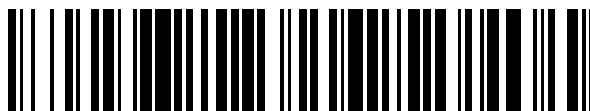


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 314**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/564** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10171764 .3**  
96 Fecha de presentación: **24.04.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2241888**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2010**

54 Título: **PREDICCIÓN DE LA MORTALIDAD Y DETECCIÓN DE ENFERMEDADES GRAVES.**

30 Prioridad:  
**24.04.2006 US 794354 P**  
**15.05.2006 US 800362 P**  
**02.03.2007 US 904608 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.04.2012**

73 Titular/es:  
**CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC.**  
**140 WEST 57TH, SUITE 3B**  
**NEW YORK, NEW YORK 10019, US**

72 Inventor/es:  
**Snider, James V. y**  
**Jacobson, Sven**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

**ES 2 378 314 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

Predicción de la mortalidad y detección de enfermedades graves

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a procedimientos para predecir la mortalidad y detectar la presencia de una enfermedad grave midiendo los niveles circulantes de ST2 solo o en combinación con otros biomarcadores.

**Antecedentes**

10 La evaluación clínica de sujetos, particularmente los que tienen síntomas no específicos tales como dolor torácico o malestar, falta de aliento, náuseas, vómitos, eructos, sudoración, palpitaciones, mareos, fatiga o desvanecimiento, puede presentar desafíos significativos, ya que no siempre son evidentes la causa y la gravedad de la afección del sujeto. La decisión de si tratar a un sujeto de manera agresiva o conservativa, o de si admitir al sujeto como un paciente hospitalizado o enviarlo a casa, algunas veces puede tomarse únicamente basándose en una evaluación clínica del médico o por "instinto visceral" en cuanto al estado real del individuo. Los biomarcadores que indican la probabilidad de que un sujeto tenga un resultado adverso, por ejemplo mortalidad, y/o la presencia de enfermedad grave mejorarían significativamente la capacidad del médico de tomar decisiones de tratamiento fundamentadas.

**Sumario**

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los niveles en suero del biomarcador ST2 (gen 2 expresado por estimulación del crecimiento, también conocido como receptor de interleucina 1 tipo 1 (IL1RL-1)) puede usarse para predecir el resultado clínico, por ejemplo, la muerte, dentro de un periodo de tiempo específico, por ejemplo 30 días, 3 ó 6 meses, o un año o más, o para detectar la presencia de enfermedad grave, independientemente de las causas subyacentes de los síntomas o del diagnóstico final. Los cambios en el nivel de ST2 a lo largo del tiempo, por ejemplo, durante unos cuantos días o más, también pueden usarse para predecir el resultado clínico, por ejemplo, en pacientes hospitalizados después de un acontecimiento agudo.

20 Los procedimientos descritos en el presente documento incluyen medir los niveles de ST2 así como supervisar los cambios en los niveles de ST2 a lo largo del tiempo (por ejemplo, relaciones) para proporcionar evaluaciones de diagnóstico y pronóstico de pacientes, por ejemplo pacientes con síntomas no específicos, por ejemplo, pacientes con disnea aguda y los que tienen dolor torácico.

25 La IL-33 se ha identificado como el ligando de ST2. De esta manera, la divulgación incluye procedimientos para evaluar a los pacientes mediante la supervisión de los niveles de biomarcadores de ST2 y/o niveles de IL-33, así como de complejos ST2/IL-33, y las relaciones de complejos ST2:IL-33 con respecto a ST2 y/o IL-33 libres.

30 Además, los procedimientos pueden incluir el uso de procedimientos de diagnóstico adicionales, incluyendo la evaluación de la función de órganos y/o niveles de biomarcadores auxiliares tales como troponina (Tn, por ejemplo, TnI o TnT), péptido natriurético cerebral (BNP), proBNP, NTproBNP, péptido natriurético atrial (ANP), NT-proANP, proANP, péptido C-reactivo (CRP), nitrógeno de urea en sangre (BUN), dímeros-D (productos de degradación de fibrina reticulada, cuyo nivel se eleva después de la formación de un coágulo), albúmina, enzimas de la función hepática, medidas de la función renal (por ejemplo, creatinina, tasa de aclaramiento de creatinina, o tasa de filtración glomerular) y/o endotoxina bacteriana. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen medir ST2 y/o un cambio en los niveles de ST2 a lo largo del tiempo además de BUN, NT-proBNP o BNP y/o TnI.

35 De esta manera, en un aspecto, la invención se refiere a procedimientos para evaluar el riesgo de muerte dentro de un periodo de tiempo específico de un año, para un sujeto. Los procedimientos incluyen usar una muestra, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina o un tejido corporal obtenido a partir del sujeto; determinar el nivel de biomarcador de ST2 en la muestra; y comparar el nivel de biomarcador de ST2 en la muestra con un nivel de referencia de ST2. Una comparación del nivel de biomarcador de ST2 en la muestra frente a la referencia indica el riesgo del sujeto de muerte dentro del periodo de tiempo específico. El periodo de tiempo específico es un año.

40 En algunas realizaciones, el nivel de referencia representa un nivel en un sujeto que tiene bajo riesgo de muerte dentro de un año. En algunas realizaciones, por ejemplo, en las que el nivel de biomarcador de ST2 se mide usando un inmunoensayo, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1, el nivel de referencia de ST2 está comprendido entre aproximadamente 0,2 y 0,3 ng/ml de suero, por ejemplo, el nivel puede ser 0,20, 0,23, 0,25, 0,27, o 0,29 ng/ml de suero, y un nivel en la muestra que es mayor o igual al nivel de referencia indica que el sujeto tiene un riesgo elevado, es decir, elevado de una forma estadísticamente significativa, de muerte dentro de un periodo de año. Si se emplea una técnica analítica distinta del ELISA descrito en el Ejemplo 1, el nivel de referencia de ST2 puede ser diferente del descrito en el presente documento; los números específicos mencionados en el presente documento deben considerarse equivalentes a números correspondientes generados usando otras técnicas analíticas. En algunas realizaciones, el riesgo elevado

de muerte es al menos un 20% mayor, por ejemplo, un 30%, 40% o 50% mayor.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a procedimientos para determinar la gravedad de una o más enfermedades, por ejemplo, la gravedad actual de enfermedades, en un sujeto. Los procedimientos incluyen obtener una muestra a partir del sujeto; determinar un nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 en la muestra; y comparar el nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 en la muestra con un nivel de referencia de ST2 y/o IL-33. El nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 en la muestra en comparación con la referencia indica si la enfermedad o enfermedades que tiene el sujeto son graves, por ejemplo, ponen en riesgo la vida.

En otro aspecto, la divulgación incluye procedimientos para supervisar el estado de un sujeto, por ejemplo, para decidir si un sujeto ha mejorado, por ejemplo, ha mejorado lo suficiente como para salir del hospital. Los procedimientos incluyen determinar un primer nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 en el sujeto, por ejemplo, un nivel basal; y determinar al menos un nivel posterior de biomarcador de ST2 y/o IL-33 en el sujeto, por ejemplo, un nivel de tratamiento. Después se comparan el primer nivel y los niveles posteriores. Si el nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 se reduce lo suficiente, por ejemplo, de una forma estadísticamente significativa, o al menos en un 5%, 10%, 15%, 20% o más, desde el primer nivel a los niveles posteriores, entonces es probable que el estado del sujeto esté mejorando y, si uno o los dos niveles son suficientemente bajos, por ejemplo, están por debajo de un umbral seleccionado, entonces puede darse el alta al sujeto, por ejemplo, para el tratamiento como paciente externo.

Los procedimientos incluyen determinar el nivel de ST2 que indica el riesgo de un sujeto, y opcionalmente seleccionar o modificar el tratamiento para el sujeto, basándose en la relación del primer nivel de ST2, por ejemplo, un nivel basal, con respecto al segundo nivel de ST2, por ejemplo, un nivel tomado algún tiempo después, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más días después. Por ejemplo, si el segundo nivel de ST2 es más que un porcentaje seleccionado del primer nivel, entonces el sujeto tiene un alto riesgo y debe tratarse de manera más agresiva; si el sujeto ya se está tratando, entonces el sujeto no está respondiendo favorablemente al tratamiento actual y debe seleccionarse un nuevo tratamiento, es decir, un tratamiento alternativo al que el paciente pueda responder de manera más favorable. Como un ejemplo, si el segundo nivel es aproximadamente un 85% o más del primer nivel (es decir, se ha reducido aproximadamente en un 15% o menos), el sujeto no está mejorando y sigue teniendo un alto riesgo de muerte.

En algunas realizaciones, el nivel de ST2 en un sujeto se compara con un nivel de referencia que representa un nivel en un sujeto que no tiene enfermedad grave, por ejemplo, no tiene enfermedad o no tiene enfermedad aguda grave, por ejemplo, cuando se mide usando un ELISA, por ejemplo, como se describe en el presente documento. El nivel de referencia de ST2 puede estar comprendido entre aproximadamente 0,2 y 0,3 ng/ml, por ejemplo, el nivel puede ser de aproximadamente 0,20, 0,23, 0,25, 0,27 o 0,29 ng/ml de suero o plasma (como se ha indicado anteriormente, los umbrales mencionados en el presente documento se aplican cuando se usa un procedimiento ELISA como se describe en el presente documento; otros números de umbral pueden considerarse equivalentes a estos números cuando se determinan usando un procedimiento diferente). Un nivel en la muestra que es mayor o igual al nivel de referencia indica que el sujeto tiene una o más enfermedades graves, por ejemplo, enfermedades actuales.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia representa un sujeto con un cierto pronóstico. Por ejemplo, cuando el nivel de ST2 se mide usando un ELISA, por ejemplo, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 1, el nivel de referencia puede usarse para determinar el pronóstico como se indica a continuación: un ST2 < aproximadamente 0,2 o 0,23 ng/ml indica que el sujeto tiene un buen pronóstico, por ejemplo, es probable que se recupere; un ST2 de aproximadamente 0,2 ó 0,23 ng/ml a 0,7 ng/ml (o un equivalente del mismo) indica que el sujeto tiene un mal pronóstico, es decir, es menos probable que se recupere. Finalmente, un ST2 mayor de 0,7 ng/ml indica un pronóstico muy malo, por ejemplo, no es probable que el sujeto se recupere. En esta realización, un pronóstico malo indicaría que el paciente tiene riesgo de muerte o de desarrollar una enfermedad más grave dentro de un periodo de un año que posiblemente requiera la admisión en un hospital. Un pronóstico muy malo indica que el paciente tiene una alta probabilidad de muerte o de desarrollar una enfermedad más grave en un periodo de 90 días que posiblemente requiera la admisión en un hospital. En un estudio, pacientes con un nivel de ST2 mayor de 0,7 ng/ml tuvieron una tasa de mortalidad mayor del 30%.

En algunas realizaciones, el sujeto presenta uno o más síntomas no específicos, por ejemplo, dolor o malestar torácico, falta de aliento (disnea), náuseas, vómitos, eructos, sudoración, palpitaciones, mareos, fatiga y desvanecimiento. En algunas realizaciones, el síntoma es disnea o dolor torácico.

En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un trastorno cardiovascular. En diversas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno pulmonar, por ejemplo infección aguda (por ejemplo, neumonía), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y embolia pulmonar.

En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno hepático, por ejemplo, un trastorno hepático asociado con quimioterapia, toxicidad alcohólica o toxicidad de drogas como se determina por ensayos del laboratorio convencionales de la función hepática.

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen además determinar el nivel de un biomarcador auxiliar (no ST2, no IL-33), por ejemplo, troponina, NT-proBNP, BNP, proBNP, NT-proANP, proANP, ANP, CRP, dímeros-D, BUN, albúmina, enzimas de la función hepática, medidas de la función renal, por ejemplo, creatinina, tasa de aclaramiento de creatinina o tasa de filtración glomerular, y/o endotoxina bacteriana, en la muestra; y comparar el nivel del biomarcador auxiliar en la muestra con un nivel de referencia del biomarcador auxiliar. El nivel del biomarcador auxiliar en la muestra en comparación con la referencia, en combinación con el nivel de ST2 en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2, indica si el sujeto tiene un riesgo elevado de muerte dentro de un periodo de tiempo específico, y/o tiene una enfermedad actual grave. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar un cambio en los niveles a lo largo del tiempo (por ejemplo, una relación) para el biomarcador auxiliar, comparando un primer nivel, por ejemplo, un nivel basal, con un segundo nivel, por ejemplo, un nivel tomado algún tiempo después, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más días después. En realizaciones en las que se calcula una relación de ST2, también puede calcularse una relación de un biomarcador auxiliar, por ejemplo, basándose en el mismo periodo de tiempo que la relación de ST2.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un IMC de 25-29, un IMC de  $\geq 30$ , o insuficiencia renal, por ejemplo, el sujeto se selecciona basándose en que tiene un IMC de 25-29, un IMC de  $\geq 30$  o insuficiencia renal.

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar un nivel de ST2 y un nivel de IL-33 en la muestra; determinar una relación de ST2:IL-33 en la muestra; y comparar la relación de ST2:IL-33 con una relación de referencia. La relación de ST2:IL-33 en la muestra en comparación con la relación de referencia indica si el sujeto tiene un riesgo elevado de muerte dentro de un periodo de tiempo específico y/o tiene enfermedad grave actual.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para evaluar el riesgo de muerte dentro de un periodo de tiempo específico de un año, por ejemplo, para un sujeto que presenta uno o más síntomas no específicos. Los procedimientos incluyen obtener una muestra del sujeto; determinar un nivel de biomarcador de ST2 en la muestra y, opcionalmente, un nivel de NT-proBNP, proBNP o BNP en la muestra; y comparar el nivel de ST2 en la muestra y el nivel de NT-proBNP en la muestra (si se determina) con niveles de referencia correspondientes. El nivel de ST2 en la muestra, y el nivel de NT-proBNP, proBNP o BNP en la muestra, en comparación con los niveles de referencia respectivos, indica el riesgo de muerte del sujeto dentro del periodo de tiempo específico.

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar niveles de (i) NT-proBNP, proBNP o BNP y (ii) ST2 en la muestra. En algunas realizaciones, el riesgo de muerte del sujeto en un año es el siguiente:

	<b>ST2 &lt; 0,20 ng/ml</b>	<b>ST2 <math>\geq</math> 0,20 ng/ml</b>
<b>NT-proBNP &lt; 986 pg/ml</b>	Riesgo mínimo	Riesgo medio
<b>NT-proBNP <math>\geq</math> 986 pg/ml</b>	Riesgo medio	Riesgo máximo

En ciertas realizaciones, si el sujeto tiene el máximo nivel de riesgo de muerte o readmisión en el hospital, el sujeto se trata de manera agresiva.

En un aspecto adicional, la divulgación incluye procedimientos para supervisar el estado de un sujeto, por ejemplo, para decidir si un sujeto ha mejorado, por ejemplo, ha mejorado lo suficiente para salir del hospital. Los procedimientos incluyen determinar un primer nivel de (i) un biomarcador no ST2, por ejemplo, NT-proBNP, proBNP o BNP y (ii) ST2 y/o IL-33 en el sujeto, por ejemplo, un nivel basal; y determinar al menos un nivel posterior de (i) el biomarcador no ST2, por ejemplo, NT-proBNP, proBNP o BNP y (ii) ST2 y/o IL-33 en el sujeto, por ejemplo, un nivel de tratamiento. Después, se comparan el primer nivel y los niveles posteriores. Si el nivel de ST2 y/o IL-33 se reduce desde el primer nivel a los niveles posteriores, entonces es probable que el sujeto esté mejorando y, si el nivel es suficientemente bajo, entonces el sujeto ha mejorado, por ejemplo, ha mejorado lo suficiente como para recibir el alta, por ejemplo, para un tratamiento como paciente externo. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar al menos un primer, segundo y tercer nivel de (i) un biomarcador no ST2, por ejemplo, NT-proBNP, proBNP o BNP y (ii) ST2 y/o IL-33 en el sujeto, y comparar los niveles. Una diferencia entre los niveles indica si el sujeto ha mejorado lo suficiente como recibir el alta. De esta manera, por ejemplo, la decisión de abandonar o continuar el tratamiento como un paciente hospitalizado puede tomarse como se indica a continuación:

	<b>ST2 &gt; umbral</b>	<b>ST2 &lt; umbral</b>
<b>BNP &gt; umbral</b>	Pronóstico muy malo, requiere tratamiento intensivo, sin alta	El paciente aún puede necesitar tratamiento, pronóstico favorable, posiblemente alta como paciente externo

<b>BNP &lt; umbral</b>	Pronóstico malo, el paciente puede tener enfermedades que compliquen la situación, si se da el alta supervisar de cerca	Buen pronóstico
------------------------	---	-----------------

En algunas realizaciones, el umbral para ST2 es 0,2 ng/ml y el umbral para BNP es 986 pg/ml.

También se divulgan en el presente documento kits que incluyen uno o más anticuerpos que se unen específicamente a ST2 y uno o más anticuerpos que se unen específicamente a NT-proBNP, e instrucciones para realizar uno o más de los procedimientos descritos en el presente documento.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona procedimientos para evaluar el estado de un sujeto. Los procedimientos incluyen obtener una muestra del sujeto; determinar un nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 en la muestra, y determinar la presencia o un nivel de uno o más, por ejemplo, todos los demás biomarcadores siguientes:

(i) NT-proBNP, proBNP o BNP;

(ii) NT-proANP, proANP o ANP;

(iii) troponina cardiaca (cTn), por ejemplo, cTnI;

(iv) dímeros-D;

(v) proteína C-reactiva (CPR);

(vi) creatinina, tasa de aclaramiento de creatinina o tasa de filtración glomerular;

(vii) nitrógeno ureico en sangre (BUN);

(viii) endotoxina bacteriana;

(ix) una o más enzimas de la función hepática; y

comparar los niveles de ST2 y/o IL-33 en la muestra, y el nivel de uno o más biomarcadores distintos en la muestra, con los niveles de referencia correspondientes. El nivel de ST2 en la muestra, y el nivel del otro biomarcador en la muestra, en comparación con los niveles de referencia, indican la gravedad de la afección del sujeto. La invención proporciona un procedimiento que implica medir ST2 y BUN, tal como se define en la reivindicación 14.

