

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 343**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2007 E 07761742 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2019965**

54 Título: **Diagnóstico diferencial entre enfermedad pulmonar y cardiovascular**

30 Prioridad:

02.05.2006 US 797285 P

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

04.08.2015

73 Titular/es:

**CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
140 WEST 57TH, SUITE 3B
NEW YORK, NEW YORK 10019, US**

72 Inventor/es:

**SNIDER, JAMES, V. y
JACOBSON, SVEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 542 343 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico diferencial entre enfermedad pulmonar y cardiovascular

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos para determinar la probabilidad de presencia de enfermedad cardiovascular (ECV) o enfermedad pulmonar (EP) en un sujeto usando ST2 (que también se conoce como receptor similar 1 de interleucina 1 (IL1RL1)) y un marcador diagnóstico, por ejemplo, un péptido natriurético, por ejemplo, péptido natriurético del cerebro (BNP).

Antecedentes

Los síntomas no específicos, tales como disnea y dolor de pecho son un problema común en el ámbito de la atención primaria ambulatoria. Establecer un diagnóstico puede ser un reto ya que el diagnóstico diferencial puede incluir múltiples categorías diagnósticas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y pulmonares. Los trastornos subyacentes pueden variar desde afecciones benignas (por ejemplo, hiperventilación) a enfermedades más graves e incluso con riesgo de muerte (por ejemplo, embolismo pulmonar o insuficiencia cardíaca), que se abordan mejor en un departamento de emergencias. La evaluación a tiempo, el diagnóstico preciso, y el comienzo de la terapia adecuada juegan un papel crítico para optimizar el tratamiento y la recuperación del paciente.

Weinberg et al., (2003) describen un estudio para probar la hipótesis de que los niveles de ST2 soluble en el suero de pacientes con insuficiencia cardíaca grave aumentan en pacientes con activación neurohormonal. Los resultados del estudio sugirieron que ST2 soluble en suero es un nuevo biomarcador para activación neurohormonal en pacientes con insuficiencia cardíaca y que además, en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica de clase III a IV de la NYHA, el cambio en los niveles de ST2 es predictivo independiente de la mortalidad o trasplante posteriores.

Shimpo et al., (2004) describen un estudio para probar la hipótesis de que los niveles de ST2 en suero están asociados con el riesgo de muerte o de insuficiencia cardíaca en pacientes que presentan infarto de miocardio con elevación de ST (STEMI). Los resultados de este estudio sugirieron que los niveles en suero de ST2 predicen la mortalidad y la insuficiencia cardíaca en pacientes con infarto agudo de miocardio.

El documento US 2004/0121343 describe métodos y composiciones capaces de determinar la presencia o ausencia de una, preferentemente una pluralidad, de enfermedades, incluyendo embolismo pulmonar e insuficiencia cardíaca que muestran uno o más síntomas similares que pueden incluir disnea.

Sumario

La presente invención incluye un método *in vitro* para efectuar un diagnóstico diferencial entre enfermedad cardiovascular (ECV) y enfermedad pulmonar (EP) en un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, comprendiendo el método:

determinar un nivel de ST2 soluble (receptor similar 1 de interleucina 1 (IL1RL1)) en una muestra de un sujeto; determinar un nivel de péptido natriurético del cerebro (BNP) en la muestra; y
 45 comparar el nivel de ST2 soluble con un nivel de referencia de ST2 soluble en un sujeto que no tiene ni ECV ni EP, que tiene una elevada probabilidad de tener EP o ECV o que tiene ECV y/o EP;
 comparar el nivel de BNP en la muestra para permitir un nivel umbral bajo de BNP de 100 pg/ml y un nivel umbral alto de BNP de 500 pg/ml; y
 50 diagnosticar que un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, un nivel de ST2 soluble menor que el nivel de referencia de ST2 soluble y un nivel de BNP mayor o igual a 100 pg/ml, padece ECV;
 diagnosticar que un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, un nivel de ST2 soluble mayor o igual que el nivel de referencia de ST2 soluble y un nivel de BNP que es menor o igual a 500 pg/ml, padece EP; o
 diagnosticar que un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, un nivel de ST2 soluble mayor o igual que el nivel de referencia de ST2 soluble y un nivel de BNP mayor que 500 pg, padece ECV; en donde la muestra comprende sangre, suero, o plasma.

También se describe en el presente documento obtener opcionalmente una muestra biológica del sujeto; determinar un nivel de un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en SST2 y/o IL-33 en dicha muestra; determinar un nivel de un segundo biomarcador para una enfermedad cardiovascular (ECV) en la muestra; y comparar los niveles del primer y el segundo biomarcador en la muestra con valores de referencia. Los niveles de los biomarcadores en la muestra comparados con los niveles de referencia se correlaciona con (es decir, está correlacionado estadísticamente con) la probabilidad de que el sujeto tenga una enfermedad pulmonar o una ECV. En algunos aspectos, el sujeto tiene un síntoma no específico, por ejemplo, disnea o dolor de pecho, lo que sugiere un diagnóstico de una enfermedad pulmonar o de una ECV, y los niveles del biomarcador indican cuál de las dos enfermedades padece el sujeto, en caso de padecerlas.

El biomarcador de ECV es un biomarcador que es diagnóstico para una afección cardiovascular. El marcador de ECV puede ser un péptido natriurético (NP), por ejemplo, un péptido natriurético del cerebro (BNP), una prohormona BNP (proBNP), proBNP N-terminal (NT-proBNP), péptido natriurético auricular (ANP), proANP, o NT-proANP. En un aspecto, el biomarcador de ECV es BNP.

5 La muestra biológica puede comprender sangre, suero, plasma, orina, o tejido corporal. En un aspecto, la muestra es una muestra de suero.

