nível de BNP que é igual ou inferior a 500 pg/mL como tendo PD; ou
 - diagnosticar um sujeito com dor no peito ou dispneia, um nível de ST2 igual a ou superior ao nível de referência de ST2 solúvel, e um nível de BNP superior a 500 pg/mL como tendo CVD;em que a amostra compreende sangue, soro ou plasma.
2. O método da reivindicação 1, em que determinar um nível de ST2 solúvel ou o nível de BNP na amostra compreende contactar uma composição ligante com a amostra, em que a composição ligante se liga especificamente a ST2 solúvel ou BNP, e medir ou determinar a ligação específica da composição ligante à amostra.

3. O método da reivindicação 2, em que a composição ligante compreende um anticorpo que se liga especificamente a ST2 solúvel ou BNP.

4. O método da reivindicação 1, em que a CVD é síndrome coronário agudo (ACS), enfarte do miocárdio, insuficiência cardíaca, angina, hipertrofia cardíaca, miocardite, pericardite, endocardite ou acidente vascular cerebral.

5. O método da reivindicação 1, em que a PD é doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), asma, pneumonia, pneumotórax, efusão pleural, doença metastática, edema pulmonar, doença do refluxo gastroesofágico com aspiração, embolismo pulmonar ou doença pulmonar restritiva.

6. O método da reivindicação 1 ou 2, compreendendo ainda determinar um nível na amostra de um ou mais outros biomarcadores.

7. O método da reivindicação 6, em que dito um ou mais outros biomarcadores são selecionados do grupo que consiste em: creatina quinase MB (CK-MB), proteína reativa C (CRP), creatinina e D-dímeros.

Lisboa, 13 de Julho de 2015

RESUMO

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE DOENÇA PULMONAR E CARDIOVASCULAR

São descritos métodos e kits para determinar a probabilidade da presença de doença cardiovascular (CVD) ou doença pulmonar (PD) num sujeito utilizando ST2/Recetor tipo 1 da Interleucina 1 (IL1RL1) e/ou Interleucina 33 (IL-33) e um biomarcador para CVD, por exemplo, um péptido natriurético, por exemplo, péptido natriurético cerebral (BNP), pró-hormona BNP (proBNP), proBNP N-Terminal (NT-proBNP), péptido natriurético atrial (ANP), proANP ou NT-proANP.

Figura 1

Estatísticas

		ST2 não HF não COPD	ST2 não HF COPD	st2 não HF	ST2 HF não COPD	ST2 HF COPD	ST2 CHF
N	Válido	224	161	385	155	53	208
	Em falta	375	438	214	444	545	391
Mediana		0,1220	0,2305	0,1448	0,4944	0,5532	0,5033
Percentis	25	0,0502	0,0823	0,0622	0,2393	0,2819	0,2671
	75	0,2232	0,6555	0,4227	1,1287	1,9560	1,2254

P<0,001

P=0,10

P<0,001

Figura 2