En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen medir niveles de relaciones de ST2 en combinación con BNP o NT-proBNP; con troponina, por ejemplo, TnI o TnT, o con una medida de la función renal, por ejemplo, creatinina, tasa de aclaramiento de creatinina o tasa de filtración glomerular.

En otro aspecto, la divulgación incluye procedimientos para evaluar la eficacia de un tratamiento en un sujeto. Los procedimientos incluyen determinar un primer nivel (por ejemplo, basal) de ST2 y/o IL-33 circulante en un sujeto; comparar el primer nivel de ST2 y/o IL-33 circulante en el sujeto con un nivel de referencia predeterminado; seleccionar el sujeto si el primer nivel de ST2 está por encima del nivel de referencia predeterminado; administrar un tratamiento al sujeto; determinar un segundo nivel de ST2 y/o IL-33 circulante en el sujeto; y comparar el primer y segundo niveles de ST2 y/o IL-33 circulante. Una diferencia entre el primer y segundo niveles de ST2 y/o IL-33 circulante indica la eficacia del tratamiento en el sujeto. Por ejemplo, un segundo nivel de ST2 y/o IL-33 circulante que es menor que el primer nivel indica que el tratamiento es eficaz.

Como se usa en el presente documento, una "muestra" incluye cualquier fluido o tejido corporal, por ejemplo, uno o más de sangre, suero, plasma, orina y tejido corporal. En ciertas realizaciones, una muestra es una muestra de suero, plasma o sangre.

Un anticuerpo que "se une específicamente a" un antígeno, se une preferentemente al antígeno en una muestra que contiene otras proteínas.

Los procedimientos y kits descritos en el presente documento tienen varias ventajas. Por ejemplo, los procedimientos pueden usarse para determinar si un paciente debe admitirse o mantenerse como paciente hospitalizado para una evaluación adicional, independientemente de si se ha realizado un diagnóstico definitivo. Por ejemplo, los procedimientos pueden usarse para la estratificación del riesgo de un sujeto dado, por ejemplo, para tomar decisiones en relación con el nivel de agresividad del tratamiento que es apropiado para el sujeto, basándose en sus niveles de ST2. Las mejores decisiones de tratamiento pueden llevar a una menor morbilidad y mortalidad, y una mejor asignación de recursos sanitarios escasos. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden

5 usarse para realizar evaluaciones generales en cuanto a si un paciente debe ensayarse adicionalmente para determinar un diagnóstico específico. Los procedimientos descritos en el presente documento también pueden usarse para la estratificación del riesgo de una población de pacientes, por ejemplo, para proporcionar información sobre la semiología o la respuesta esperada a una intervención terapéutica. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse independientemente de la causa subyacente o diagnóstico último, y por lo tanto no se limitan a indicaciones específicas.

10 A menos que se definen de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En el presente documento se describen procedimientos y materiales para uso en la presente invención; también pueden usarse otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

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

### 15 Descripción de los dibujos

La FIG 1 es un gráfico que ilustra el análisis de la característica operativa del receptor para ST2 y muerte dentro de un año. ST2 era útil para este fin, como se indica por la alta área bajo la curva (AUC).

20 La FIG 2 es un gráfico de barras que ilustra las tasas brutas de muerte por medio de deciles de ST2 en la cohorte del estudio de ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (investigación de ProBNP de disnea en el departamento de urgencias) (PRIDE). Se detecta un claro efecto umbral en el decil 5, correspondiente a una concentración de ST2 de 0,23 ng/ml para el ensayo particular.

25 Las FIG 3A y 3B son un par de curvas de riesgo de Kaplan-Meier que representan las tasas de muerte desde la presentación hasta transcurrido un año de seguimiento en pacientes con disnea, estratificados en función de las concentraciones de ST2. Entre los pacientes disneicos con concentraciones de ST2  $\geq$  0,20 ng/ml, se observó una alta tasa de mortalidad en los días siguientes a la presentación, y que se extendía hasta un año completo desde la presentación. Las tasas de muerte fueron similares entre los que tenían (3A) y los que no tenían (3B) insuficiencia cardiaca aguda (todos los valores de p de rango logarítmico  $<$  0,001).

30 La FIG 4 es un gráfico de barras que ilustra las tasas de mortalidad en función de las concentraciones de marcador para NT-proBNP y ST2.

La FIG 5 es una curva operativa del receptor (ROC) de especificidad frente a sensibilidad, para el cambio en ST2 (línea gris clara) y el cambio en BNP (línea oscura).

35 La FIG 6 es una combinación de un gráfico de barras y líneas. Las barras ilustran el porcentaje de mortalidad en poblaciones con los niveles indicados de relaciones de BUN y ST2. La línea indica el número de pacientes que están en cada categoría.

La FIG 7A es un gráfico de líneas de los valores medios de ST2 para los supervivientes (cuadrados de color gris claro) y no supervivientes (rombos oscuros) cada día de hospitalización.

40 Las FIG 7B-7D son gráficos de caja y bigotes que encierran los percentiles 25 y 75 de los niveles de ST2 (7B), las concentraciones de BNP (7C) y NT-proBNP (7D), representadas frente al tiempo (más de 6 días de hospitalización); S = supervivientes, D = difuntos.

La FIG 8 es un gráfico de líneas de las relaciones de los valores de ST2 para los supervivientes (cuadrados de color gris claro) y no supervivientes (rombos oscuros) en comparación con el nivel basal (próximo a la admisión) en cada día de hospitalización.

45 La FIG 9 es una ROC para la capacidad de ST2 de predecir la muerte en un año en sujetos PRIDE con un diagnóstico pulmonar. Área abajo ROC = 0,73; IC 95% = 0,62-0,83; P  $<$  0,0001; corte óptimo: 0,20 ng/ml; sensible 88%, específico 52%; PPV = 22%; NPV = 96%.

La FIG 10 es un gráfico de cajas que ilustra la correlación entre las concentraciones de ST2 y el riesgo de muerte en un año en sujetos PRIDE con un diagnóstico pulmonar.

50 La FIG 11 es un gráfico de líneas que ilustra la tasa de mortalidad en función de la concentración de ST2 en sujetos PRIDE con un diagnóstico pulmonar. P  $<$  0,001.

Las FIG 12A-B son gráficos de cajas que ilustran la tasa de filtración glomerular media (GFR, 12A) y los niveles de ST2 (12B) en una población de 133 sujetos con insuficiencia renal de moderada a grave.

La FIG 13 es un gráfico de barras que ilustra la distribución de los niveles de ST2 en la población descrita en el Ejemplo 8.

## 5 **Descripción detallada**

La evaluación clínica de pacientes, particularmente pacientes con síntomas no específicos tales como disnea o dolor torácico, con frecuencia supone un desafío. Los resultados descritos en el presente documento proporcionan pruebas de que ST2 es útil para la evaluación del pronóstico de pacientes, independientemente de la causa subyacente de su enfermedad. ST2 es un indicador poderoso de enfermedad grave y de muerte inminente, como se demuestra en el presente documento en varias poblaciones completamente diferentes con síntomas completamente diferentes (véanse los Ejemplos 1-6).

### Predicción de la Mortalidad

Las concentraciones elevadas de ST2 son notablemente predictivas de muerte en un año, con una divergencia espectacular en las curvas de supervivencia para los que tienen un nivel elevado de ST2 poco después de la presentación, independientemente del diagnóstico subyacente. Como ejemplo, existe una relación espectacular entre las elevaciones de ST2 y el riesgo de mortalidad dentro del año después de la presentación con disnea. La relación entre ST2 y muerte en pacientes con disnea era independiente del diagnóstico, y suplantaba a todos los demás biomarcadores de predicción de mortalidad en esta situación, incluyendo otros marcadores de inflamación, mionecrosis, disfunción renal y, más particularmente, NT-proBNP, un marcador descrito recientemente como un marcador que tiene un valor de predicción de muerte en esta población (Januzzi y col., Arch. Intern. Med. 2006; 166(3):315-20). De hecho, la mayor parte de la mortalidad en el estudio se concentró entre sujetos con niveles elevados de ST2 en la presentación; sin embargo, la combinación de un nivel elevado de ST2 y NT-proBNP estaba asociada con las máximas tasas de muerte en un año.

Esta estrategia multimarcador para la estratificación del riesgo se ha propuesto para pacientes con síndromes coronarios agudos (Sabatine y col., Circulation 2002; 105(15):1760-3), pero esta estrategia aún no se ha propuesto para la evaluación del paciente con síntomas no específicos tales como disnea indiferenciada o queja general de dolor torácico.

### Determinación de la gravedad de la enfermedad

Las concentraciones elevadas de ST2 se correlacionan con la presencia de enfermedad grave en un sujeto, independientemente de la causa subyacente de la enfermedad. Como ejemplo, en una población de pacientes que presentan dolor torácico, los máximos niveles de enfermedad se asociaron con enfermedad grave incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), linfoma, sepsis, abuso de alcohol y embolia pulmonar (véase el Ejemplo 5).

Por lo tanto, para sujetos no diagnosticados, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar lo agresivo que debe buscarse un diagnóstico; un alto nivel de ST2 indicaría la presencia de enfermedad grave, y sugeriría que el sujeto debe tratarse como un caso de alto riesgo. Para sujetos con un diagnóstico conocido, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para ayudar a determinar la gravedad de la patología subyacente; de nuevo, un mayor nivel de ST2 está asociado con una enfermedad más grave.

## 40 **Metodología General**

En general, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen la evaluación de los niveles circulantes (por ejemplo, niveles en sangre, suero, plasma, orina o tejido corporal) de ST2 y/o IL-33 en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Estos niveles proporcionan información en relación con la probabilidad de que el sujeto experimente un resultado adverso, por ejemplo mortalidad, por ejemplo, dentro de un periodo de tiempo específico, por ejemplo, 30 días, 60 días, 90 días, 6 meses, un año, dos años, tres años o cinco años. Estos niveles también proporcionan información en relación con la gravedad de la enfermedad en el sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de ST2 y/o IL-33 se determina una vez, por ejemplo, en la presentación. En algunas realizaciones, el nivel de ST2 y/o IL-33 se determina 2, 4, 6, 8, 12, 18 y/o 24 horas, y/o 1-7 días después del inicio de los síntomas. Cuando se determina más de un nivel, puede calcularse una relación de ST2 que cuantifica si y cuánto ha aumentado o disminuido el nivel de ST2 en el sujeto.

En algunas realizaciones, el nivel de ST2 y/o IL-33 se determina más de una vez; en este caso puede usarse la mayor medición, o la medición más reciente. En realizaciones en las que se determina el nivel de ST2 y/o IL-33 más de una vez, puede usarse el nivel máximo, o puede determinarse y usarse la diferencia entre los niveles (es decir, la

magnitud y dirección de la diferencia). De esta manera, puede determinarse una relación de ST2 que representa el cambio (por ejemplo, la magnitud y dirección, por ejemplo, aumento o reducción) en los niveles de ST2 a lo largo del tiempo, por ejemplo, durante el transcurso de unos pocos días, por ejemplo, 3 días o más, o durante el transcurso de semanas o meses; la relación es indicativa del nivel de riesgo del sujeto y la presencia de enfermedad grave. Los niveles de ST2 y/o IL-33 también pueden determinarse múltiples veces para evaluar la respuesta del sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, un nivel de biomarcador de ST2 y/o IL-33 tomado después de la administración de un tratamiento, por ejemplo, una o más dosis o ciclos de un tratamiento, puede compararse con niveles de ST2 y/o IL-33 antes de que se iniciara el tratamiento. La diferencia entre los niveles de ST2 indicaría si el tratamiento fue eficaz; por ejemplo, una reducción en los niveles de ST2 indicaría que el tratamiento fue eficaz. La diferencia entre los niveles de ST2 puede usarse también para supervisar el estado de un sujeto, por ejemplo, para determinar si el sujeto está mejorando, por ejemplo, está mejorando suficiente como para salir del hospital, o como para tratarse de manera menos agresiva, o como para someterse al seguimientos a intervalos de tiempo mayores.

La evaluación de los niveles circulantes de ST2 y/o IL-33 en un sujeto típicamente incluye la obtención de una muestra biológica, por ejemplo, suero, plasma o sangre, del sujeto. Los niveles de ST2 y/o IL-33 en la muestra pueden determinarse midiendo los niveles de polipéptido en la muestra, usando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, por ejemplo, inmunoensayos tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). Como alternativa, pueden medirse niveles de ARNm de ST2 y/o IL-33, de nuevo usando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, por ejemplo, por PCR cuantitativa o análisis de transferencia Northern.

Una vez que se ha determinado el nivel o relación de ST2 y/o IL-33, el nivel o relación puede compararse con un nivel o relación de referencia. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando el nivel de ST2 se determina usando un ELISA, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1, el nivel de referencia representará un nivel umbral, por encima del cual el sujeto tiene un mayor riesgo de muerte y/o tiene enfermedad grave. El nivel de referencia elegido puede depender de la metodología usada para medir los niveles de ST2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando se determinan niveles circulantes de ST2 soluble usando un inmunoensayo, por ejemplo, como se describe en el presente documento, el nivel de referencia es de aproximadamente 0,20, 0,23 ó 0,29 ng/ml de suero, y un nivel de ST2 por encima del nivel de referencia indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de muerte y/o tiene enfermedad grave.

Cuando se ha determinado una relación, por ejemplo, usando una primera y segunda mediciones de ST2, la relación de referencia representará una cantidad y dirección de cambio que indica si el sujeto tiene un mayor riesgo de muerte y/o tiene una enfermedad grave. Como ejemplo, puede calcularse una relación de ST2 basándose en una primera medición, por ejemplo, una medición basal tomada cuando un sujeto se presenta para el tratamiento, por ejemplo, en un DU, y una segunda medición, por ejemplo, una medición tomada aproximadamente de tres a cuatro días después. Si la relación entre el primer y el segundo nivel de ST2 a lo largo del tiempo es de aproximadamente 0,85 o superior, es decir, los niveles de ST2 se han reducido menos de aproximadamente un 15% (o se han mantenido igual o han aumentado), entonces el sujeto tiene un riesgo muy alto de muerte inminente. Las relaciones por debajo de aproximadamente 0,85 (en las que los niveles de ST2 se han reducido más de aproximadamente un 15%) indican que el sujeto tiene un menor riesgo de muerte inminente.

Esta información permite que el médico a cargo del tratamiento tome decisiones de tratamiento más precisas; por ejemplo, cuando los resultados de la determinación indican que el sujeto tiene un nivel igual o superior a un nivel de referencia, por ejemplo, por encima de aproximadamente 0,20 ng/ml, 0,23 ng/ml o 0,29 ng/ml de suero, o una relación por encima de una relación de referencia, el sujeto puede admitirse en el hospital como un paciente hospitalizado, por ejemplo, en un departamento de cuidados agudos o críticos. En algunas realizaciones, la comparación de ST2 con un nivel o relación de referencia puede usarse para determinar el pronóstico de un sujeto. Por ejemplo, cuando se mide el nivel de ST2 usando un ELISA, por ejemplo, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 1, el nivel de referencia puede usarse para determinar el pronóstico como se indica a continuación: un ST2 < aproximadamente de 0,20 ng/ml o 0,23 ng/ml indica que el sujeto tiene un buen pronóstico, por ejemplo, es probable que se recupere; un ST2 de aproximadamente 0,20 ng/ml o 0,23 ng/ml a aproximadamente 0,7 ng/ml indica que el sujeto tiene un mal pronóstico, por ejemplo, es menos probable que se recupere. Finalmente, un ST2 mayor de aproximadamente 0,7 ng/ml indica un pronóstico muy malo, por ejemplo, no es probable que el sujeto se recupere. Como otro ejemplo, una relación de un primer y segundo niveles de ST2 a lo largo del tiempo por encima de aproximadamente 0,85 indica un mal pronóstico, mientras que una relación de aproximadamente 0,85 o menor indica un buen pronóstico.

Puede realizarse un ensayo adicional para determinar el estado real del sujeto. Puede administrarse un tratamiento más agresivo antes o después del ensayo adicional. Por ejemplo, en caso de que se sospeche IM, el sujeto puede enviarse a estudios de formación de imágenes más extensos y/o cateterización cardíaca.

En algunas realizaciones, se determinan tanto los niveles de ST2 como de IL-33 y la información de la comparación



de ambos biomarcadores con sus niveles de referencia respectivos proporciona información acumulativa en relación con un mayor riesgo de muerte y/o la presencia de una enfermedad grave en el sujeto. En algunas realizaciones, puede determinarse la relación entre ST2 e IL-33 y puede compararse la relación con una relación de referencia que representa una relación umbral por encima de la cual el sujeto tiene un mayor riesgo de muerte y/o tiene una enfermedad grave. En algunas realizaciones, se detecta la presencia de complejos IL-33/ST2 y el nivel de dichos complejos es indicativo de riesgo de muerte y/o la presencia de enfermedad grave.

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen el uso de procedimientos de diagnóstico adicionales para identificar la patología subyacente. Puede usarse cualquier procedimiento de diagnóstico conocido en la técnica, y un experto en la materia podrá seleccionar procedimientos de diagnóstico que sean apropiados para los síntomas del sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen otros procedimientos de diagnóstico además o como alternativa a la medición de otros biomarcadores, por ejemplo, mediciones físicas de la función pulmonar o función cardíaca como se conocen en la técnica.