10 En algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento, los niveles de referencia representan niveles en un sujeto que no tiene una ECV o una EP. En algunos aspectos, los niveles de referencia representan niveles en un sujeto que tiene una ECV. En algunos aspectos, los niveles de referencia representan niveles en un sujeto que tiene una EP, o tanto una EP como una ECV.

15 Determinar un nivel de un biomarcador en la muestra puede incluir poner en contacto una composición de unión con la muestra, donde la composición de unión se une específicamente al biomarcador, y medir o determinar la unión específica de la composición de unión a la muestra. Las composiciones de unión adecuadas incluyen anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido biomarcador y sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente a un polinucleótido que codifica un biomarcador.

20 En algunos aspectos, el sujeto tiene disnea y la ECV diagnosticada mediante un método descrito en el presente documento es insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria (EAC), arritmia, pericarditis, infarto agudo de miocardio, o anemia.

25 En algunos casos, el sujeto tiene disnea y la enfermedad pulmonar diagnosticada mediante los métodos descritos en el presente documento es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonía, neumotórax, embolismo pulmonar, efusión pleural, enfermedad metastásica, edema pulmonar, enfermedad de reflujo gastroesofágico con aspiración, o enfermedad pulmonar restrictiva.

30 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento también incluyen determinar un nivel en la muestra de otros uno o más biomarcadores adicionales, por ejemplo, biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en troponina, mioglobina, creatinina cinasa MB (CK-MB), albúmina modificada por isquemia (IMA), interleucina-6 (IL-6), proteína C reactiva (CRP), creatinina, dímeros D, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de función hepática, albúmina, y endotoxina bacteriana.

35 También se describen en el presente documento kits para diagnosticar enfermedades pulmonares. Los kits incluyen uno o más anticuerpos separados que se unen cada uno específicamente a un biomarcador usado en los métodos descritos en el presente documento, y/o una sonda oligonucleotídica que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica dichos biomarcadores, e instrucciones para su uso en un método descrito en el presente documento.

40 También se describen en el presente documento kits para determinar la probabilidad de la presencia de enfermedad cardiovascular (ECV) o de enfermedad pulmonar (EP) en un sujeto. Los kits incluyen (i) uno o ambos de una composición de unión que se une específicamente a IL-33 y una composición de unión que se une específicamente a ST2, (ii) una composición de unión que se une a un biomarcador de ECV, y (iii) instrucciones para su uso en un método para determinar la probabilidad de la presencia de ECV o de EP en un sujeto descrito en el presente documento. La IL-33 y/o ST2 y el biomarcador de ECV pueden comprender polipéptidos, y la composición de unión incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cada uno de los polipéptidos. En algunos aspectos, la IL-33 y/o ST2 y el biomarcador de ECV pueden comprender un ácido nucleico o una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a cada uno de los ácidos nucleicos.

50 Una "enfermedad cardiovascular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno del corazón y de los vasos sanguíneos, e incluye trastornos de las arterias, venas, arteriolas, vénulas y capilares. Las enfermedades cardiovasculares diagnosticadas mediante un método descrito en el presente documento pueden incluir insuficiencia cardíaca congestiva (IC), enfermedad de la arteria coronaria (EAC), arritmia, pericarditis, e infarto agudo de miocardio (IM).

55 Una "enfermedad pulmonar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno de los pulmones. Las enfermedades pulmonares diagnosticadas mediante los métodos descritos en el presente documento pueden incluir enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonía, neumotórax, embolismo pulmonar, efusión pleural, enfermedad metastásica, edema pulmonar, enfermedad de reflujo gastroesofágico con aspiración, y/o enfermedad pulmonar restrictiva.

60 "Regulado positivamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión aumentada de un gen y/o su polipéptido codificado. La "expresión aumentada" se refiere a un aumento (es decir, hasta un alcance detectable) en la replicación, transcripción, y/o traducción de un gen, por ejemplo, ST2, ya que la regulación positiva de cualquiera de estos procesos da como resultado un aumento en la concentración/cantidad del polipéptido codificado por el gen. Por el contrario, la "regulación negativa" o la "expresión disminuida", tal como se usa en el presente

documento, se refieren a una reducción en la replicación, transcripción, y/o traducción del gen y/o su polipéptido codificado. La regulación positiva o la regulación negativa de la expresión génica puede determinarse directamente detectando un aumento o una disminución, respectivamente, en el nivel de ARNm para el gen, o el nivel de expresión proteica del polipéptido codificado por el gen, usando cualquier medio conocido en la técnica, tal como métodos de hibridación de ácidos nucleicos o de detección con anticuerpos, respectivamente, y en comparación con controles. La "expresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión de un ácido nucleico y/o de un polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano. En general, los ácidos nucleicos y polipéptidos humanos, o las moléculas de ácido nucleico o polipéptidos sintetizados o generados tienen secuencias basadas en una secuencia de ácido nucleico o de polipéptido humana correspondiente, se prefieren para su uso para diagnosticar a sujetos humanos.

Tal como se usa en el presente documento, una "muestra" incluye uno o más de sangre, suero, plasma, orina, y tejido corporal. En algunos aspectos, una muestra es una muestra de suero o sangre.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia a la cual pertenece esta divulgación. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la presente divulgación. También pueden usarse otros métodos y materiales conocidos en la técnica. Los materiales, métodos, y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una tabla que ilustra el efecto del historial de EPOC en las concentraciones de ST2 en sujetos con/sin IC aguda.

La FIG. 2 es un diagrama de cajas que ilustra los niveles de ST2 en sujetos con EPOC/asma y/o IC.

Descripción detallada

El diagnóstico preciso de sujetos que presentan síntomas no específicos puede ser difícil, ya que los síntomas pueden tener una etiología muy diferente. Por ejemplo, los sujetos con disnea (falta de aliento, o respiración incómoda) pueden padecer una enfermedad pulmonar o una enfermedad cardiovascular, ambas o ninguna.