Por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen la medición de los niveles de ST2 y/o IL-33 y uno o más biomarcadores adicionales que ayudan al diagnóstico del sujeto. Como ejemplo, para un sujeto que tiene dolor torácico o disnea, pueden medirse biomarcadores indicativos de enfermedad cardíaca, por ejemplo, troponina cardíaca (cTn), por ejemplo, cTnl, BNP y/o ANP; como alternativa o además, pueden medirse biomarcadores de enfermedad pulmonar, por ejemplo, dímeros D de embolia pulmonar. De esta manera, en sujetos que presentan síntomas que incluyen IM en su diagnóstico diferencial, los procedimientos pueden incluir la medición de niveles de cTnl, BNP o NTproBNP o proBNP además de ST2 y/o IL-33, para determinar si el sujeto está teniendo un IM. En sujetos que presentan síntomas que incluyen insuficiencia cardíaca (IC) en su diagnóstico diferencial, los procedimientos pueden incluir medir los niveles de BNP o NTproBNP o proBNP además de ST2 y/o IL-33, para determinar si el sujeto está teniendo IC. En sujetos que presentan síntomas que incluyen EPOC en sus diagnósticos diferenciales, los procedimientos pueden incluir la medición de la función pulmonar además de los niveles de ST2 y/o IL-33, para determinar si el sujeto tiene EPOC. Un experto en la materia apreciará que hay varios procedimientos de diagnóstico adicionales que pueden aplicarse, dependiendo de la situación y del estado del sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen medir los niveles de BUN, y la presencia de niveles elevados de BUN y niveles elevados de ST2 pone al sujeto en la categoría de máximo riesgo.

## ST2

El gen de ST2 es un miembro de la familia de receptores de interleucina-1, cuyo producto proteico existe como una forma transmembrana y también como un receptor soluble que es detectable en suero (Kieser y col., FEBS Lett. 372(2-3): 189-93 (1995); Kumar y col., J. Biol. Chem. 270(46): 27905-13 (1995); Yanagisawa y col., FEBS Lett. 302(1): 51-3 (1992); Kuroiwa y col., Hibrydoma 19(2): 151-9 (2000)). Recientemente se describió que ST2 estaba sensiblemente regulado positivamente en un modelo experimental de insuficiencia cardíaca (Weinberg y col., Circulation 106(23): 2961-6 (2002)), y los resultados preliminares sugieren que las concentraciones de ST2 pueden estar elevadas en los pacientes con IC grave crónica (Weinberg y col., Circulation 107(5): 721-6 (2003)) así como en los pacientes con infarto de miocardio (IM) agudo (Shimpo y col., Circulation 109(18): 2186-90 (2004)).

Se cree que la forma transmembrana de ST2 juega un papel en la modulación de las respuestas de células T auxiliares de tipo 2 (Lohning y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(12): 6930-5 (1998); Schimtz y col., Immunity 23(5): 479-90 (2005)), y puede jugar un papel en el desarrollo de tolerancia en estados de inflamación grave o crónica (Brint y col., Nat. Immunol. 5(4): 373-9 (2004)), mientras que la forma soluble de ST2 está regulada positivamente en fibroblastos estimulados por el crecimiento (Yanagisawa y col., 1992, *supra*). Los datos experimentales sugieren que el gen ST2 está regulado positivamente de una forma sensible en estados de estiramiento de miocitos (Weinberg y col., 2002, *supra*) de una manera análoga a la inducción del gen de BNP (Bruneau y col., Cardiovasc. Res. 28(10): 1519-25 (1994)).

Tominaga, FEBS Lett, 258: 301-304 (1989) aislaron genes murinos que se expresaban específicamente por estimulación del crecimiento en células BALB/c-3T3; denominaron a uno de estos genes St2 (por Growth Stimulation-Expressed Gene 2 (gen 2 expresado por estimulación del crecimiento)). El gen St2 codifica dos productos proteicos: ST2, que es una forma secretada soluble; y ST2L, una forma de receptor transmembrana que es muy similar a los receptores de interleucina-1. El Comité de Nomenclatura de la HUGO denominó al homólogo humano, cuya clonación se describió en Tominaga y col., Biochim. Biophys. Acta. 1171: 215-218 (1992), receptor de interleucina-1 tipo 1 (IL1 RL1). Los dos términos se usan indistintamente en el presente documento.

La secuencia de ARNm de la isoforma soluble más corta de ST2 humano puede encontrarse en GenBank, Número de Registro NM\_003856.2, y la secuencia del polipéptido está en el GenBank, Número de Registro NM\_003847.2; la secuencia de ARNm para la forma más larga de ST2 humano está en el GenBank, Número de Registro NM\_016232.4; la secuencia polipeptídica está en el GenBank, Número de Registro NP\_057316.3. Está disponible más información en las bases de datos públicas en GenID: 9173, MIN ID N° 601203 y UniGene N° Hs.66. En general, en los procedimientos descritos en el presente documento, se mide la forma soluble del polipéptido ST2.

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

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar la identidad de la secuencia de nucleótidos en RefSNP ID: rs 1041973.

**IL-33**

IL-33 se identificó recientemente como el ligando de ST2, y se ha descrito la presencia de niveles aumentados de IL-33 en diversos trastornos inflamatorios (véase Schmitz y col., Immunity 23(5): 479-90 (2005); Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0203046). En los procedimientos descritos en el presente documento, IL-33 puede medirse en lugar o además de ST2. También puede determinarse la relación entre ST2 e IL-33.

La secuencia de ácido nucleico de IL-33 puede encontrarse en el GenBank, Número de Registro NM\_033439.2, y la secuencia del polipéptido está en el GenBank, Número de Registro NP\_254274.1. Está disponible información adicional en las bases de datos públicas en GeneID: 90865, MIM ID N° \*608678, y UniGene N° Hs. 348390. IL-33 también se conoce como Fase 26 de Lectura Abierta del Cromosoma 9 (C9ORF26); Factor Nuclear de Vénulas del Endotelio Alto (NFHEV); e Interleucina 33. Véase también Baekkevold y col., Am. J. Path. 163: 69-79 (2003).

En la técnica se conocen procedimientos para medir los niveles de IL-33, por ejemplo, véase Shmitz y col., Immunity 23(5): 479-90 (2005) y la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0203046.

**Otros biomarcadores**

Los procedimientos descritos en el presente documento también pueden incluir la medición de niveles de otros biomarcadores además de ST2 y/o IL-33. Los biomarcadores adecuados incluyen proBNP, NT-proBNP, BNP, NT-proANP, proANP, ANP, troponina, CRP, IL-6, dímeros-D, BUN, enzimas de la función hepática, albúmina, medidas de la función renal, por ejemplo, creatinina, tasa de aclaramiento de creatinina o tasa de filtración glomerular y/o endotoxina bacteriana. En la técnica se conocen procedimientos para medir estos biomarcadores, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2004/0048286 y 2005/0130136 de Lee y col., Dhalla y col., Mol. Cell. Biochem. 87: 85-92 (1989); Moe y col., Am. Heart. J. 139: 587-65 (2000); Januzzi y col., Eur. Heart. J. 27(3): 330-7 (2006); Maisel y col., J. Am. Coll. Cardiol. 44(6): 1328-33 (2004); y Maisel y col., N. Engl. J. Med. 347(3): 161-7 (2002). Las enzimas de la función hepática incluyen alanina transaminasa (ALT); aspartato transaminasa (AST); fosfatasa alcalina (ALP); y bilirrubina total (TBIL).

En estas realizaciones, se determinan los niveles de ST2 y/o IL-33 y uno o más biomarcadores adicionales, y la información de la comparación de los biomarcadores con sus niveles de referencia respectivos proporciona información adicional con respecto al riesgo de muerte del sujeto y/o la presencia de una enfermedad grave en el sujeto, lo cual puede proporcionar una información más precisa y específica en relación con el riesgo del sujeto. Los niveles después pueden compararse con una relación de referencia que representa una relación umbral por encima de la cual el sujeto tiene mayor riesgo de muerte y/o tiene una enfermedad grave.

Como ejemplo, los procedimientos pueden incluir determinar los niveles de NT-proBNP y ST2. Los niveles indican el riesgo de muerte del sujeto, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1A.

**Tabla 1A: Riesgo de muerte basado en los niveles circulantes de NT-proBNP y ST2**

	<b>ST2 &lt; 0,20 ng/ml</b>	<b>ST2 ≥ 0,20 ng/ml</b>
<b>NT-proBNP &lt; 986 pg/ml</b>	Riesgo mínimo	Riesgo medio
<b>NT-proBNP ≥ 986 pg/ml</b>	Riesgo medio	Riesgo máximo

Como se muestra en la Tabla 1A, el riesgo mínimo de muerte, por ejemplo, un riesgo de muerte no mayor que en pacientes normales o individuos sanos, se produce cuando son bajos tanto los niveles de ST2 como los niveles de NT-proBNP, y el riesgo máximo de muerte, es decir, un riesgo aumentado de una forma estadísticamente significativa, por ejemplo, mayor que un riesgo de muerte aumentado el 20%, por ejemplo, un riesgo un 30%, 40% o 50% mayor que en un paciente normal o individuo sano, se produce cuando son elevados los niveles tanto de ST2 como de NT-proBNP.

Como otro ejemplo, los procedimientos pueden incluir la determinación de los niveles de ST2 y BUN. Los niveles

indican el riesgo de muerte del sujeto, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1B.

**Tabla 1B: Riesgo de muerte basado en los niveles circulantes de BUN y ST2**

	<b>ST2 &lt; 0,20 ng/ml</b>	<b>ST2 ≥ 0,20 ng/ml</b>
<b>BUN &lt; 40 mg/ml</b>	Riesgo mínimo	Riesgo medio
<b>BUN ≥ 40m g/ml</b>	Riesgo medio	Riesgo máximo

5 Como se muestra en la Tabla 1B, el riesgo mínimo de muerte, por ejemplo, un riesgo de muerte no mayor que en pacientes normales o individuos sanos, se produce cuando son bajos tanto los niveles de ST2 como los de BUN, y el riesgo máximo de muerte, por ejemplo, un riesgo de muerte aumentado de una forma estadísticamente significativa, por ejemplo, un riesgo mayor que un riesgo un 30%, 40% o 50% mayor que el de un paciente normal o individuo sano, se produce cuando son elevados tanto los niveles de ST2 como los niveles de BUN.

**Selección de un tratamiento agresivo frente a conservador**

10 Una vez que se ha determinado que un sujeto tiene un nivel circulante de ST2 y/o IL-33 por encima de un nivel de referencia predeterminado, la información puede usarse de una diversidad de formas. Por ejemplo, si el sujeto tiene niveles de ST2 elevados, por ejemplo, en comparación con un nivel de referencia, puede tomarse la decisión de tratar agresivamente y el sujeto puede admitirse, por ejemplo, en un hospital para el tratamiento como un paciente hospitalizado, por ejemplo, en un departamento de cuidados agudos o críticos. Los kits de ensayo portátiles pueden permitir al personal  
15 médico de urgencias evaluar a un sujeto en el campo, para determinar si debe transportarse al DU. También pueden realizarse decisiones de triaje, por ejemplo, en un DU u otro escenario clínico, basándose en la información proporcionada por un procedimiento descrito en el presente documento. Puede darse prioridad a los pacientes con niveles elevados de ST2 y/o IL-33 con respecto a los que tienen menores niveles de ST2 y/o IL-33.

20 Los procedimientos descritos en el presente documento también proporcionan información en relación a si un sujeto está mejorando, por ejemplo, está respondiendo al tratamiento, por ejemplo, si un sujeto hospitalizado ha mejorado suficientemente como para salir del hospital y someterse al seguimiento como un paciente externo. En general, estos procedimientos incluirán la determinación de los niveles de ST2 y/o IL-33 en el sujeto múltiples veces. Una reducción en los niveles de ST2 y/o IL-33 a lo largo del tiempo indica que es probable que el sujeto esté mejorando. Los niveles más recientes de ST2 y/o IL-33 también pueden compararse con un umbral, como se describe en el presente documento, para  
25 determinar si el sujeto ha mejorado suficientemente como para recibir el alta.

El sujeto también puede considerarse para inclusión en un ensayo clínico, por ejemplo, de un tratamiento que lleva un riesgo relativamente elevado. El sujeto puede tratarse con un régimen que lleva un riesgo relativamente mayor que el que se consideraría apropiado para alguien que tiene un menor riesgo de mortalidad inminente, por ejemplo, mortalidad dentro de un periodo de 30 días o de 1 año desde la presentación.

30 Mas allá del escenario clínico, la información en relación con el nivel de ST2 y/o IL-33 de un sujeto puede usarse de otras maneras, por ejemplo, para decisiones de pago por terceras partes pagadoras, o para el establecimiento de primas de seguros médicos o de vida por los proveedores de seguros. Por ejemplo; puede usarse un alto nivel de ST2 y/o IL-33, por ejemplo, un nivel por encima de un nivel umbral predeterminado para decidir aumentar las primas del seguro para el sujeto.

**35 Poblaciones de pacientes**

Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en una amplia diversidad de contextos clínicos. Por ejemplo, los procedimientos pueden usarse para la exploración de la población general, incluyendo la exploración por médicos, por ejemplo, en hospitales y clínicas de pacientes externos, así como en el DU. Como un ejemplo, los niveles de ST2 y/o IL-33 pueden determinarse en cualquier momento, y si está elevado el nivel de ST2 y/o IL-33, el médico puede  
40 actuar de manera apropiada.

Aunque los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para cualquier sujeto en cualquier momento, son particularmente útiles para los sujetos para los que es difícil determinar un diagnóstico o la gravedad de una afección. Por ejemplo, estos sujetos pueden presentar síntomas no específicos, por ejemplo, síntomas que no indican un diagnóstico específico. Los síntomas no específicos incluyen, pero sin limitación, dolor torácico o malestar, falta de aliento,  
45 náuseas, vómitos, eructos, sudoración, palpitaciones, mareo, fatiga y desvanecimiento. Cada síntoma puede tener una etiología variada.

*Dolor torácico*

El dolor torácico es la queja principal en aproximadamente el 1 al 2 por ciento de las visitas de pacientes externos, y aunque la causa con frecuencia no es cardíaca, la enfermedad cardíaca sigue siendo la causa principal de muerte en los Estados Unidos. Por lo tanto, la distinción entre causas graves y benignas del dolor torácico es crucial. Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles para realizar esta determinación.

5 Un sujeto que se presenta en el DU con dolor torácico puede tener dolor esofágico, una úlcera, problemas pulmonares agudos tales como una embolia pulmonar (EP) (potencialmente fatal), rotura de un aneurisma o aneurisma disecante (altamente letal), ataque de vesícula biliar, pericarditis (inflamación del saco que rodea el corazón), angina de pecho (dolor cardíaco sin lesión) o un IM (potencialmente fatal). Puede ser difícil realizar inmediatamente un diagnóstico preciso, pero la  
10 procedimientos descritos en el presente documento indican que el sujeto tiene un mayor riesgo de un resultado clínico adverso, por ejemplo, mortalidad inminente o enfermedad grave, entonces puede tomarse la decisión de tratar al sujeto de forma agresiva para prevenir potencialmente el resultado adverso.

Puede encontrarse información adicional sobre el tratamiento y diagnóstico del dolor torácico, por ejemplo, en Cayley, Am. Fam. Phys. 72(10): 2012-2028 (2005).

15 *Disnea*

La disnea, o falta de aliento (también definida como una respiración anormal o molesta) es un síntoma común de sujetos tras la presentación en el DU. El diagnóstico diferencial de la disnea incluye cuatro categorías generales: (1) cardíaca, (2) pulmonar, (3) cardíaca o pulmonar mixta y (4) no cardíaca o no pulmonar.

20 Las causas cardíacas de disnea incluyen insuficiencia cardíaca congestiva biventricular, derecha o izquierda con disfunción sistólica resultante, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio reciente o remoto, cardiomiopatía, disfunción valvular, hipertrofia del ventrículo izquierdo con disfunción diastólica resultante, hipertrofia septal asimétrica, pericarditis y arritmias.

25 Las causas pulmonares incluyen procesos obstructivos (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma) y procesos restrictivos (por ejemplo causas extrapulmonares tales como obesidad, deformidades de la columna vertebral o de la pared torácica y patología pulmonar intrínseca tal como fibrosis intersticial, neumoconiosis, enfermedad granulomatosa o enfermedad vascular del colágeno).

Los trastornos cardíacos y pulmonares mixtos incluyen EPOC con hipertensión pulmonar y cor pulmonale, descondicionamiento, embolia pulmonar y traumatismo.

30 Los trastornos no cardíacos o no pulmonares incluyen afecciones metabólicas tales como anemia, cetoacidosis diabética y otras causas menos comunes de acidosis metabólica, dolor en la pared torácica o en otras partes del cuerpo, y trastornos neuromusculares tales como esclerosis múltiple y distrofia muscular. Los problemas rinolaríngeos obstructivos incluyen obstrucción nasal debido a pólipos o desviación septal, amígdalas agrandadas y estrechamiento de las vías respiratorias supraglóticas o subglóticas.

35 También puede presentarse disnea como una manifestación somática de trastornos psiquiátricos, por ejemplo, un trastorno de ansiedad con hiperventilación resultante.

Puede encontrarse otra información en relación con la evaluación y el tratamiento de disneas, por ejemplo, en Morgan y Hodge, Am. Fam. Phys. 57(4): 711-718 (1998).