Metodología general

En general, los métodos descritos en el presente documento incluyen evaluar los niveles de un primer biomarcador (ST2 y/o IL-33) y un segundo biomarcador de ECV (por ejemplo, un péptido natriurético (NP)) en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre, suero, plasma, orina, o de tejido corporal) de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Estos niveles pueden proporcionar información diagnóstica, por ejemplo, que indica si el sujeto tiene una enfermedad pulmonar (EP) o una enfermedad cardiovascular (ECV), tal como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el segundo biomarcador es un péptido natriurético del cerebro (BNP).

En un ejemplo, el diagnóstico de ECV frente a EP puede efectuarse por referencia a la Tabla 1.

Tabla 1: Diagnóstico de ECV frente a EP

	ST2 bajo (por ejemplo, < 0,20 ng/ml de suero)	ST2 elevado (por ejemplo, > 0,20 ng/ml de suero)
BNP bajo (< 100 pg/ml)	baja probabilidad de ECV o EP	EP probable
BNP moderado (100-500 pg/ml)	ECV posible	EP posible
BNP alto (> 500 pg/ml)	ECV probable	ECV elevadamente probable

Por lo tanto, para un sujeto que tiene tanto niveles bajos de un biomarcador de ECV, por ejemplo, BNP, como niveles

bajos de ST2, hay una probabilidad baja de presencia de ECV o de EP. Los niveles bajos del biomarcador de ECV y niveles altos de ST2 indican una mayor probabilidad de EP que de ECV.

5 Para un sujeto que tiene niveles moderados de BNP, los niveles bajos de ST2 indican que la presencia de ECV es posible (y más probable que de EP), mientras que los niveles altos de ST2 indican que la presencia de EP es posible (y más probable que de ECV).

10 Finalmente, para un sujeto que tiene niveles altos de un biomarcador de ECV, niveles bajos de ST2 indican que ECV es probable (y más probable que de EP), y niveles altos de ST2 indican que ECV es elevadamente probable (y más probable que de EP).

15 Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden incluirse o descartarse diagnósticos para un sujeto dado, permitiendo al profesional sanitario centrar los esfuerzos diagnósticos, y por lo tanto los esfuerzos terapéuticos de manera adecuada. Aunque es posible que ambas etiologías existan simultáneamente en un sujeto, en cualquier punto temporal (y particularmente en una situación de cuidados agudos, tal como presentación de disnea) es probable que una etiología sea más "dominante" que la otra, y por lo tanto sería el objetivo principal de tratamiento.

20 Los niveles de los biomarcadores pueden determinarse una vez, por ejemplo, en su presentación. En algunos aspectos, los niveles de los biomarcadores se determinan a una cualquiera o más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 18, y/o 24 horas, y/o a los 1-7 días o más después de la aparición de los síntomas.

25 En los casos donde los niveles de los biomarcadores se determinan más de una vez, puede usarse el nivel más alto o un promedio, o puede determinarse y usarse el cambio en los niveles. Los niveles de los biomarcadores también pueden determinarse varias veces para evaluar la respuesta de un sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, los niveles, por ejemplo, de IL-33 y/o ST2, que se toman después de la administración de un tratamiento, por ejemplo, una o más dosis o ciclos de tratamiento, pueden compararse con los niveles tomados antes de que se iniciase el tratamiento, por ejemplo, niveles basales. El cambio en los niveles podría indicar si el tratamiento fue eficaz; por ejemplo, una reducción en los niveles podría indicar que el tratamiento fue eficaz.

30 La evaluación de los niveles del biomarcador en un sujeto incluye normalmente obtener una muestra biológica, por ejemplo, suero o sangre del sujeto. Los niveles de los biomarcadores en la muestra pueden determinarse midiendo los niveles de polipéptidos biomarcadores en la muestra, usando métodos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, por ejemplo, inmunoensayos, tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Como alternativa, pueden medirse los niveles de ARNm que codifica los biomarcadores, nuevamente usando métodos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, por ejemplo, mediante PCR cuantitativa o análisis de transferencia de Northern.

35 Por ejemplo, un método tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, para el diagnóstico diferencial de enfermedad pulmonar, puede incluir poner en contacto una muestra de un sujeto, por ejemplo, una muestra que incluye sangre, suero, plasma, orina, o tejido corporal del sujeto, con una composición de unión (por ejemplo, un anticuerpo o sonda oligonucleotídica) que se une específicamente a un polipéptido o ácido nucleico de los biomarcadores, tal como se describen en el presente documento. Los métodos también pueden incluir poner en contacto una muestra de un sujeto de control, un sujeto normal, o un tejido normal o fluido del sujeto de ensayo, con la composición de unión, por ejemplo, para proporcionar una referencia o control. Además, el método puede incluir adicionalmente comparar la unión específica de la composición al sujeto de ensayo con la unión específica de la composición al sujeto normal, sujeto de control, o un tejido normal o fluido del sujeto de ensayo. La expresión o la actividad de los biomarcadores en una muestra de ensayo o sujeto de ensayo también pueden compararse con el de una muestra de control o sujeto de control. Una muestra de control puede incluir, por ejemplo, una muestra de un sujeto no afectado, o de un sujeto que tiene una afección conocida, por ejemplo, una enfermedad pulmonar o una enfermedad cardiovascular. La expresión o actividad de un sujeto de control o de una muestra de control puede proporcionarse como un valor predeterminado, por ejemplo, adquirido a partir de un grupo estadísticamente adecuado de sujetos de control.

40 Un anticuerpo que "se une específicamente a" un antígeno, se une preferentemente al antígeno en una muestra que contiene otras proteínas. El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o a una porción inmunológicamente activa de la misma, es decir, una porción de unión a antígeno. Los ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab)₂ que pueden generarse tratando al anticuerpo con una enzima, tal como pepsina. El anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado, completamente humano, no humano, por ejemplo, murino, monoespecífico o monocatenario. En algunos aspectos, tiene función efectora y puede fijarse a complemento.

45 Una "sonda oligonucleotídica" (también citada simplemente como una "sonda") es un ácido nucleico que tiene al menos 10, y menos de 200 (normalmente menos de 100 o 50) pares de bases de longitud. Una sonda que "se une específicamente a" un ácido nucleico diana hibrida con la diana en condiciones de elevada rigurosidad. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "hibrida en condiciones de elevada rigurosidad" describe condiciones para

hibridación y lavado. Tal como se usa en el presente documento, las condiciones de elevada rigurosidad son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados con SSC 0,2 X, SDS al 1 % a 65 °C. Los métodos para llevar a cabo ensayos de hibridación de ácidos nucleicos se conocen por los expertos en la materia y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

La detección puede facilitarse por acoplamiento (es decir, unión física) del anticuerpo o sonda a una sustancia detectable (es decir, marcado de anticuerpos). Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, puntos cuánticos, o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina, y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Pueden usarse ensayos diagnósticos con matrices biológicas, tales como células vivas, extractos celulares, lisados celulares, células fijadas, cultivos celulares, fluidos corporales o muestras forenses. Los anticuerpos conjugados útiles para fines diagnósticos o de kit incluyen anticuerpos acoplados a colorantes, isótopos, enzimas, y metales, véase, por ejemplo, Le Doussal et al., *New Engl. J. Med.* 146:169-175 (1991); Gibellini et al., *J. Immunol.* 160:3891-3898 (1998); Hsing y Bishop, *New Engl. J. Med.* 162:2804-2811 (1999); Everts et al., *New Engl. J. Med.* 168:883-889 (2002). Existen varios formatos de ensayo, tales como radioinmunoensayo (RIA), ELISA, y de "laboratorio en un chip" (Patentes de Estados Unidos N° 6.176.962 y 6.517.234).

Pueden usarse técnicas conocidas en bioquímica y en biología molecular en los métodos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Wu, *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif (1993); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volúmenes 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, N.Y. (2001)).

Una vez se ha determinado el nivel de un biomarcador, puede compararse el nivel con un nivel de referencia. En algunos aspectos, el nivel de referencia representará un nivel umbral, por encima del cual puede diagnosticarse al sujeto con ECV o con una enfermedad EP. El nivel de referencia seleccionado puede depender de la metodología empleada para medir los niveles de los biomarcadores. En algunos aspectos, el nivel de referencia es un intervalo de niveles.

También se describe en el presente documento que pueden determinarse los niveles tanto de ST2 como de IL-33, y la información de la comparación de ambos biomarcadores con sus respectivos niveles de referencia proporciona información acumulativa referente a la presencia de enfermedad pulmonar en el sujeto, y/o la presencia de una enfermedad grave en el sujeto. En algunos aspectos, puede determinarse la proporción de ST2 a IL-33, y compararse la proporción con una proporción de referencia que representa una proporción umbral por encima de la cual el sujeto tiene ECV o EP, por ejemplo, tal como se muestra en la Tabla 1.

ST2/receptor similar 1 de interleucina 1 (IL1RL1)

El gen ST2 es un miembro de la familia de receptor de interleucina 1, cuyo producto proteico existe tanto como en una forma transmembrana, como en una forma de receptor soluble que es detectable en suero (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)). Se ha descrito que ST2 estaba regulado positivamente de manera destacada en un modelo experimental de insuficiencia cardíaca (Weinberg et al., *Circulation* 106(23):2961-6 (2002)), y los resultados preliminares sugieren que las concentraciones de ST2 pueden estar elevadas en aquellos con IC severa crónica (Weinberg et al., *Circulation* 107(5):721-6 (2003)) así como en aquellos con infarto agudo de miocardio (IM) (Shimpo et al., *Circulation* 109(18):2186-90 (2004)).

Se cree que la forma transmembrana de ST2 juega un papel en la modulación de las respuestas de linfocitos T colaboradores de 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)), y puede jugar un papel en el desarrollo de tolerancia en estados de inflamación grave o crónica (Brin et al., *Nat. Immunol.* 5(4):373-9 (2004)), mientras que la forma soluble de ST2 está regulada positivamente en fibroblastos estimulados por crecimiento (Yanagisawa et al., 1992, anteriormente citado). Los datos experimentales sugieren que el gen ST2 está regulado positivamente de manera destacada en estados de estiramiento de miocitos (Weinberg et al., 2002, anteriormente citado) de una manera análoga a la inducción del gen BNP (Bruneau et al., *Cardiovasc. Res.* 28(10):1519-25 (1994)).

Tominaga, *FEBS Lett.* 258:301-304 (1989), aisló genes murinos que se expresaban específicamente por estimulación de crecimiento en células BALB/c-3T3; denominaron uno de estos genes St2 (para gen expresado por estimulación de

crecimiento 2). El gen ST2 codifica dos productos proteicos: ST2 (IL1RL1), que es una forma soluble secretada; y ST2L, una forma de receptor transmembrana que es muy similar a los receptores de interleucina 1. El Comité de Nomenclatura HUGO denominó al homólogo humano, cuya clonación se describió en Tominaga et al., Biochim. Biophys. Acta. 1171:215-218 (1992), como receptor similar 1 de interleucina 1 (IL1RL1). Los dos términos (ST2 e IL1RL1) se usan de manera indistinta en el presente documento.

La secuencia de ARNm de la isoforma más corta soluble de ST2 humana puede encontrarse en GenBank, N° de referencia NM_003856.2, y la secuencia polipeptídica se encuentra en GenBank, N° de referencia NP_003847.2; la secuencia de ARNm para la forma más larga de ST2 humana se encuentra en GenBank, N° de referencia NM_016232.4; la secuencia polipeptídica se encuentra en GenBank, N° de referencia NP_057316.3. Hay información adicional en las bases de datos públicas en GeneID: 9173, N° de ID MIM 601203, y UniGene N° Hs.66. En general, en los métodos descritos en el presente documento, se mide la forma soluble del polipéptido ST2.