*Poblaciones especiales*

40 Ciertas poblaciones de sujetos pueden beneficiarse de forma particular de los procedimientos descritos en el presente documento. Estos sujetos incluyen personas para las que es menos útil BNP o NT-proBNP, tales como en aquellas que tienen una función renal alterada (Anwaruddin y col., J. Am. Coll. Cardiol. 47(1): 91-7 (2006); McCullough y col., Am. J. Kidney Dis. 41(3): 571-9 (2003)), o en aquellas que tienen sobrepeso (Índice de Masa Corporal (IMC) de 25-29) o son  
45 obesas ((IMC  $\geq$  30) (Krauser y col., Am. Heart J. 149(4): 744-50 (2005); McCord y col., Arch. Intern. Med. 164(20): 2247-52 (2004)). Es conocido y aceptado en el campo que los pacientes con un alto IMC normalmente tienen niveles de péptido natriurético que están por debajo de lo esperado con respecto a un paciente con masa corporal normal para el mismo nivel de enfermedad; no se conoce el mecanismo exacto de este fenómeno. Se ha demostrado que los niveles circulantes de ST2 no se ven influenciados por el IMC, por lo tanto, la determinación de los niveles de ST2 es más útil que los niveles de péptido natriurético en sujetos con alto IMC. De esta manera, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir la determinación del IMC de un sujeto y si el sujeto tiene sobrepeso o es obeso, la selección del paciente  
50 para la determinación de los niveles de ST2 y/o IL-33, como se describe en el presente documento.

## Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

### Ejemplo 1: Ensayo ELISA tipo sándwich

5 Este ejemplo usa el kit ELISA de ST2 fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), N° 7638. Este kit es un ensayo ELISA tipo sándwich que utiliza anticuerpos monoclonales tanto para la captura como para la detección. Este procedimiento pretende analizar una placa completa de muestras ensayadas en réplicas a un factor de dilución de 1:3 y sigue minuciosamente el protocolo de los fabricantes. Los kits deben almacenarse a 4°C hasta el uso. El procedimiento descrito en este ejemplo está optimizado para suero o plasma humano recogido en  
10 tubos con citrato o EDTA como anticoagulante. En este ensayo no debe usarse plasma recogido en tubos con heparina como anticoagulante, ya que la heparina se une a ST2 e inhibe la medición por este protocolo ELISA. Pueden usarse muestras de plasma o suero recientes o congeladas. Este ensayo no se ve afectado adversamente por hasta 3 ciclos de congelación y descongelación de muestras de plasma.

15 Los reactivos deben prepararse cada vez a partir de un nuevo kit inmediatamente antes de realizar el ensayo. Dejar que el kit se equilibre a temperatura ambiente antes del uso. Los reactivos no analizados explícitamente a continuación se proporcionan por el fabricante listos para el uso.

1. Solución de lavado - la solución de lavado se proporciona por el fabricante como una solución concentrada 10X. Para preparar un litro de solución de lavado, diluir 100 ml del concentrado 10X proporcionado con 900 ml de agua destilada.

20 2. Solución de detector - la solución del detector se prepara diluyendo el concentrado del detector 1:101 con el diluyente del detector. Para una placa de 96 pocillos completa de muestras se requieren 10 ml de solución de detector. Para preparar 10 ml de solución de detector usar una pipeta para transferir 10 ml del diluyente del detector de color azul a un tubo de polipropileno con la parte superior naranja de 15 ml. Añadir 100 µl del concentrado de detector a este volumen de diluyente de detector.

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

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

### **Preparación de patrones y muestras:**

30 Todo lo siguiente debe prepararse en tubos de polipropileno de 1,5 ml etiquetados para transferirse a la placa de ensayo con la pipeta P200.

#### Patrones:

La curva patrón se prepara realizando diluciones seriadas de 2 veces de la solución madre de 8 ng/ml.

35 1. Usando una pipeta P1000, transferir 250 µl de Diluyente de Ensayo a 8 tubos de polipropileno de 1,5 ml etiquetados como S1-S8.

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

a. Mezclar minuciosamente por pipeteo suave 3 veces teniendo cuidado de no crear burbujas.

40 3. Usando la misma pipeta P1000 y una punta limpia para cada uno de las siguientes, transferir 250 µl del reactivo del tubo S1 al tubo S2, repetir la mezcla.

4. Repetir la etapa 3 para S2 a S3, S3 a S4, S4 a S5, S5 a S6 y S6 a S7. S8 será el blanco del reactivo de forma que no se debe transferir 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

## ES 2 378 314 T3

### Muestras:

La placa se prepara de forma que cada muestra se analice como una dilución 1:3 por duplicado.

1. Etiquetar un tubo de polipropileno de 1,5 ml para cada muestra.
2. Usando la pipeta P200, transferir 160 µl de Diluyente de Ensayo a cada tubo.
3. Usando la pipeta P200, transferir 80 µl de suero o plasma desde la muestra 1 al tubo 1. Mezclar cuidadosamente pipeteando 3 veces sin hacer burbujas.
4. Continuar transfiriendo las muestras a los tubos de muestra repitiendo la etapa 2 para cada muestra

### **Procedimiento:**

1. Usar la pipeta P200 para transferir los patrones y las muestras de suero diluidas rápidamente a la placa de ensayo de 96 pocillos, como se muestra en la Tabla 2.
  - a. Preparar la pipeta P200 para 100 µl
  - b. Transferir 100 µl de las diluciones de curva patrón a cada una de las columnas 1 y 2 en la placa de ensayo
  - c. Transferir 100 µl de cada una de las muestras de suero a la placa de ensayo exactamente en la misma posición que se muestra en el mapa de placas presentado a continuación.
2. Cubrir la placa de ensayo con el protector proporcionado e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
3. Usar el autolavador de placas para lavar la placa 4 veces.
4. Detector: usando la pipeta multicanal de 8 canales, transferir 100 µl de la solución de detector a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
  - a. NOTA: este reactivo debe haberse preparado durante la primera etapa de incubación.
  - b. NOTA: usar un recipiente de reactivo desechable par esta adición de reactivo. SIEMPRE usar un recipiente de reactivo desechable limpio para cada reactivo. No es necesario cambiar las puntas de la pipeta durante esta etapa.
5. Lavar la placa como en la etapa 3
6. Sustrato: usando la pipeta multicanal de 8 canales, transferir 100 µl del sustrato a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
  - a. El reactivo de sustrato se proporciona por el fabricante listo para su uso.
7. Terminación: después de finalizar la incubación del sustrato, usando la pipeta multicanal de 8 canales transferir 100 µl de la solución de Terminación a cada pocillo.
  - a. El reactivo de Solución de Terminación se proporciona por el fabricante listo para su uso.
8. Leer la placa a 450 nm con una corrección del efecto de fondo a 620 nm.
  - a. La placa debe leerse en los 30 minutos posteriores a la terminación de la reacción.
9. Introducir las lecturas de absorbancia en la hoja de cálculo proporcionada para el análisis.

**Tabla 2: Ejemplo de mapa de placa de ensayo de 96 pocillos**

	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

(cont.)												
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

La Tabla 2 es un mapa de una placa de ensayo de 96 pocillos ejemplar, con reacciones de control en la columna 1, y cada muestra 1-40 analizada por duplicado en las columnas 3-12.

### **Ejemplo 2. Medición de las concentraciones de ST2 soluble para la evaluación de pacientes con disnea aguda**

5 En este ejemplo se evaluó la utilidad de la medición de ST2 para la evaluación de pacientes con disnea.

Los sujetos usados en este Ejemplo tomaron parte en el Estudio de Investigación de ProBNP de Disnea en el Departamento de Urgencias (PRIDE), un estudio ciego, prospectivo, de 599 sujetos con disnea que se presentaron en el DU del Hospital General de Massachussets, y se realizó para la validación del uso de diagnóstico y pronóstico del ensayo de NT-proBNP. Los resultados del estudio PRIDE se presentaron recientemente (Januzzi y col., Am. J. Cardiol. 95(8): 948-54 (2005)).

10 El patrón oro para el diagnóstico de IC aguda se basó en la impresión de médicos de evaluación, que desconocían los valores de NT-proBNP, que tenían toda la información disponible desde la presentación a lo largo de los 60 días de seguimiento; para los pocos pacientes en los que el diagnóstico era dudoso, se pidió a los evaluadores que utilizaran las pautas indicadas por el Estudio Cardíaco de Framingham (McKee y col., N. Engl. J. Med. 285(26): 1441-6 (1971)).

15 Como se indicó, a 209 sujetos (35%) en el estudio PRIDE se les adjudicó que tenían disnea debido a una IC desestabilizada aguda, de los que 17 tenían síntomas leves (Clase II) por la clasificación de la Asociación Cardíaca de Nueva York (NYHA), 80 tenían síntomas moderados (Clase III) y 112 tenían síntomas severos (síntomas de Clase IV). De los que no tenían IC aguda, los diagnósticos más comunes fueron exacerbación de enfermedad obstructiva de las vías respiratorias (n = 150; incluye exacerbación de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (n = 120) y asma (n = 30), así como neumonía aguda (n = 64).

20 Después de un año, se contactó con el médico a cargo del tratamiento para cada paciente para averiguar el estado vital del paciente. Como se indica, se completó el seguimiento de un año en 597 sujetos en total (Januzzi y col., Arch Intern Med 2006; 166(3): 315-20).

25 En el estudio PRIDE se midió NT-proBNP usando un inmunoensayo disponible en el mercado (ensayo de ProBNP ELECSYS<sup>®</sup>, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) usando la metodología establecida. En el estudio PRIDE, el ensayo tenía coeficientes de variación inter-ensayo del 0,9%. La sangre recogida en el momento de la presentación se analizó posteriormente con respecto a las concentraciones de ST2, usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd), como se describe en el [Ejemplo 1](#) del presente documento. Este ensayo utiliza anticuerpos monoclonales contra ST2 humano tanto para la captura como para la detección, y tuvo una diferencia en porcentaje relativa del 17,5% en el presente análisis. El plasma usado para el presente estudio previamente se había sometido a un solo ciclo de congelación-descongelación.

### **Comparaciones entre grupos**

35 Se realizaron comparaciones de características clínicas entre pacientes utilizando ensayos chi-cuadrado para datos categóricos y el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon para datos continuos. Las comparaciones de las concentraciones de ST2 entre las clases de diagnóstico, las clases de síntomas de la Asociación Cardíaca de New York (NYHA) y las categorías de resultados se realizaron usando ensayos no paramétricos.

### **Correlaciones**

40 Los resultados de ST2 y NT-proBNP se transformaron en logaritmos para establecer la distribución normal. Las correlaciones entre estas variables transformadas en logaritmos se evaluaron con el coeficiente de correlación de Spearman. Hubo una modesta correlación entre las concentraciones de ST2 transformadas en logaritmos y log-NT-proBNP en todos los sujetos (r = 0,58, p < 0,001), los que no tenían IC aguda (r = 0,47, p < 0,001) y los que tenían IC aguda (r = 0,40, p < 0,001).

**Análisis del punto de corte**

Las características de los pacientes en función de una concentración de ST2 por encima o por debajo de 0,20 ng/ml se detallan en la Tabla 3, que demuestra la prevalencia esperada de factores coherentes con un diagnóstico de IC incidente.

5 **Tabla 3: Características de los sujetos de estudio en función de las concentraciones de ST2**

<b>Característica</b>	<b>ST2 ≥ 0,2 ng/ml (n = 320)</b>	<b>ST2 &lt; 0,2 ng/ml (n = 279)</b>	<b>Valor P</b>
Edad (media ± SD), años	67,7 ± 15,0	56,5 ± 17,5	< 0,001
<b>Historial médico pasada</b>			
Miocardiopatía previa	13%	7%	0,02
Insuficiencia cardiaca congestiva previa	37%	12%	< 0,001
Arritmia	20%	13%	0,02
Hipertensión	54%	43%	0,009
Diabetes mellitus	35%	16%	< 0,001
Arteriopatía coronaria	33%	22%	0,005
Infarto de miocardio	15%	11%	NS
Enfermedad obstructiva de las vías respiratorias	15%	8%	0,005
<b>Síntomas/signos</b>			
Disnea paroxísmica nocturna	16%	8%	0,002
Ortopnea	22%	12%	0,001
Edema en extremidades inferiores	26%	7%	< 0,001
Dolor torácico	35%	52%	< 0,001
Disnea en reposo	50%	24%	< 0,001
<b>Medicaciones en el momento de la presentación</b>			
Beta bloqueantes	44%	32%	0,002
Diuréticos de asa	41%	17%	< 0,001
Digoxina	13%	8%	0,04
Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	25%	16%	0,009
<b>Exploración física</b>			
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> , media ± SD)	28,0 ± 7,0	28,5 ± 6,5	NS
Pulso, latidos por minuto (media ± SD)	91,7 ± 23,8	82,9 ± 20,6	< 0,001
Distensión de la vena yugular	13%	4%	< 0,001
Soplo	14%	8%	0,009



Reflujo hepatoyugular	3%	0%	0,002
	(cont.)		
Edema en extremidades inferiores	34%	14%	< 0,001
Estertores	35%	16%	< 0,001
<b>Hallazgos electrocardiográficos</b>			
Fibrilación auricular	16%	9%	0,009
<b>Hallazgos radiográficos en el tórax</b>			
Edema intersticial	25%	8%	< 0,001
Derrame pleural	28%	5%	< 0,001
Cefalización de vasos	2%	0%	0,04
<b>Hallazgos de laboratorio</b>			
Creatinina en suero, mg/dl, media $\pm$ SD	1,2 $\pm$ 0,5	0,98 $\pm$ 0,3	< 0,001
Aclaramiento de creatinina, ml/min/1,73 m <sup>2</sup> , media $\pm$ SD	67,3 $\pm$ 32,0	85,2 $\pm$ 61,0	< 0,001
Nitrógeno ureico en sangre, mg/dl, media $\pm$ SD	25,5 $\pm$ 17,0	17,2 $\pm$ 10,0	< 0,001
Troponina T, ng/dl, media $\pm$ SD	0,063 $\pm$ 0,32	0,022 $\pm$ 0,16	0,04
NT-proBNP, pg/ml, mediana (IIC)	1800 (365-6745)	97 (40-477)	< 0,001

Estos resultados indican que ST2 generalmente no está correlacionado con el IMC, pero está asociado con otros diversos índices incluyendo los niveles y el aclaramiento de creatinina en suero, la insuficiencia cardiaca congestiva previa y diabetes mellitus.

### 5 Ejemplo 3. Medición de las concentraciones de ST2 soluble para la determinación del riesgo de muerte en pacientes con disnea aguda

Se evaluaron factores predictivos de mortalidad dentro de un periodo de un año después de la presentación con disnea en la población descrita en el Ejemplo 2. Los puntos de corte de diagnóstico de ST2 candidatos se evaluaron con el uso de técnicas de muestreo con reemplazamiento (bootstrapping) usando el programa STATA SWBOOT; esto se continuó por análisis multivariantes de regresión logística. Cada uno de los procedimientos de estimación se codificó en lenguaje de programación y después se sometió al comando de prefijo de muestreo con reemplazamiento de STATA para 10 muestras aleatorias repetidas con reemplazamiento, seguido de 100 repeticiones para las variables seleccionadas en los análisis iniciales. El tamaño de muestra con reemplazamiento fue 593 (el tamaño de la serie de datos entera). Los factores introducidos en el análisis incluían elementos de la historia médica pasada y presente, síntomas y signos, uso de medicación, así como resultados de estudios de diagnóstico incluyendo estudios radiográficos, electrocardiografía, hematología y química sanguínea. Las mediciones de la función renal incluían resultados de creatinina en suero así como tasa de filtración glomerular estimada (Levey y col., Ann. Intern. Med. 130 (6):461-70. (1999)). A continuación, se introdujeron los predictores de mortalidad candidatos (es decir, los que tenían más de 70 selecciones en las repeticiones de muestreo con reemplazamiento) en análisis multivariantes de regresión logística, con IC aguda como variable dependiente. Para cada regresión logística, los resultados se introdujeron en una sola etapa directa con cola de probabilidad para introducir la serie a  $p = 0,01$  y para retirar el efecto de la regresión a  $p = 0,02$ , y la bondad de ajuste se evaluó usando el ensayo de Hosmer-Lemeshow.

En los análisis de mortalidad que incluían NT-proBNP, esta variable se modeló de forma dicótoma, con un valor umbral de 986 pg/ml para predecir la muerte en un año, como se identificó previamente (Januzzi y col., 2006, anteriormente). Después del ensayo de SWBOOT, las variables independientes candidatas validadas resultantes se introdujeron por etapas en un modelo de Riesgo Proporcional de Cox; las proporciones para este modelo se comprobaron y se observó que eran apropiadas. Se generaron razones de riesgo (HR) con IC (intervalo de confianza) 95% para cada predictor independiente de muerte en un año.

Se construyeron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar las tasas de mortalidad dentro de un año

en grupos divididos en función de las concentraciones de ST2 (así como el diagnóstico), usando el ensayo de rangos logarítmicos para comparar el significado de las tasas de mortalidad.

Para todos los análisis estadísticos, se usó el software SPSS (Chicago, IL, USA) o STATA (College Station, TX); todos los valores de p son bilaterales, considerándose significativos resultados compuestos < 0,05.

- 5 En un periodo de un año habían muerto 93 sujetos (15,7%). Las medianas de las concentraciones de ST2 fueron significativamente mayores entre los difuntos (1,03 ng/ml, IIC (intervalo intercuartil) = 0,38 - 2,43) que en los supervivientes (0,18 ng/ml, IIC = 0,08 - 0,51, p <0,001). Este patrón de mayores concentraciones de ST2 en los difuntos se mantuvo cuando los sujetos se consideraron en función de la ausencia de IC aguda (1,14 frente a 0,13 ng/ml, p <0,001), así como en los que tenían IC aguda (0,90 frente a 0,45 ng/ml, p <0,001).
- 10 Se realizó un análisis de curva característica operativa del receptor (ROC) usando el software Analyse-If (Analyse-It, Ltd, Leeds, Reino Unido) para ST2, usando el diagnóstico de patrón oro de IC o supervivencia dentro de un año como patrón de referencia, y se estimó el área bajo la curva (ABC); a continuación, se identificaron puntos de corte potenciales tanto para el diagnóstico como para el pronóstico y se estimaron su sensibilidad, especificidad así como valores predictivos positivos y negativos (VPP, VPN). Para evaluar adicionalmente la utilidad de ROC óptima-puntos de corte óptimos, los pacientes también se dividieron en deciles basándose en sus concentraciones de ST2 y se evaluaron con respecto a los efectos del umbral de ST2 sobre la frecuencia de mortalidad.
- 15

Los análisis de ROC demostraron un ABC de 0,80 (IC 95% = 0,75 - 0,84, p <0,001) para ST2 y la mortalidad en un año (Figura 1); el punto de corte óptimo identificado por ROC fue 0,29 ng/ml, que era sensible en un 87% (IC 95% = 79 - 93%), específico en un 63% (IC 95% = 58 - 67%) y tenía un VPP del 30% y un VPN del 96%. En el análisis de deciles, se detectó un efecto del umbral para la mortalidad en la mediana de ST2 de 0,20 ng/ml (Figura 2). También se encontró una relación graduada entre las concentraciones de ST2 y la probabilidad de muerte, de tal forma que los sujetos por debajo de la mediana de la concentración de ST2 (n = 236) disfrutaron de las menores tasas de muerte (2%) en comparación con los de los dos deciles máximos (n = 117) que demostraron una tasa de muerte del 42% en un año, una HR del 43,0 (IC 95% = 15,0 - 123,0, p <0,001).

20

25 En un modelo de muestreo con reemplazamiento final para la predicción de muerte dentro de un año (Tabla 4), se seleccionó una concentración de ST2  $\geq$  0,20 ng/ml en 96 de 100 repeticiones y representaba el mayor predictor de muerte en un año en pacientes con falta de aliento (HR = 5,6, IC 95% = 2,2 - 14,2, p <0,001). Notablemente, incluso con la inclusión de NT-proBNP en los modelos, un valor de ST2  $\geq$  0,20 ng/ml se mantuvo como la variable más seleccionada en las repeticiones de muestreo con reemplazamiento (86 de 100 selecciones), y se mantuvo como el predictor de muerte más fuerte dentro de un año (HR = 4,6, IC 95% = 1,8 - 11,8, p = 0,002).

30

**Tabla 4: Identificación de predictores independientes de muerte en el plazo de un año en sujetos con disnea**

<b>Sin NT-proBNP en el modelo</b>				
	<b>Análisis de muestreo con reemplazamiento</b>	<b>Análisis multivariable</b>		
<b>Variable</b>	<b>Número seleccionado de 100 réplicas</b>	<b>Razón de riesgo</b>	<b>Intervalos de confianza del 95%</b>	<b>Valor de P</b>
ST2 transformado en log	99	2,7	1,6-4,4	< 0,001
ST2 $\geq$ 0,20 ng/ml	96	5,6	2,2-14,2	< 0,001
Hemoglobina	73	0,91	0,85-0,98	0,008
Derrame pleural en radiografía de tórax	95	1,88	1,2-2,8	0,005
<b>Con NT-proBNP en el modelo</b>				
	<b>Análisis de muestreo con reemplazamiento</b>	<b>Análisis multivariable</b>		
<b>Variable</b>	<b>Número seleccionado de</b>	<b>Razón de</b>	<b>Intervalos de confianza del</b>	<b>Valor de</b>

	100 réplicas	riesgo	95%	P
ST2 $\geq$ 0,20 ng/ml	86	4,6	1,8-11,8	0,002
(cont.)				
NT-proBNP $\geq$ 986 pg/ml	85	2,3	1,3-4,0	0,002
Tos	80	0,60	0,39-0,95	0,03
Derrame pleural en radiografía de tórax	80	1,6	1,0-2,4	0,05
ST2 transformado en log	77	2,6	1,6-4,4	< 0,001

5 Los resultados de la Tabla 4 se basan en 100 repeticiones de muestreo con reemplazamiento, seguido del análisis multivariable de Riesgo Proporcional de Cox, y se muestran en ausencia y presencia de resultados de NT-proBNP en el modelo. Sólo se muestran las variables seleccionadas > 70 de 100 veces en las repeticiones de muestreo con reemplazamiento.

10 Las curvas de riesgo de Kaplan-Meier demuestran que entre los sujetos con concentraciones de ST2  $\geq$  0,20 ng/ml, las tasas de muerte se elevaron rápidamente desde la inscripción y continuaron elevándose dentro de un periodo de un año (Figura 3A; valor de p de rango logarítmico < 0,001). Relaciones similares entre los valores de ST2  $\geq$  0,20 ng/ml en los que no tenían y que tenían el diagnóstico de IC aguda en la presentación (Figura 3B; valor de p de rango logarítmico para ambos < 0,001).

Por lo tanto, los niveles de ST2 son un excelente predictor de la mortalidad.

#### Ejemplo 4. Medición de las concentraciones de NT-proBNP y ST2 solubles para la determinación del riesgo de muerte en pacientes con disnea aguda

15 Como tanto ST2 como NT-proBNP eran predictores independientes de muerte dentro de un año, se examinaron las tasas brutas de muerte en sujetos en función de las concentraciones de ST2 y NT-proBNP usando los procedimientos descritos anteriormente. El porcentaje de sujetos que murieron en cada categoría se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5: Tasas de mortalidad en función de las concentraciones de NT-proBNP y ST2 en el Estudio PRIDE**

	ST2 <0,20 ng/ml	ST2 $\geq$ 0,20 ng/ml
NT-proBNP < 986 pg/ml	1,7%	13,1%
NT-proBNP $\geq$ 986 pg/ml	4,5%	37,0%

20 La mayor parte de la mortalidad entre los sujetos en el estudio PRIDE se produjo en los que tenían niveles elevados de ST2 (iguales o superiores a 0,20 ng/ml) y NT-proBNP (iguales o superiores a 986 pg/ml) (Tabla 5 y Figura 4).

De esta manera, la combinación de los niveles de NT-proBNP y ST2 es útil para predecir el riesgo de mortalidad.

#### Ejemplo 5. Concentraciones elevadas de ST2 en pacientes en ausencia de IM

25 Se determinaron las concentraciones de ST2 como se describe en el Ejemplo 1, anterior, en una población de 350 pacientes que se presentaron en el DU con dolor torácico. Se obtuvieron muestras de suero y se realizaron mediciones de ST2 inicialmente y 90 y 180 minutos después para la mayoría de los pacientes. Además, para la mayoría de los pacientes, la muestra basal se recogió en las 2 horas posteriores al inicio de los síntomas.

30 17 pacientes tuvieron un diagnóstico final de IM y 5 de éstos tuvieron ST2  $\geq$  0,23 (0,25 - 0,65). Dos de estos pacientes eran negativos para troponina. 11 pacientes tuvieron niveles de ST2 muy altos (0,97 - 9,22), pero ninguno de estos pacientes tuvo un diagnóstico final confirmado de IM, aunque todos tenían enfermedades graves, incluyendo EPOC, linfoma, sepsis, abuso de alcohol y embolia pulmonar. El diagnóstico de estos 11 pacientes se

muestra en la Tabla 6; ST2 1 es el nivel basal, ST2 2 es 90 minutos después y ST2 3 es a los 180 minutos.

**Tabla 6: Pacientes sin IM con altos niveles de ST2**

Paciente	ST2 1 (ng/ml)	ST2 2 (ng/ml)	ST2 3 (ng/ml)	Diagnóstico final
811	1,43	1,62	1,63	EPOC con insuficiencia cardiaca después de cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria e hipertensión pulmonar.
847	2,37	4,44	3,53	Embolia pulmonar
873	2,36	2,42	2,74	RAD
898	1,32	1,24	1,66	Historial de insuficiencia cardiaca después de cirugía de derivación de arteria coronaria
920	6,03	9,22		Sepsis, bacteriemia
928	3,80	4,69	3,99	Hipertensión y abuso de alcohol
952	6,76			Abuso de alcohol, gastritis e hipertensión pulmonar
953	3,77			Historial de insuficiencia cardiaca después de cirugía de derivación de arteria coronaria
1055	1,42	1,28	1,13	URI
1213	0,97	1,19	1,07	Embolia pulmonar y pericarditis
1245	4,11	6,46		Linfoma e hipertensión
1280	1,30	1,33		EPOC

5 Estos resultados demuestran que un nivel elevado de ST2 está asociado con enfermedad grave, independientemente de la patología subyacente.

**Ejemplo 6. Análisis seriado de concentraciones de ST2 en pacientes hospitalizados con insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD)**

10 Se determinaron las concentraciones de ST2 como se describe en el Ejemplo 1, anterior, así como las concentraciones de BUN, NT-pro-BNP y BNP en una población de 150 sujetos que se diagnosticaron y se admitieron por una insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD) en el Hospital de la Administración de Veteranos de San Diego. Algunos pacientes tuvieron un nuevo diagnóstico de ICAD y otros pacientes tuvieron una exacerbación aguda de la insuficiencia cardiaca existente. Se tomaron muestras en días sucesivos en varios pacientes, aunque no todos los pacientes proporcionaron una muestra todos los días. La duración de la estancia (DDE) en el hospital para  
15 estos pacientes variaba de 1 a 24 días con una media de 5 días. La Tabla 7 muestra las características de la población; como era de esperar, dado que la población procedía del Hospital de Veteranos de San Diego, la población era principalmente del sexo masculino y de raza caucásica.

**Tabla 7: Frecuencia de las características de los pacientes**

	Frecuencia	Porcentaje
<b>Sexo</b>		
Masculino	148	98,7
Femenino	2	1,3
Total	150	100

ES 2 378 314 T3

<b>Etnia</b>		
(cont.)		
Blanco	115	76,6
Negro	22	14,7
Hispano	9	6
Asiático	3	2
Otro	1	0,7
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>100</b>
<b>Diagnóstico</b>		
ICC nueva	14	9,3
ICC peor	110	73,3
Otro	26	17,3
<b>NYHA*</b>		
Clase II	9	6
Clase III	75	50
Clase IV	66	44
<b>Etiología</b>		
Desconocida	61	40,7
Isquémica	43	28,7
Hipertensión	23	15,3
Otra	9	6,1
Alcohol	5	3,3
Idiopática	3	2
Válvula	1	0,7
Fármaco	1	0,7

<p>* NYHA = Estadios de Insuficiencia Cardiaca según la Asociación Cardiaca de Nueva York:</p> <p><u>Clase I:</u> Sin limitación de actividad física. La actividad física normal no produce fatiga excesiva, palpitaciones o disnea (falta de aliento).</p> <p><u>Clase II:</u> Ligera limitación de actividad física. Comodidad en reposo, pero la actividad física normal produce fatiga, palpitaciones o disnea.</p> <p><u>Clase III:</u> Notable limitación de actividad física. Comodidad en reposo, pero una actividad menor de la normal produce fatiga, palpitaciones o disnea.</p> <p><u>Clase IV:</u> Incapacidad de realizar ninguna actividad física sin malestar. Síntomas de insuficiencia cardiaca en reposo. Si se realiza cualquier actividad física, aumenta el malestar.</p>
---

La población de pacientes se sometió a un seguimiento durante al menos 90 días y los acontecimientos adversos se presentaron en tablas. En la Tabla 8 se muestra un resumen de acontecimientos.

**Tabla 8: Resumen de acontecimientos**

	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Mortalidad en el hospital</b>	8	5,3
<b>Readmisión en 30 días</b>	13	8,7
<b>Mortalidad en 30 días por ICC</b>	10	6,7
<b>Mortalidad en 30 días por otra causa</b>	7	4,7
<b>Readmisión en 90 días</b>	26	17,3
<b>Mortalidad en 90 días por ICC</b>	26	17,3
<b>Mortalidad en 90 días por otra causa</b>	9	6,0
* La frecuencia de resultados de 90 días es acumulativa de todos los acontecimientos que se produjeron en puntos de tiempo anteriores.		

5

La característica operativa del receptor y el área bajo la curva (ABC) se determinaron como se describe en el presente documento para la correlación de los niveles de BNP, NT-proBNP y ST2 en la admisión y en el momento del alta con los acontecimientos adversos indicados en la Tabla 8. Los resultados se muestran en la Tabla 9. El ABC para ST2 cambia desde el primero al último = 0,820.

10

**Tabla 9: RESUMEN DE ROC (AUC)**

	<b>Mortalidad en el hospital</b>	<b>Acontecimientos en 30 días</b>	<b>Mortalidad en 30 días</b>	<b>Acontecimientos en 90 días</b>	<b>Mortalidad en 90 días</b>
BNP en la admisión	0,735	0,536	0,630	0,569	0,653
BNP en el alta	NA	0,545	0,648	0,575	0,692
NT proBNP en la admisión	0,790	0,638	0,785	0,624	0,763
NT-proBNP en el alta	NA	0,637	0,831	0,631	0,815

ST2 en la admisión	0,638	0,549	0,574	0,558	0,603
ST2 en el alta	0,752	0,642	0,760	0,657	0,772
Cambio en ST2	NA	0,573	0,793	0,604	0,809

5 En esta población pequeña y extremadamente homogénea, los biomarcadores que predijeron de forma más precisa los acontecimientos indicados incluían el cambio en ST2 para la mortalidad de 30 y 90 días, y los niveles de NT-proBNP en el alta para la mortalidad en 30 y 90 días. Como era de esperar, la homogeneidad de esta cohorte dio como resultado que el ABC usando la medición de la admisión para cada biomarcador fuera menor de lo observado en la cohorte de PRIDE (descrita en los Ejemplos 2-3). El alto número de pacientes sin insuficiencia cardiaca diagnosticada presentados en la cohorte de PRIDE dio como resultado un alto poder discriminatorio de ST2 en la medición de la admisión. En esta cohorte especializada, en la que cada paciente ya tenía un diagnóstico de insuficiencia cardiaca, es de esperar que el nivel de ST2 en la admisión esté algo elevado; por consiguiente, el poder predictivo para los acontecimientos posteriores está algo disminuido en comparación con una cohorte heterogénea que es más representativa de la población general.

10 Se analizó un modelo univariante de predictores de la mortalidad en 90 días incluyendo los mismos marcadores, así como BUN y el aclaramiento de creatinina, que son marcadores de la función renal. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

15 **Tabla 10: Predictores univariables de la mortalidad a 90 días**

Predictor	Cociente de posibilidades	Valor de P
<b>Cambio en ST2: <math>\geq -0,02</math> frente a <math>&lt; -0,02</math></b>	11,55	0,002
<b>ST2: <math>\geq -0,2</math> frente a <math>&lt; 0,2</math> en la admisión</b>	1,14	0,83
<b>ST2: <math>\geq -0,2</math> frente a <math>&lt; 0,2</math> en el alta</b>	7,00	0,003
<b>BNP: <math>\geq 400</math> frente a <math>&lt; 400</math> en la admisión</b>	1,91	0,35
<b>BNP: <math>\geq 400</math> frente a <math>&lt; 400</math> en el alta</b>	2,59	0,14
<b>NT-ProBNP: <math>\geq 5000</math> frente a <math>&lt; 5000</math> en la admisión</b>	3,96	0,09
<b>NT-ProBNP: <math>\geq 5000</math> frente a <math>&lt; 5000</math> en el alta</b>	6,72	0,007
<b>BUN continuo en la admisión</b>	1,033	0,002
<b>Creatinina continua en la admisión</b>	1,50	0,07

20 En este análisis, para las variables dicótomas (todas excepto BUN y creatinina), la oportunidad relativa representa la mayor probabilidad de muerte dentro de un periodo de 90 días para un ensayo positivo frente a un ensayo negativo. Para las variables continuas (BUN y creatinina), la oportunidad relativa representa la mayor probabilidad de muerte dentro de un periodo de 90 días para cada aumento de 1 mg/dl. Como se muestra en la Tabla 10, el cambio en ST2 proporcionó la mejor indicación de mortalidad en 90 días, con un valor de OR de 11,55 ( $p = 0,002$ ).

También se construyó un modelo multivariable que incluía BNP, NT-proBNP, BUN y los niveles de aclaramiento de creatinina con cambio en ST2. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11: Predictores de la mortalidad de 90 días con cambio en ST2**

Predictor adicional en modelo	Cambio en ST2		Predictor adicional		R <sup>2</sup> del Modelo
	Cociente de posibilidades	Valor de P	Cociente de posibilidades	Valor de P	
<b>BNP en admisión</b>	1218	0,002	2,04	0,34	0,246

<b>BNP en el alta</b>	13,98	0,001	3,56	0,07	0,285
<b>NT-ProBNP en admisión</b>	14,49	0,001	5,48	0,044	<b>0,312</b>
<b>NT-ProBNP en el alta</b>	10,04	0,005	5,49	0,021	<b>0,325</b>
<b>BUN en admisión</b>	7,87	0,014	1,023	0,034	<b>0,300</b>
<b>Creatinina en admisión</b>	10,08	0,005	1,260	0,30	0,241

5 Cuando sólo se consideró el cambio en ST2 (la diferencia entre los niveles de ST2), el  $R^2$  para el modelo fue de 0,223. Como puede verse en la Tabla 11, en cada caso el cambio en ST2 fue el mayor predictor debido a que tenía el mínimo valor de p. Además, sólo NT-proBNP en la admisión, NT-proBNP en el alta y BUN en la admisión proporcionaron una predicción adicional aparte del cambio en ST2 que conseguía un significado estadístico ( $p < 0,05$ ) (véanse los valores de  $R^2$  en negrita), mientras que BNP en el alta consiguió un significado estadístico marginal ( $p = 0,07$ ).

10 A continuación, se comparó la ROC para el cambio en BNP y el cambio en ST2. Como se muestra en la Figura 5, el ABC para el cambio en BNP durante la hospitalización fue de 0,67, mientras que el ABC para el cambio en ST2 fue de 0,78, significativamente mayor, lo que indica que el cambio en ST2 es un predictor mucho más preciso de la mortalidad en 90 días que BNP.