Se conocen en la técnica métodos para detectar y medir ST2, por ejemplo, tal como se describen en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2003/0124624, 2004/0048286 y 2005/0130136. También hay disponibles comercialmente kits para medir polipéptido de ST2, por ejemplo, el kit de ELISA de ST2 fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), N° 7638. Además, se describen dispositivos para medir ST2 y otros biomarcadores en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0250156.

En un aspecto, el nivel de ST2 se determina una vez, por ejemplo, en su presentación. En algunos aspectos, el nivel de ST2 se determina a las una o más de 2, 4, 6, 8, 12, 18, y/o 24 horas, y/o 1-7 días después de la aparición de los síntomas.

También se describe en el presente documento que el nivel de ST2 puede determinarse más de una vez; en este caso, puede usarse la medida más alta. En los casos donde se determina el nivel de ST2 más de una vez, puede usarse el nivel más alto, o puede determinarse y usarse el cambio en los niveles. Los niveles de ST2 también pueden determinarse varias veces para evaluar la respuesta de un sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, un nivel de ST2 obtenido después de la administración de un tratamiento, por ejemplo, una o más dosis o ciclos de tratamiento, pueden compararse con los niveles de ST2 tomados antes de que se iniciase el tratamiento, por ejemplo, un nivel basal. El cambio en los niveles de ST2 podría indicar si el tratamiento fue eficaz; por ejemplo, una reducción en los niveles de ST2 podría indicar que el tratamiento fue eficaz.

Los métodos también puede incluir determinar la identidad de la secuencia nucleotídica en RefSNP ID: rs1041973.

Interleucina-33 (IL-33)

Se ha identificado recientemente a IL-22 como el ligando de ST2, y se ha descrito la presencia de niveles aumentados de IL-33 en varios trastornos inflamatorios (véase Schmitz et al., Immunity 23(5):479-90 (2005); Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0203046). En los métodos descritos en el presente documento, puede medirse ST2 además de IL-33. También puede determinarse la proporción de ST2 a IL-33, así como las proporciones de complejos unidos a y/ unidos. La proteína IL-33 se expresa como una molécula inactiva, pre-IL-33, que se activa después de la escisión por Caspasa 1, dando como resultado el péptido activo de IL-33 así como el producto peptídico de escisión, pro-IL-33. Por lo tanto, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir medir una, dos, o las tres de IL-33 madura, pre-IL-33, y/o pro-IL-33, todas ellas incluidas en el término "IL-33".

La secuencia de ácido nucleico de IL-33 puede encontrarse en GenBank con el N° de referencia NM_033439.2, y la secuencia polipeptídica se encuentra en GenBank, N° de referencia NP_0254274.1. Hay información adicional en las bases de datos públicas en GeneID: 90865, N° de ID MIM *608678, y UniGene N° Hs.348390. IL-33 también se conoce como Marco Abierto de Lectura 26 del Cromosoma 9 (C9ORF26); Factor Nuclear de Vénulas Endoteliales Altas (NFHEV); y como interleucina 33. Véase también Baekkevold et al., Am. J. Path. 163: 69-79 (2003).

Se conocen en la técnica métodos para medir los niveles de polipéptido y ácido nucleico de IL-33, véase, por ejemplo, Schmitz et al., Immunity 23(5):479-90 (2005); Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0203046.

Biomarcadores de ECV

Los métodos descritos en el presente documento incluyen medir los niveles de biomarcadores de ECV además de IL1RL1 (ST2) y/o IL-33. Los biomarcadores adecuados para ECV incluyen troponina, NT-proBNP, BNP NT-proANP, y ANP.

En algunos aspectos, el marcador diagnóstico de ECV es péptido natriurético de tipo B (BNP), un marcador de estrés hemodinámico característico de la insuficiencia cardíaca. Los niveles de BNP pueden determinarse, por ejemplo, en sangre completa o suero, usando metodología estándar. Por ejemplo, hay disponible comercialmente una serie de kits de ensayo, por ejemplo, la prueba Triage BNP (Biosite, Inc., San Diego, CA), un ensayo de punto de atención que usa sangre completa o plasma y produce resultados en aproximadamente 15 minutos; un inmunoensayo quimioluminiscente en sándwich (Bayer HealthCare Diagnostics, Tarrytown, NY) para BNP que se ejecuta en las

plataformas ADVIA Centaur y ACS:180; un inmunoensayo basado en micropartículas (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) para BNP que se ejecuta en la plataforma AxSYM; y un ensayo inmunoenzimático quimioluminiscente (Biosite, Inc., San Diego, CA) para BNP que se ejecuta en las siguientes plataformas de Beckman Coulter: Access, Access 2, Synchron LXI y UniCel DXI. Un ensayo electroquimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) disponible para medir NT-proBNP.

Los intervalos de referencia para BNP y NTproBNP varían dependiendo de una serie de factores. Los siguientes intervalos son para su uso cuando los niveles de BNP se miden usando un método de tipo ELISA, y un experto en la materia será capaz de determinar qué niveles obtenidos usando otros métodos son equivalentes. Si el nivel de BNP es > 500 pg/ml, entonces es muy probable la IC. Los niveles de BNP de 100-500 pg/ml se describen a menudo como una "zona gris" en la que el diagnóstico es menos certero. En sujetos delgados, si el BNP es < 100 pg/ml, entonces la IC es improbable, sin embargo, la obesidad influencia la expresión de BNP en IC crónica (Mehra et al., J Am Coll Cardiol. 43(9):1590-1595 (2004)), por lo que niveles < 100 pg/ml no descartan la insuficiencia cardíaca en sujetos obesos (Silver et al., Cong. Heart Fail. 10(5 supl. 3):1-30 (2004)).