15 El cambio en ST2 se analizó junto con los niveles de BUN para determinar si los dos marcadores, cuando se usaban juntos, proporcionaban una información predictiva adicional. Los resultados, mostrados en la Figura 6, demuestran que los niveles de BUN y los cambios en los niveles de ST2 pueden usarse para clasificar a los pacientes por riesgo: los pacientes con bajos niveles de BUN (menores de 40 mg/dl) y niveles de ST2 que se redujeron en un 15% o más tenían los mínimos niveles de riesgo; los pacientes con mayores niveles de BUN y niveles de ST2 que se redujeron en menos de un 15% (o aumentaron o permanecieron constantes) tenían los mayores niveles de riesgo, mientras que los sujetos con niveles de BUN y ST2 reducidos en al menos un 15%, o un bajo nivel de BUN y ST2 reducido en un 15% o más, tenían un nivel medio de riesgo (que aún estaba muy por encima del de la categoría de mínimo riesgo, véase la Figura 6).

20 Los cambios en los niveles de ST2 a lo largo del tiempo se evaluaron en una base de tiempo transcurrido para determinar un periodo óptimo de tiempo entre la primera y la segunda mediciones de ST2. Los resultados, mostrados en las Tablas 11A y 11B, indican que un tiempo transcurrido de al menos dos días y dentro de cuatro días entre la primera y la segunda mediciones de ST2 proporciona la mejor información con respecto a la probabilidad de muerte dentro de 90 días.

**Tabla 11A: Resumen de los valores de ST2 en el tiempo**

	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mediana</b>
<b>1 día</b>	130	0,97	0,78
<b>2 días</b>	99	1,00	0,60
<b>3 días</b>	66	1,42	0,42
<b>4 días</b>	44	1,87	0,57
<b>5 días</b>	34	1,86	0,74

**Tabla 11B: Correlación de los valores de ST2 con la mMortalidad en 90 días**

	<b>N &gt; 0,85</b>	<b>Nº de muertes</b>	<b>% de muertes</b>	<b>N &lt; 0,85</b>	<b>Nº de muertes</b>	<b>% de muertes</b>
<b>1 día</b>	54	7	13%	76	7	9%
<b>2 días</b>	27	7	26%	72	4	6%
<b>3 días</b>	19	4	21%	47	2	4%



<b>4 días</b>	18	6	33%	26	1	4%
<b>5 días</b>	14	6	43%	20	1	5%

5 En la tabla 11B “N > 0,85” indica el número de personas que tuvieron una reducción menor del 15% en ST2 con respecto al periodo de tiempo indicado (de forma que el segundo nivel es un 85% o más del primer nivel). Después de al menos dos días, el porcentaje de personas con una relación de 0,85 o mayor que murieron estuvo por encima del 20%, mientras que el porcentaje de pacientes que murieron con una relación inferior a 0,85 se redujo inicialmente y permaneció bajo.

10 Cuando se siguieron los valores medios de ST2 a lo largo del tiempo en esta población, se observó un claro aumento en la correlación de riesgo de mortalidad dentro de 90 días tres-cuatro días después de realizar la medición inicial, como se muestra en la tabla 12A y en las Figuras 7A y 7B. La Figura 7B, un gráfico de caja y bigotes que agrupa los percentiles 25 y 75, ilustra que la distinción entre supervivientes y difuntos se resuelve claramente con el valor de ST2. Los resultados de ST2 contrastan con los resultados generados comparando BNT o NT-proBNP en estos mismos días de tratamiento. Aunque los valores medios para cada uno de estos marcadores son distintos entre supervivientes y difuntos, los grupos no son estadísticamente distintos entre sí, como se muestra en las Figuras 7C y 7D. A diferencia de ST2, los grupos de supervivientes y difuntos para BNP y NT-proBNP solapan significativamente entre los percentiles 25 y 75. En este análisis, ST2 es un marcador más preciso que BNP o NT-proBNP solo para predecir la mortalidad en función del cambio a lo largo del tiempo durante la hospitalización.

15 Cuando se calcularon las relaciones medias de ST2, de nuevo, se observó una diferencia significativa; los resultados se muestran en la Tabla 12B y en la Figura 8.

**Tabla 12A: Valores promedio de ST2 denle el tiempo.**

	Valor promedio de ST2					
	ST2-1	ST2-2	ST2-3	ST2-4	ST2-5	ST2-6
<b>no supervivientes</b>	0,33	0,38	0,44	1,14	0,89	0,71
<b>supervivientes</b>	0,27	0,24	0,15	0,17	0,15	0,17

20

**Tabla 12B: Cambio en ST2 en el tiempo**

	Relación promedio de ST2				
	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días
<b>no supervivientes</b>	1,04	2,44	9,57	8,43	6,46
<b>supervivientes</b>	0,96	0,82	0,60	0,63	0,67

También es posible usar la relación de ST2 junto con la relación de NT-proBNP en un análisis de matriz 2 x 2 para refinar adicionalmente la estratificación de riesgo de estos pacientes, como se muestra en la Tabla 12C.

**Tabla 12C: Cambio en ST2 y cambio en NT-proBNP para la estratificación del riesgo**

Relaciones de NT-proBNP y ST2				
	NT < 0,7, ST2 < 0,85	NT < 0,7, ST2 > 0,85	NT > 0,7, ST2 < 0,85	NT > 0,7, ST2 > 0,85
N	45	7	34	28
Mortalidad	0	2	3	6
% Mortalidad	0,0%	28,6%	8,8%	21,4%

25

Estos resultados demuestran que el cambio en ST2 a lo largo del tiempo es un predictor poderoso de mortalidad, por ejemplo, dentro de 90 días, tanto en los análisis predictivos univariantes como los multivariantes; se observó que el cambio en ST2 era el predictor univariante más fuerte del resultado del paciente en esta población, viéndose el valor predictivo óptimo después de 3 días de hospitalización. La combinación del cambio en los datos de ST2 con una medición de la función renal (por ejemplo, BUN) proporcionó un valor predictivo adicional, como lo hizo la inclusión de una medición de NT-proBNP con el cambio en ST2.

**Ejemplo 7. Concentraciones de ST2 para la estratificación del riesgo en pacientes con enfermedad pulmonar**

De los 599 sujetos en la población PRIDE (descrita en los Ejemplos 2 y 3), 209 tenían insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD). De los 390 sujetos restantes, 236 tenían “enfermedad pulmonar”; de los sujetos con datos disponibles, 5 tenían bronquitis sin complicaciones; uno tenía embolia pulmonar (EP); 64 tenían neumonía; y 149 tenían EPOC/asma. De los 149 con EPOC/asma, 69 tenían asma; 67 tenían enfisema; y 13 tenían bronquitis crónica.

Para evaluar la utilidad de ST2 como marcador de riesgo en estos pacientes, los niveles de ST2 se evaluaron en cada categoría de diagnóstico. Las concentraciones para cada categoría de diagnóstico se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13: Concentraciones de ST2 por diagnóstico**

Categoría	Mediana de ST2	Percentil 25 - 75
Grupo entero	0,23	0,09-0,69
EP	0,16	0,08-1,4
Neumonía	0,69	0,14-2,29
Bronquitis	0,19	0,11-0,41
Asma/EPOC	0,20	0,08-0,54
Asma	0,14	0,05-0,47
Enfisema	0,24	0,12-0,55
Bronquitis crónica	0,33	0,06-1,2

Las concentraciones de ST2 se evaluaron usando un análisis ROC para la muerte a un año, y se compararon las concentraciones en los muertos y vivos en un año. Se analizaron las tasas de mortalidad en función de las concentraciones de ST2 en un año. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y en las Figuras 9-11.

**Tabla 14: Mortalidad por diagnóstico**

	PE	PNA	Bronquitis aguda	Asma/EPOC
<b>N</b>	18	64	5	149
<b>Supervivientes N</b>	15	52	5	139
<b>Supervivientes ST2</b>	0,14 (0,07-0,36)	0,53 (0,13-1,81)	Véase anteriormente	0,17 (0,07-0,50)
<b>Difuntos ST2</b>	1,9 (1,2-3,83)	1,17 (0,4-3,17)	n/a	0,31 (0,2-1,1)

Estos resultados demuestran que, como se muestra en la Figura 9, las concentraciones de ST2 mostraron una excelente especificidad y sensibilidad (área bajo ROC = 0,73; IC 95% = 0,62-0,83; P < 0,0001). El punto de corte óptimo fue de 0,20 ng/ml, con sensibilidad del 88% y especificidad del 52% (VPP = 22%; VPN = 96%). La Figura 10 ilustra adicionalmente este punto. La mediana de las concentraciones de ST2 en sujetos que aún estaban vivos a un año era de 0,19 ng/ml (IIC 0,08-0,59, n = 211); mientras que la mediana de las concentraciones en sujetos que habían muerto dentro de un año era de 1,19 ng/ml (IIC 0,28-2,2, n = 25). Finalmente, como se muestra en la Figura 11, la tasa de mortalidad aumentó espectacularmente en función de la concentración de ST2, usando un umbral de 0,2 ng/ml.

Se usaron análisis multivariantes de Riesgo Proporcional de Cox para identificar predictores independientes de muerte en un año; los resultados se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15: Predictores independientes de muerte en enfermedad pulmonar**

Características	Razón de riesgo	IC del 95%	Valor de P
<b>Edad</b>	1,01	0,9R-1,04	0,71
<b>Sexo</b>	1,36	0,60-3,07	0,74
<b>ST2 ≥ 0,20 ng/ml</b>	6,14	1,80-21,0	0,004
<b>Derrame pleural en CXR</b>	2,99	1,30-6,63	0,009
<b>Enfisema</b>	0,29	0,13-0,65	0,003
<b>Espironolactona</b>	13,7	3,60-52,0	< 0,001

- 5 Estos datos demuestran que los niveles de ST2 son un excelente predictor de muerte dentro de un año, independientemente de la patología subyacente, en sujetos que se presentaron con disnea.

**Ejemplo 8. Concentraciones de ST2 no se ven afectadas por la insuficiencia renal**

10 El efecto de la insuficiencia renal sobre las concentraciones de ST2 se evaluó en una población de 135 pacientes con insuficiencia renal de moderada a severa. Ninguno de los pacientes se estaba sometiendo a diálisis y a ninguno se le había diagnosticado previamente ECV. Todos los pacientes se evaluaron usando la tasa de filtración glomerular (TFG en ml/min) como se determina por el procedimiento de Modificación de la Dieta en Enfermedad Renal (MDRD) como una medida de la función renal. También se realizaron ecocardiografía y mediciones de calcio en arteria coronaria (CAC) en cada sujeto para detectar EVD latente. También se evaluaron múltiples biomarcadores.

15 La estadística descriptiva para esta cohorte se muestra en la Tabla 16; los valores medios de TFG y ST2 se ilustran gráficamente en las Figuras 12A-B.

**Tabla 16: Tasa de Filtración Glomerular (TFG) y Niveles de ST2**

	TFG	Niveles de ST2 (ng/ml)
<b>Media</b>	34,5	0,122
<b>Mediana</b>	34	0,107
<b>Error típico</b>	0,989	0,005
<b>Desviación típica</b>	11,4	0,059
<b>Coef. Var.</b>	33,3	48,346
<b>LC 95% inferior</b>	32,5	0,112
<b>LC 95% superior</b>	36,4	0,132
<b>Percentil 25</b>	27	0,090
<b>Percentil 75</b>	43	0,127
<b>Mínimo</b>	9	0,068
<b>Máximo</b>	59	0,476
<b>Recuento</b>	135	135

En esta cohorte de pacientes con enfermedad crónica estable, sólo 10 (8%) tuvieron niveles de ST2 encima de 0,2, de los que el máximo fue 0,476 ng/ml. La distribución de los valores de ST2 se muestra en la Figura 13. Esto era lo esperado en

esta población de sujetos con insuficiencia renal crónica tratada, no se esperaría ver niveles de ST2 muy elevados.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson en esta población para determinar si había una correlación entre los niveles de ST2 y TFG. Los resultados se muestran en las Tablas 17 y 18.

**Tabla 17: Resultados de la correlación de pearson - TFG y ST2**

<b>Estadística Descriptiva</b>				
<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Error típico</b>	<b>N</b>
<b>TFG</b>	34,5	11,5	0,989	135
<b>ST2 (ng/ml)</b>	0,122	0,059	0,005	135
<b>Matriz de la correlación (R)</b>				
	<b>TFG</b>		<b>ST2 (ng/ml)</b>	
	(cont.)			
<b>TFG</b>	1,000		0,028	
<b>ST2 (ng/ml)</b>	0,028		1,000	

5

<b>Significado de la correlación (P)</b>			
	<b>TFG</b>		<b>ST2 (ng/ml)</b>
<b>TFG</b>	-		0,748
<b>ST2 (ng/ml)</b>	0,748		-

**Tabla 18: Resultados de la correlación de Pearson- Aclaramiento de creatinina y ST2**

<b>Estadística Descriptiva</b>				
<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Típica</b>	<b>Error Típico</b>	<b>N</b>
<b>Cr de selección</b>	2,175	0,859	0,081	113
<b>ST2 (ng/ml)</b>	0,122	0,058	0,006	113
<b>Matriz de Correlación (R)</b>				
	<b>Cr de selección</b>		<b>ST2 (ng/ml)</b>	
<b>Cr de selección</b>	1,000		-0,018	
<b>ST2 (ng/ml)</b>	-0,018		1,000	
<b>Significado de Correlación (P)</b>				
	<b>Cr de selección</b>		<b>ST2 (ng/ml)</b>	
<b>Cr de selección</b>	-		0,851	
<b>ST2 (ng/ml)</b>	0,851		-	

Estos resultados demuestran que, como era de esperar en esta población de sujetos con insuficiencia renal tratada crónica, no existe correlación entre los niveles de ST2 y TFG ( $p = 0,75$ ) o aclaramiento de creatinina ( $p = 0,851$ ) en esta población. Esto indica que la insuficiencia renal, por sí misma, no produce una elevación de los niveles de ST2.

5 Los mismos análisis se realizaron en una población de 139 sujetos en el Hospital de la Administración de Veteranos de San Diego. A todos los sujetos previamente se les había diagnosticado insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), y el nivel medio de ST2 fue aproximadamente dos veces el observado en la población de pacientes con insuficiencia renal crónica pero sin IC (véanse las Tablas 17-18). Hay una correlación casi ubicua entre la insuficiencia renal y la insuficiencia cardiaca, con una confluencia de casi el 80% de pacientes con IC en estadio III/IV que también tienen alteración de la función renal (Fonarow y Heywood, Am. J. Med. (2006) 119(12A): S17-S25). De esta manera, como  
 10 la ICAD esta correlacionada con los niveles de ST2, sería de esperar que se observara una correlación entre la insuficiencia renal (medida por TFG) y los niveles de ST2. Esto fue exactamente lo que se observó, como se muestra en las Tablas 19 y 20.

**Tabla 19: Resultados de la correlación de Pearson - TFG y ST2 en ICAD**

Estadística Descriptiva				
Variable	Media	Desviación Típica	Error típico	N
TFG	59,1	25,3	2.143	139
ST2 (ng/ml)	0,283	0,332	0.028	139
Matriz de Correlación (R)				
	TFG	ST2 (ng/ml)		
TFG	1,000	-0,062		
ST2 (ng/ml)	-0,062	1,000		
Significado de Correlación (P)				
	TFG	ST2 (ng/ml)		
TFG	-	0,470		
ST2 (ng/ml)	0,470	-		

15 **Tabla 20: Resultados de la correlación de Pearson - Relaciones de TFG y ST2 en ICAD**

Estadística Descriptiva				
Variable	Media	Desviación Típica	Error típico	N
TFG	59,1	25,3	2,143	139
Relación de ST2	1,038	3,038	0,258	139
Matriz de Correlación (R)				
	TFG	Relación de ST2		
TFG	1,000	-0,161		
Relación de ST2	-0,161	1,000		

<b>Significado de Correlación (P)</b>		
	<b>TFG</b>	<b>Relación de ST2</b>
<b>TFG</b>	-	0,058
<b>Relación de ST2</b>	0,058	-

Estos resultados demuestran que, en sujetos con ICAD, los valores de ST2, representados como un solo nivel o como una relación, están correlacionados con las mediciones de la insuficiencia renal, pero son independientes de la insuficiencia renal.

5 **Ejemplo 9: El riesgo de la mortalidad se correlaciona con las concentraciones de ST2**

Se evaluó la cantidad de riesgo de mortalidad aumentado en los sujetos que participaron en el estudio PRIDE y los veteranos de la población descrita en el Ejemplo 8.

Se evaluaron tanto umbrales de ST2 de 0,2 como de 0,7 ng/ml a través de toda la población (Tabla 21) y la subserie de ICAD (Tabla 22). La mayor diferencia entre los dos umbrales es que el VPP aumenta y el VPN disminuye para el umbral de 0,7 ng/ml en estas dos series de pacientes.

10

**Tabla 21 - % de Mortalidad por el nivel de ST2 en la Cohorte de PRIDE**

	<b>ST2 ≥ 0,7</b>	<b>ST2 &lt; 0,7</b>	<b>ST2 ≥ 0,2</b>	<b>ST2 &lt; 0,2</b>
<b>N Total</b>	146	447	317	275
<b>N Mortalidad</b>	52	41	88	5
<b>% Mortalidad</b>	35,6%	9,2%	27,8%	1,8%

El VPN para 0,2 ng/ml es del 98,2% y para 0,7 ng/ml es del 90,8% en esta población.