Otros biomarcadores

También se describen en el presente documento métodos para medir los niveles de otros biomarcadores, por ejemplo, uno o más de: troponina, creatinina cinasa MB (CK-MB), mioglobina (Myo), albúmina modificada por isquemia (IMA), interleucina-6 (IL-6), proteína C reactiva (CRP), creatinina, dímeros D, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de función hepática, albúmina, y/o endotoxina bacteriana. Los métodos para medir estos biomarcadores se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0048286 y 2005/0130136 de Lee et al., Dhalla et al., Mol. Cell Biochem. 87:85-92 (1989); Moe et al., Am. Heart J. 139:587-95 (2000).

Kits

También se describen en el presente documento kits que incluyen un reactivo que comprende una composición de unión para la detección de uno o más de el o los polipéptidos o el ácido nucleico de IL-33 o ST2, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-33 o ST2 (es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33 o a ST2, o una sonda de ácido nucleico complementaria con la totalidad o parte del ácido nucleico de IL-33 o ST2), así como un reactivo que comprende una composición de unión para la detección de uno o más de un biomarcador de ECV, por ejemplo, un polipéptido biomarcador de ECV o un ácido nucleico que codifica un biomarcador de ECV, e instrucciones para su uso en un método descrito en el presente documento. También puede incluirse un control, por ejemplo, un epítipo de IL-33 o ST2, y del marcador de ECV.

Los kits están formados generalmente por los siguientes elementos principales: embalaje, reactivos que comprenden composiciones de unión tal como se describen anteriormente, opcionalmente un control, e instrucciones. El embalaje puede ser una estructura de tipo caja para albergar un vial (o una serie de viales) que contienen dichas composiciones de unión, un vial (o serie de viales) que contienen un control, e instrucciones para su uso en un método descrito en el presente documento. Los expertos en la materia pueden modificar fácilmente el embalaje para ajustarse a las necesidades individuales.

Como ejemplo, el kit puede contener un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a ST2 (o a IL-33), y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un biomarcador de ECV, por ejemplo, BNP, proBNP, NT-proBNP, ANP, proANP, o NT-proANP.

También se describe que puedan usarse otros métodos de detección, por ejemplo, ensayos colorimétricos, radioinmunoensayos, o ensayos quimioluminiscentes. También pueden usarse ensayos de sándwich, por ejemplo, usando dos anticuerpos monoclonales, uno marcado con yodo 125 y el otro adsorbido en perlas, por ejemplo, tal como se usa en el kit IRMA-BNP2 de CISBIO International (Francia) y los kits ShionoRIA BNP o ANP (SHIONOGI USA Inc.).

Por ejemplo, el kit puede diseñarse para su uso en un ensayo que es un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA), tales como los ensayos ARCHITECT de Abbott Diagnostics (Abbott Park, IL), y por lo tanto pueden contener micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-BNP, y micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-ST2. Estas micropartículas se ponen en contacto con una muestra, y la BNP y ST2 presentes en la muestra se unen a las micropartículas recubiertas. Opcionalmente, la muestra puede dividirse en al menos dos alícuotas, y puede ponerse en contacto cada tipo de micropartícula con una alícuota separada. Después de lavar, puede añadirse conjugado anti-BNP y anti-ST2 marcado con acridinio para crear una mezcla de reacción en la segunda etapa. Después de otro lavado, se añaden soluciones de preactivación y de activación a la mezcla de reacción. La reacción quimioluminiscente resultante se mide, por ejemplo, usando el sistema óptico ARCHITECT i (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois). Existe una relación directa entre la cantidad de BNP o ST2 en la muestra y la quimioluminiscencia detectada.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección y medida de ST2 en suero

ES 2 542 343 T3

Este ejemplo usa el kit ST2 ELISA fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), N° 7638. Este kit es un ensayo ELISA sándwich que utiliza anticuerpos monoclonales tanto para captura como para detección. Este procedimiento está pensado para analizar una placa completa de muestras ensayadas en replicados a un factor de dilución 1:3 y sigue estrechamente el protocolo del fabricante. Los kits deben almacenarse a 4 °C hasta su uso. El procedimiento descrito en este ejemplo está optimizado para suero o plasma humano recogido en tubos con anticoagulante de citrato o EDTA. No debe usarse en este ensayo plasma recogido en tubos con anticoagulante de heparina ya que la heparina se une a ST2 e inhibe la medida mediante este protocolo de ELISA. Las muestras de plasma o suero pueden usarse frescas o almacenadas congeladas. Este ensayo no se ve afectado negativamente por hasta 3 ciclos de congelación y descongelación de muestras de plasma.

Los reactivos deben prepararse frescos a partir de un nuevo kit inmediatamente antes de llevar a cabo los ensayos. El kit debe equilibrarse con la temperatura ambiente antes de su uso. Los reactivos no discutidos anteriormente de manera explícita se proporcionan por el fabricante listos para su uso.

1. Solución de lavado - la solución de lavado se proporciona por el fabricante en forma de una solución concentrada 10X. Para preparar 1 litro de solución de lavado se diluyen 100 ml del concentrado 10X en 900 ml de agua destilada.

2. Solución detectora - la solución detectora se prepara diluyendo el concentrado de detector a 1:101 con el diluyente detector. Para una placa de 96 pocillos completa de muestras se necesitan 10 ml de solución detectora. Para preparar 10 ml de solución detectora se usa una pipeta para transferir 10 ml del diluyente detector de color azul a un tubo de polipropileno de tapa naranja de 15 ml. Se añaden 100 µl del concentrado detector a este volumen de diluyente detector.

a. NOTA: este reactivo debe prepararse durante la primera etapa de incubación del ensayo.

3. Solución madre de calibrador - se reconstituye la proteína calibradora disolviendo la proteína liofilizada en la cantidad de agua destilada definida por el fabricante para este lote de fabricación para dar una solución madre de 8 ng/ml. Este volumen se incluye específicamente en el prospecto del producto.