**Tabla 22: Porcentaje de Mortalidad por nivel de ST2 en sujetos con ICAD**

	<b>ST2 ≥ 0,7</b>	<b>ST2 &lt; 0,7</b>	<b>ST2 ≥ 0,2</b>	<b>ST2 &lt; 0,2</b>
<b>N Total</b>	81	127	167	41
<b>N Mortalidad</b>	30	26	55	1
<b>% Mortalidad</b>	37,0%	20,5%	32,9%	2,4%

15

El VPN para 0,2 ng/ml es del 97,6% y para 0,7 ng/ml es del 79,5% en esta cohorte.

Para la relación de ST2 del estudio VET, los resultados se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23 -- Porcentaje de mortalidad en sujetos con insuficiencia renal crónica**

<b>Relación ST2</b>		
	<b>≥ 0,85</b>	<b>&lt; 0,85</b>
<b>N</b>	35	79
<b>Mortalidad</b>	8	3
<b>% Mortalidad</b>	22,9%	3,8%

El VPN para esta medición es del 96,2%.

Otras realizaciones

5 Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito en relación con la descripción detallada de la misma, la anterior descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para evaluar el riesgo de muerte dentro del año para un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
  - obtener un primer nivel de ST2 en una primera muestra de ensayo de un sujeto;
  - 5 obtener un segundo nivel de ST2 en una segunda muestra de ensayo de un sujeto en un segundo punto de tiempo; y
  - comparar el primer y el segundo nivel de ST2, en el que una diferencia entre el primero y el segundo niveles de ST2 indica el riesgo de muerte del sujeto en un plazo de un año.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se ha administrado un tratamiento al sujeto después de obtener el primer nivel y antes de obtener el segundo nivel.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que un segundo nivel que es inferior al primer nivel indica que el tratamiento es eficaz.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una disminución desde el primer al segundo nivel indica que el riesgo de muerte del sujeto ha disminuido.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una disminución significativa, ausencia de cambios o un incremento desde el primero al segundo nivel indica que el riesgo de muerte del sujeto ha aumentado.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende determinar al menos un primero, un segundo y un tercer nivel de ST2 en una muestra del sujeto y comparar los niveles.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto presenta uno o más síntomas no específicos.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho uno o más síntomas no específicos se seleccionan entre el grupo que consiste en dolor o malestar torácico, falta de aliento, náuseas, vómitos, eructos, sudoración, palpitaciones, mareo, fatiga y desvanecimiento.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las muestras de ensayo son muestras de suero, sangre, plasma, orina o tejido corporal.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto no tiene un trastorno cardiovascular.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene un trastorno pulmonar o un trastorno hepático.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene un IMC de 25-29, un IMC  $\geq$  30 o insuficiencia renal.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que pasan al menos dos días entre la obtención de la primera y de la segunda muestras de ensayo.
14. Un procedimiento *in vitro* para evaluar el riesgo de muerte en un año para un sujeto que presenta uno o más síntomas no específicos, comprendiendo el procedimiento
  - determinar el nivel de ST2 en una primera muestra del sujeto y un nivel de BUN en la primera muestra;
  - determinar el nivel de ST2 en una segunda muestra del sujeto;
  - comparar los niveles de ST2 en la primera y la segunda muestra, para determinar una relación de ST2;
  - 35 comparar el nivel de BUN en la primera muestra con un nivel de referencia preseleccionado; y
  - comparar la relación de ST2 con una relación de referencia;
  - en el que la relación de referencia de ST2 en la primera y la segunda muestra y el nivel de BUN en la primera muestra, en comparación con la relación de referencia y un nivel, indica el riesgo de muerte del sujeto.



15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que riesgo de muerte del sujeto en un año se determina de acuerdo con la siguiente tabla:

	<b>Relación ST2 &lt; 0,85</b>	<b>Relación ST2 ≥ 0,85</b>
<b>BUN &lt; 40 mg/dl</b>	Riesgo Mínimo	Riesgo Medio
<b>BUN ≥ 40 mg/dl</b>	Riesgo Medio	Riesgo Máximo

FIGURA 1

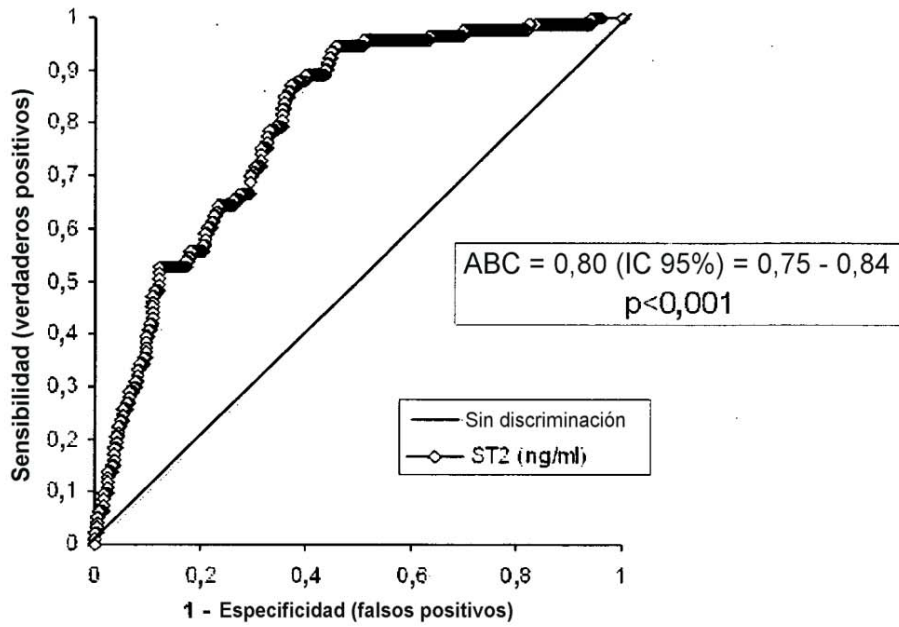
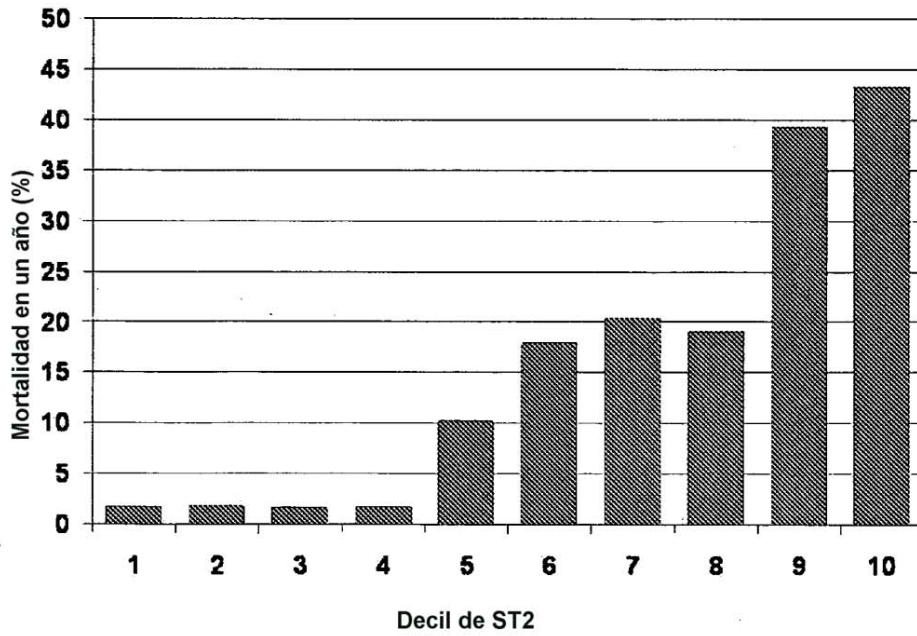
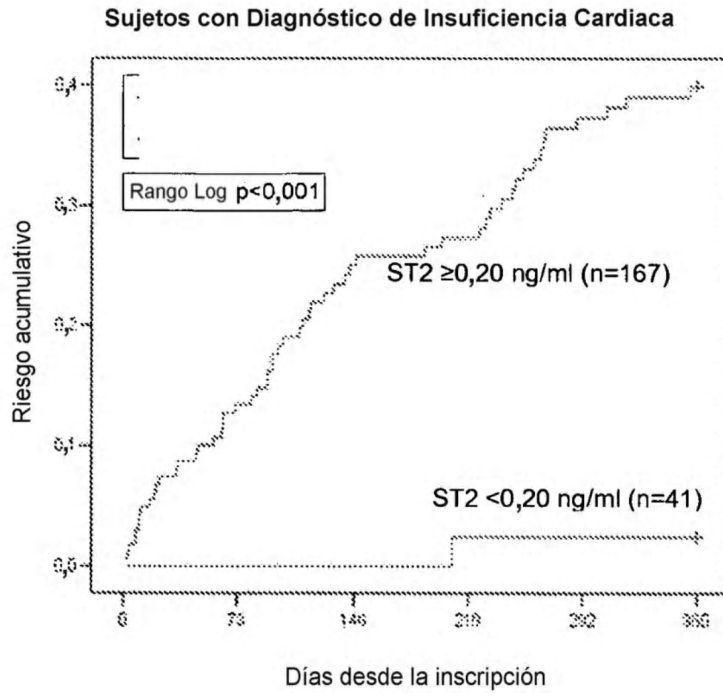


FIGURA 2



**FIGURA 3A**



**FIGURA 3B**

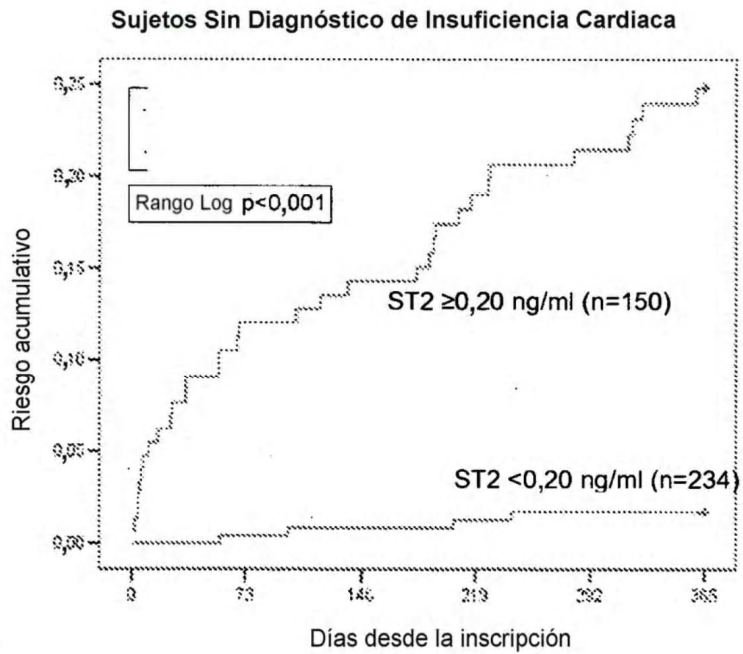


FIGURA 4

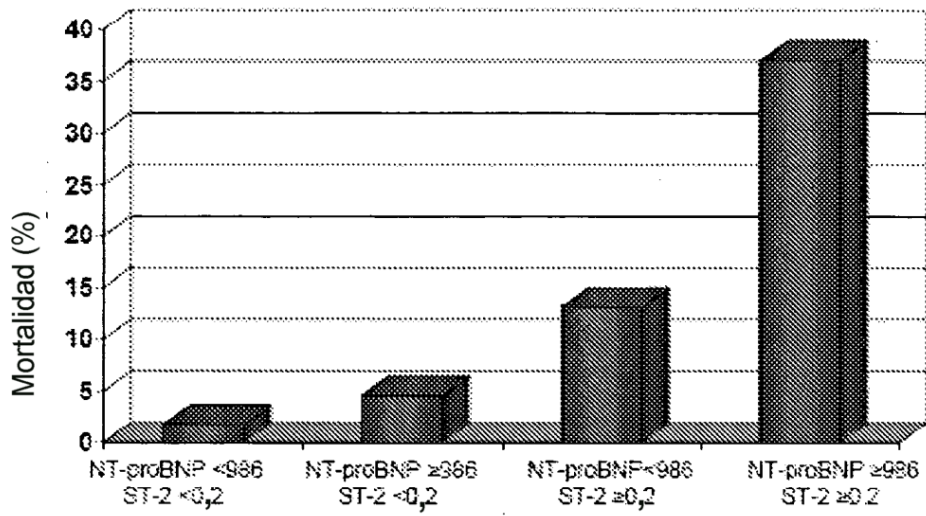


FIGURA 5

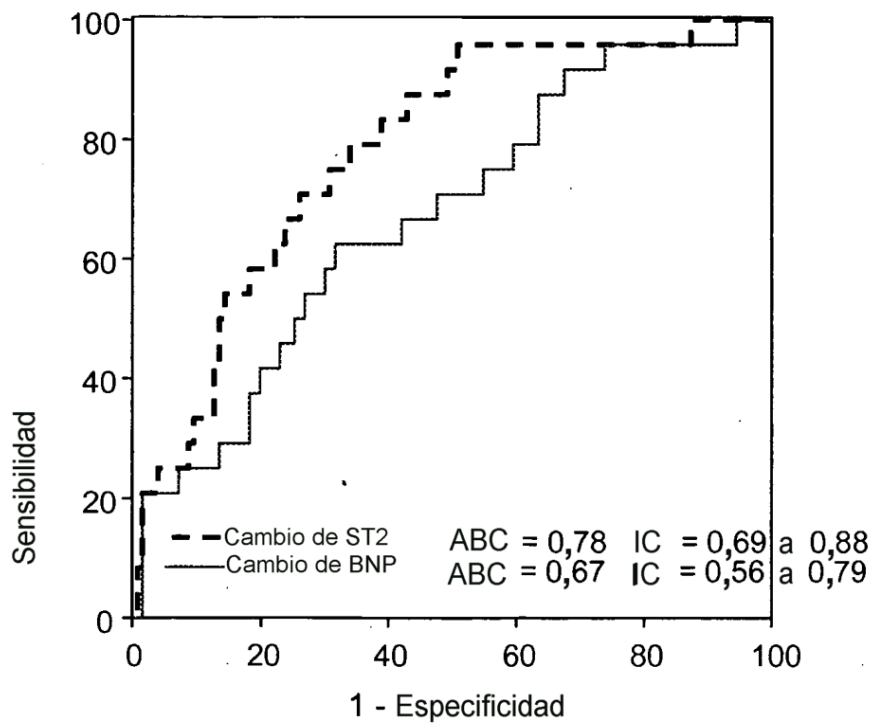
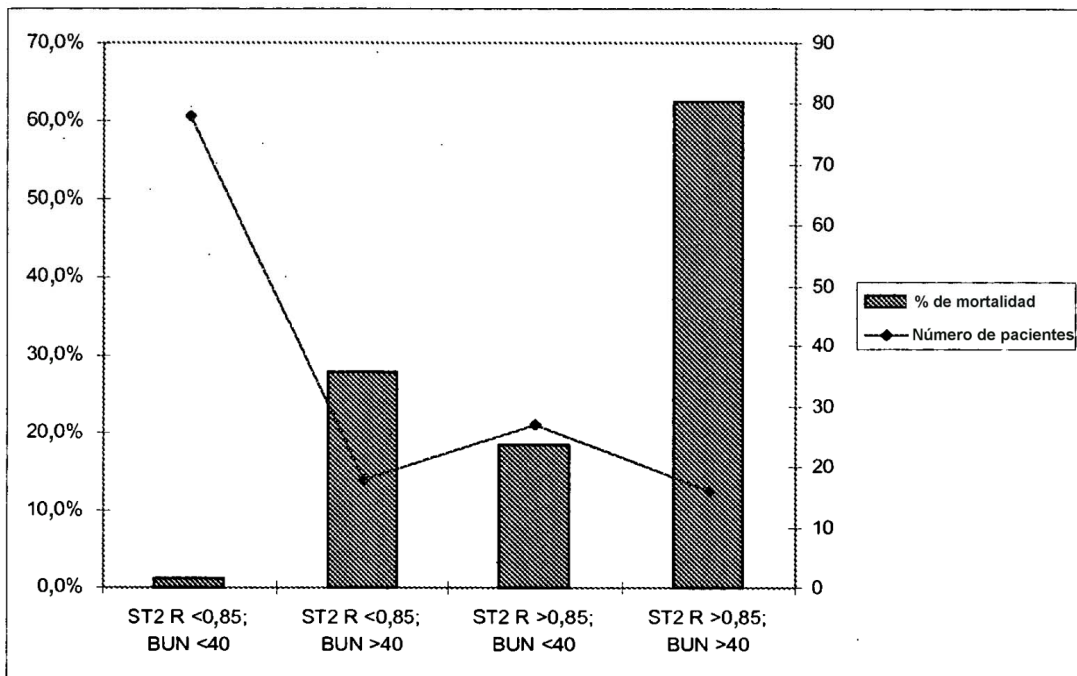
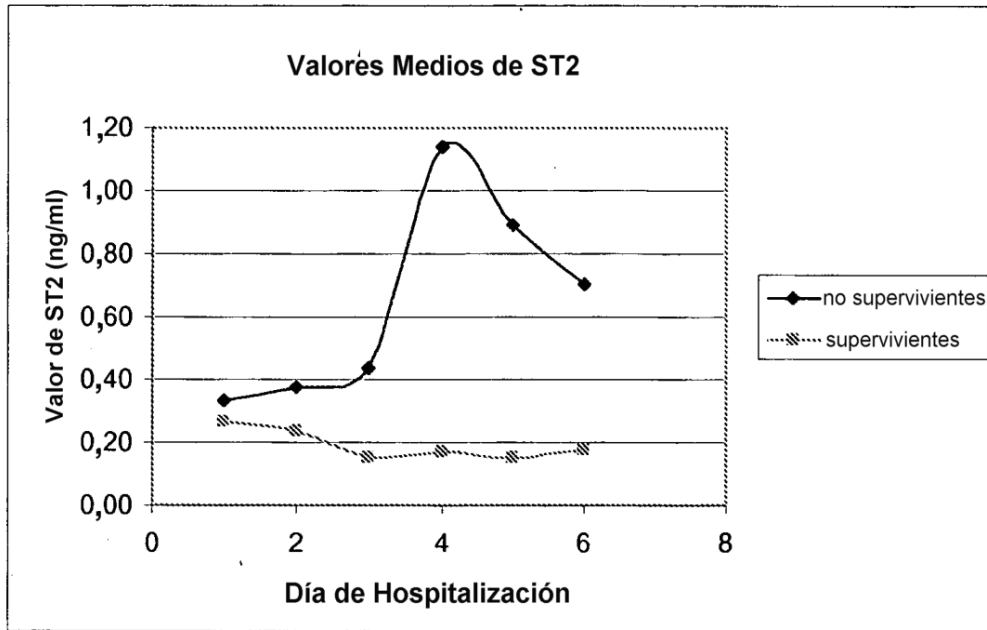