Preparación de patrones y muestras:

• Todos los siguientes deben prepararse en tubos de polipropileno marcados de 1,5 ml para transferirse a la placa de ensayo con el pipeteador P200.

Patrones:

La curva patrón se prepara produciendo diluciones en serie dobles de la solución madre de 8 ng/ml.

1. Usando una pipeta P1000 se transfieren 250 µl del diluyente de ensayo a 8 tubos de polipropileno de 1,5 ml marcados con S1-S8.

2. Usando la misma pipeta P1000 se transfieren 250 µl de la solución madre de calibrador de 8 ng/ml al tubo S1. Este tubo es ahora de proteína calibradora de 4 ng/ml.

a. Se mezcla completamente pipeteando suavemente 3 veces con cuidado de no crear burbujas.

3. Usando la misma pipeta P1000 y una punta nueva para cada uno de los siguientes se transfieren 250 µl del reactivo en el tubo S1 al tubo S2, y se repite la mezcla.

4. Se repite la etapa 3 para S2 a S3, S3 a S4, S4 a S5, S5 a S6 y S6 a S7. S8 será el blanco de reactivo, por lo que no se transfiere la proteína de calibración a este pocillo.

a. Los tubos S1-S6 y S8 ahora tendrán 250 µl de reactivo y el tubo S7 tendrá 450 µl.

Muestras:

La placa se configura de tal modo que cada muestra se analiza como una dilución 1:3 en duplicado.

1. Se marca un tubo de polipropileno de 1,5 ml para cada muestra.

2. Usando la pipeta P200, se transfieren 160 µl de diluyente de ensayo a cada tubo.

3. Usando una pipeta P200 se transfieren 80 µl de suero o plasma de la muestra 1 al tubo 1. Se mezcla cuidadosamente pipeteando 3 veces sin hacer burbujas.

4. Se continúa transfiriendo las muestras a los tubos de muestra repitiendo la etapa 2 para cada muestra.

Procedimiento:

1. Se usa la pipeta P200 para transferir los patrones y las muestras de suero diluido rápidamente a una placa de

ensayo de 96 pocillos. Se muestra una disposición ilustrativa a continuación en la Tabla 2.

- a. Se ajusta la pipeta P200 a 100 µl.
 - b. Se transfieren 100 µl de las diluciones de la curva patrón a cada una de las columnas 1 y 2 en la placa de ensayo.
 - c. Se transfieren 100 µl de cada una de las muestras de suero a la placa de ensayo en las mismas posiciones exactas mostradas en el diagrama de la placa a continuación.
2. Se cubre la placa de ensayo con la cubierta proporcionada y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos.
 3. Usando el autolavador de placa, se lava la placa 4 veces.
 4. Detector: usando la pipeta multicanal de 8 canales se transfieren 100 µl de la solución detectora a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- a. NOTA: este reactivo tiene que prepararse durante la primera etapa de incubación.
 - b. NOTA: debe usarse un vaso de reactivo desechable para esta adición de reactivo. Hay que usar SIEMPRE un vaso de reactivo nuevo desechable para cada reactivo. No es necesario cambiar las puntas de la pipeta durante esta etapa.
5. Se lava la placa como en la etapa 3.
 6. Sustrato: usando la pipeta multicanal de 8 canales se transfieren 100 µl de sustrato a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- a. El reactivo de sustrato se proporciona por el fabricante listo para usar.
7. Parada: al final de la etapa de incubación de sustrato, se transfieren 100 µl de la solución de parada a cada pocillo usando la pipeta multicanal de 8 canales.
- a. El reactivo de solución de parada se proporciona por el fabricante listo para usar.
8. Se lee la placa a 450 nm con corrección de fondo a 620 nm.
- a. La placa debe leerse en los 30 minutos posteriores a la detención de la reacción.
9. Se introducen las lecturas de absorbancia en la hoja de cálculo proporcionada para su análisis.

Tabla 2: Mapa de placa de ensayo de 96 pocillos ejemplar

	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

Ejemplo 2: Detección y medida de IL-33 en suero

- 40 Se recoge una muestra de sangre de un sujeto, y se prepara suero de la muestra usando métodos convencionales. Se añade un anticuerpo monoclonal marcado para IL-33 (por ejemplo, tal como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/020304) a la muestra y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para que suceda la unión. Los complejos de anticuerpo/IL-33 se detectan entonces usando métodos convencionales, y se cuantifica la cantidad de IL-33 presente. Se espera que los niveles de IL-33 estén correlacionados con la enfermedad de una manera similar a ST2, tal como se describe en el presente documento.

Ejemplo 3: EPOC y concentraciones de ST2

- 50 El efecto del historial de EPOC en la concentración de ST2 en sujetos con/sin IC aguda se evaluó en sujetos del estudio PRIDE.

- 55 Se incluyeron en el estudio PRIDE 600 sujetos con falta de aliento para analizar la utilidad de NT-proBNP para el diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardíaca aguda (IC). En el momento de la inclusión, se obtuvo una muestra de sangre ciega, se procesó y se congeló a -80 °C. Para los fines del análisis de ST2, se descongeló una alícuota de sangre citrada (segundo ciclo de congelación-descongelación) y se analizó la concentración de proteína ST2 tal como

se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en las Figuras 1-2, y demuestran que los niveles elevados de ST2, por ejemplo, por encima de 0,2 ng/ml de suero cuando se determinaron como en el Ejemplo 1, pueden usarse para predecir la probabilidad de la presencia de enfermedad pulmonar, por ejemplo, en sujetos sin insuficiencia cardíaca aguda descompensada, por ejemplo, con niveles de BNP bajos o moderados.

Ejemplo 4: Concentraciones de ST2 elevadas en pacientes sin insuficiencia cardíaca

Las concentraciones de ST2 se determinaron tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior, en una población de 350 pacientes que se presentaron al ED con dolor de pecho. Se obtuvieron muestras de suero y se efectuaron las mediciones de ST2 iniciales, y a los 90 y 180 minutos posteriores para la mayoría de los pacientes. También para la mayoría de los pacientes, la muestra inicial se recogió dentro de las dos primeras horas tras la aparición de los síntomas.

17 pacientes tuvieron un diagnóstico final de IM, y 5 de estos tenían ST2 > 0,23 (0,25 - 0,65). Dos de estos pacientes fueron negativos a troponina. 11 pacientes tenían niveles de ST2 muy altos (0,97 - 9,22), pero ninguno de estos pacientes tuvo un diagnóstico final confirmado de IM y fueron todos ellos negativos a troponina, aunque todos tenían enfermedades graves, incluyendo EPOC, linfoma, septicemia, abuso del alcohol y embolismo pulmonar. Los niveles de ST2 y los diagnósticos para estos 11 pacientes se muestran en la Tabla 3; ST2 1 es el nivel basal, ST2 2 es 90 minutos después, y ST2 3 es a los 180 minutos.

Tabla 3: Pacientes no de IM con niveles de ST2 elevados

Paciente	ST2 1 (basal) (ng/ml)	ST2 2 (90 min) (ng/ml)	ST2 3 (180 min) (ng/ml)	Diagnóstico final
811	1,43	1,62	1,63	EPOC con insuficiencia cardíaca después de cirugía de injerto de endoprótesis en la arteria coronaria e hipertensión pulmonar
847	2,37	4,44	3,53	Embolismo pulmonar
873	2,36	2,42	2,74	Enfermedad de las vías respiratorias reactivas (EVRR)
898	1,32	1,24	1,66	Historial de insuficiencia cardíaca después de cirugía de endoprótesis en la arteria coronaria
920	6,03	9,22		Septicemia por bacteriemia
928	3,80	4,69	3,99	Hipertensión y abuso del alcohol
952	6,76			Abuso del alcohol, gastritis e hipertensión pulmonar
953	3,77			Historial de insuficiencia cardíaca después de cirugía de endoprótesis en la arteria coronaria
1055	1,42	1,28	1,13	Infección respiratoria superior (IRU)
1213	0,97	1,19	1,07	Embolismo pulmonar y pericarditis
1245	4,11	6,46		e hipertensión
1280	1,30	1,33		EPOC

Estos resultados demuestran que la presencia de ST2 elevado (por ejemplo, por encima de 0,2 ng/ml) en pacientes con dolor de pecho que son negativos a troponina se asocia con una elevada probabilidad de enfermedad pulmonar.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para efectuar un diagnóstico diferencial entre enfermedad cardiovascular (ECV) y enfermedad pulmonar (EP) en un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, comprendiendo el método:
- 10 determinar un nivel de ST2 soluble (receptor similar 1 de interleucina 1 (IL1RL1)) en una muestra de un sujeto; determinar un nivel de péptido natriurético del cerebro (BNP) en la muestra; y comparar el nivel de ST2 soluble con un nivel de referencia de ST2 soluble en un sujeto que no tiene ni ECV ni EP, tiene una elevada probabilidad de padecer EP o ECV, o tiene ECV y/o EP;
- 15 comparar el nivel de BNP en la muestra para permitir un nivel umbral bajo de BNP de 100 pg/ml y un nivel umbral alto de BNP de 500 pg/ml; y diagnosticar que un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, un nivel de ST2 soluble menor que el nivel de referencia de ST2 soluble y un nivel de BNP mayor o igual a 100 pg/ml, padece ECV;
- 20 diagnosticar que un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, un nivel de ST2 soluble mayor o igual que el nivel de referencia de ST2 soluble y un nivel de BNP que es menor o igual a 500 pg/ml, padece EP; o diagnosticar que un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, un nivel de ST2 soluble mayor o igual que el nivel de referencia de ST2 soluble y un nivel de BNP mayor que 500 pg, padece ECV; en donde la muestra comprende sangre, suero, o plasma.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que determinar un nivel de ST2 soluble o el nivel de BNP en la muestra comprende poner en contacto una composición de unión con la muestra, en donde la composición de unión se une específicamente a ST2 soluble o a BNP, y medir o determinar la unión específica de la composición de unión a la muestra.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, en el que la composición de unión comprende un anticuerpo que se une específicamente a ST2 soluble o a BNP.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la ECV es síndrome coronario agudo (SCA), infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, angina, hipertrofia cardíaca, miocarditis, pericarditis, endocarditis o ictus.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en el que la EP es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonía, neumotórax, efusión pleural, enfermedad metastásica, edema pulmonar, enfermedad de reflujo gastroesofágico con aspiración, embolismo pulmonar o enfermedad pulmonar restrictiva.
- 40 6. El método de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además determinar un nivel en la muestra de otros uno o más biomarcadores.
7. El método de la reivindicación 6, en el que los otros uno o más biomarcadores se seleccionan entre el grupo que consiste en: creatinina cinasa MB (CK-MB), proteína C reactiva (CRP), creatinina y dímeros D.

Figura 1

Estadísticas

		ST2 sin IC No EPOC	ST2 NO IC EPOC	ST2 no IC	ST2 IC no EPOC	ST2 IC EPOC	ST2 ICC
N	Válido	0,224	161	385	155	53	208
	Ausente	375	435	214	444	545	391
Mediana		0,1220	0,2305	0,1448	0,4944	0,5532	0,5033
Percentiles	25	0,502	0,0823	0,0622	0,2393	0,2819	0,2671
	75	0,2232	0,6555	0,4227	1,1287	1,9560	1,2254

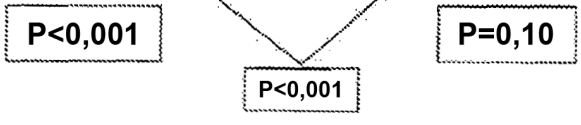


Figura 2