FIGURA 6



**FIGURA 7A**



**FIGURA 7B**

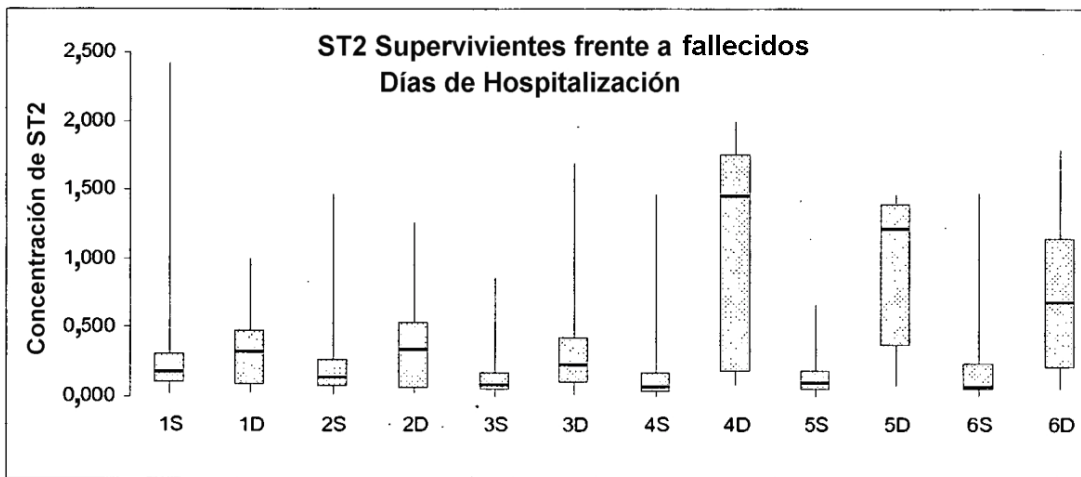


FIGURA 7C

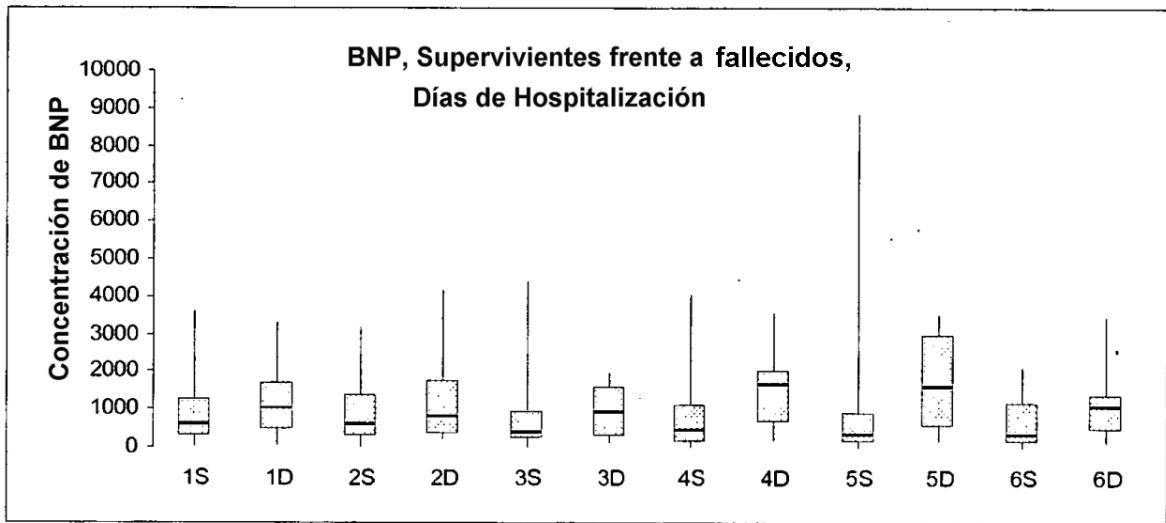


FIGURA 7D

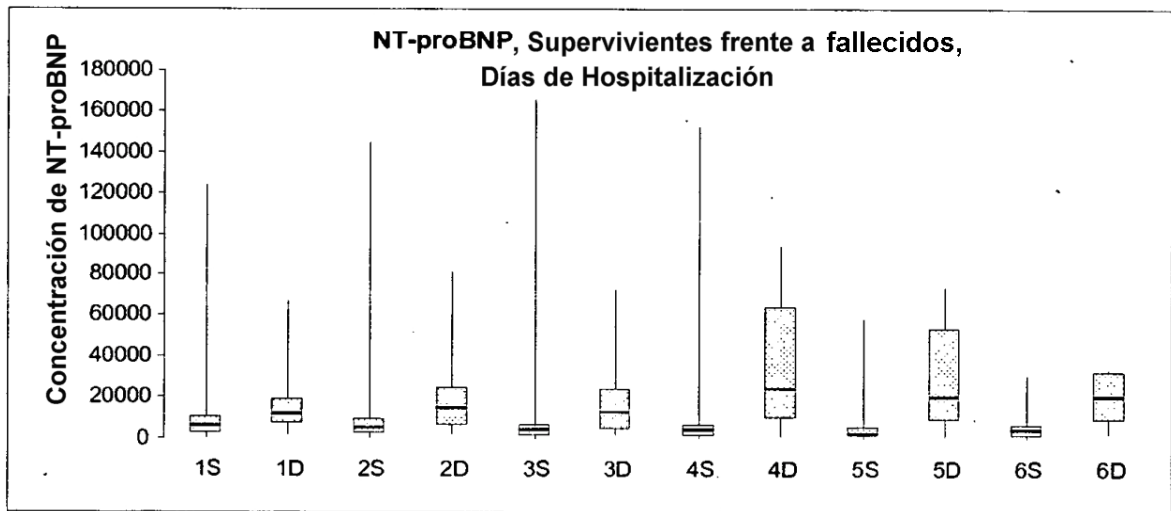


FIGURA 8

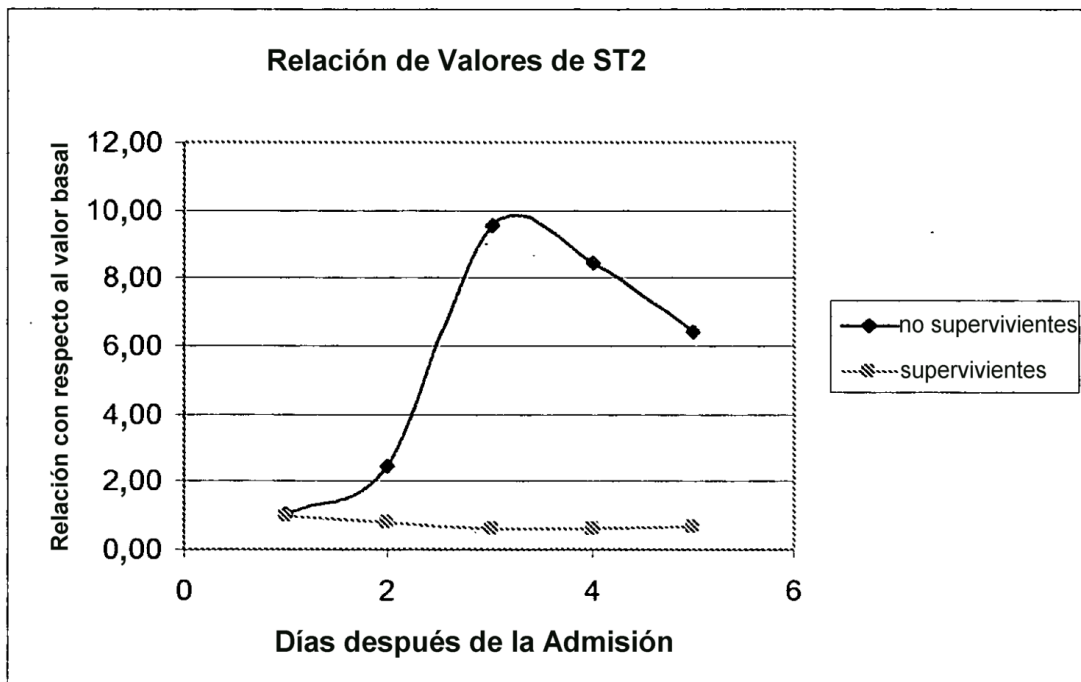
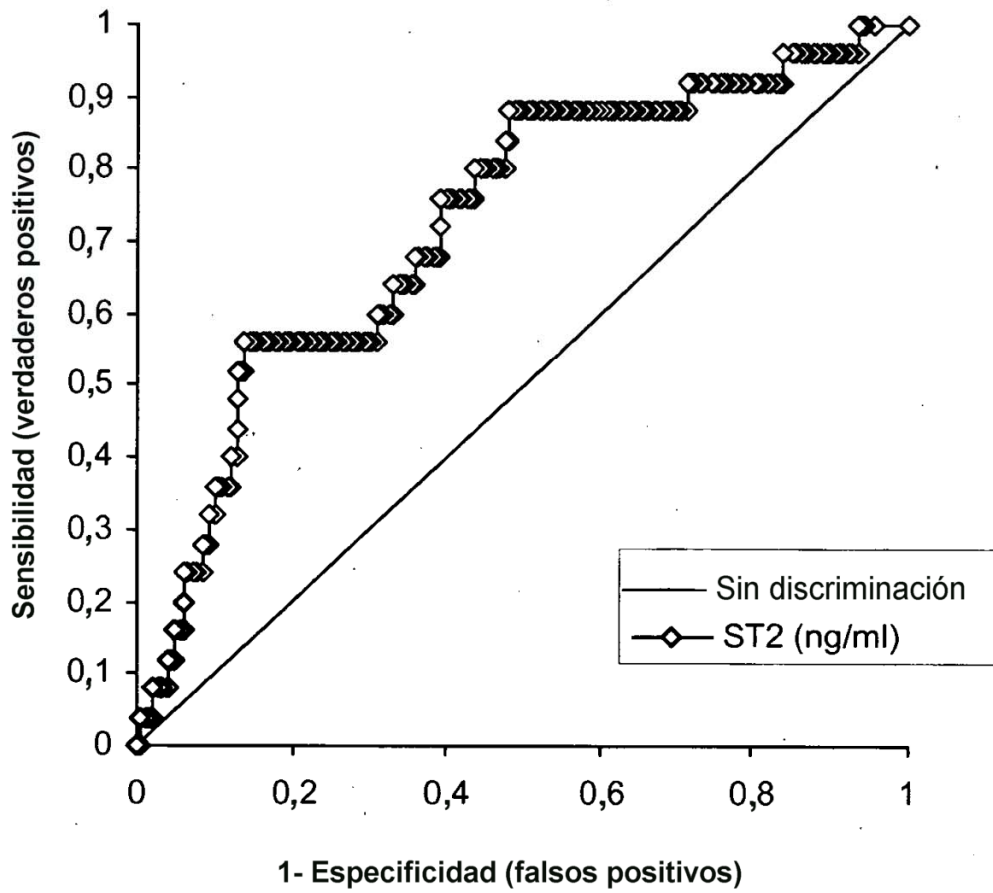




FIGURA 9



**FIGURA 10**

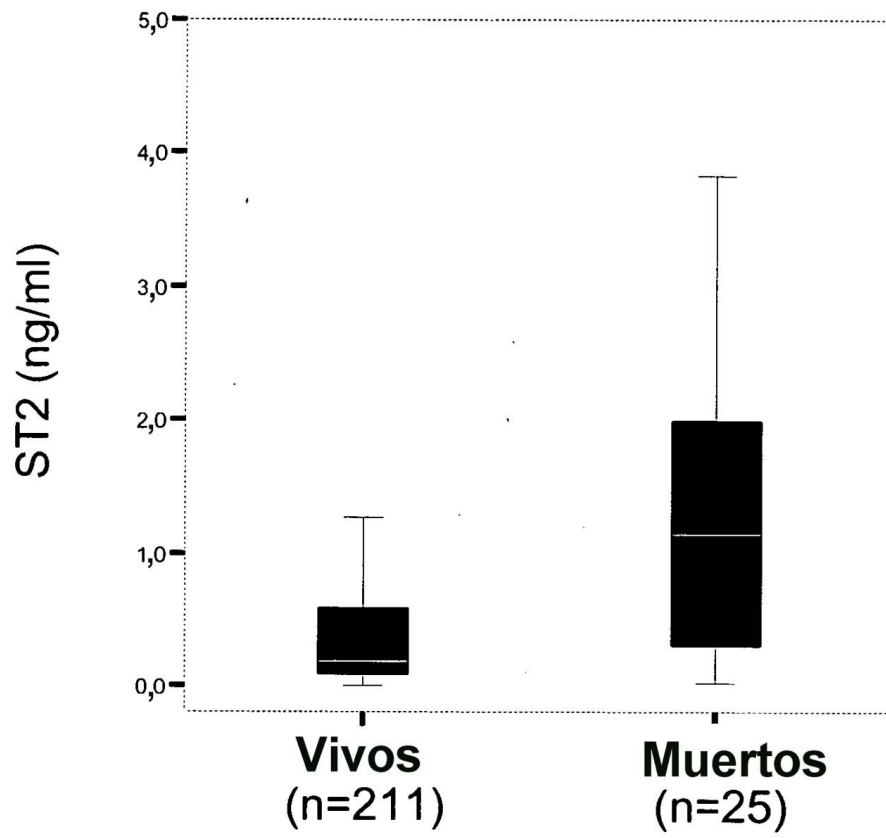


FIGURA 11

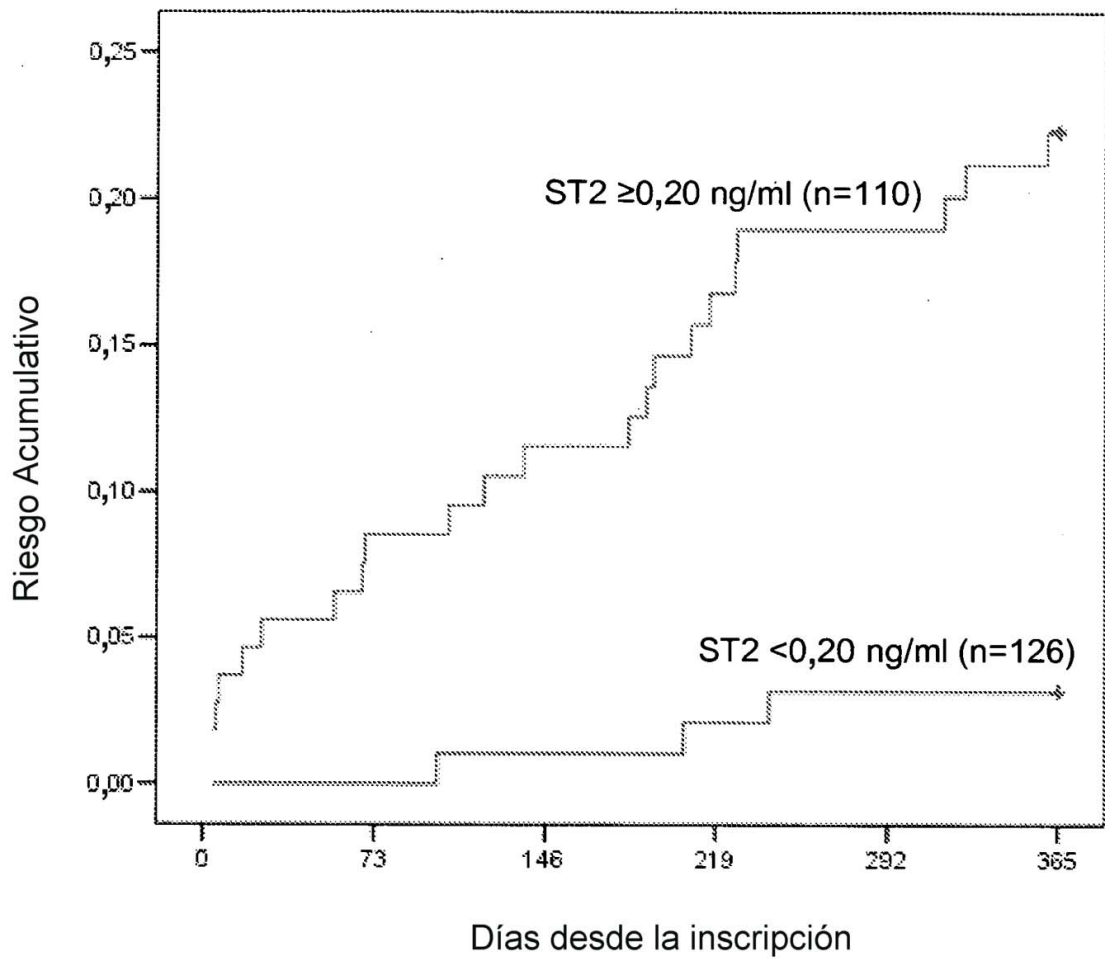


FIGURA 12A

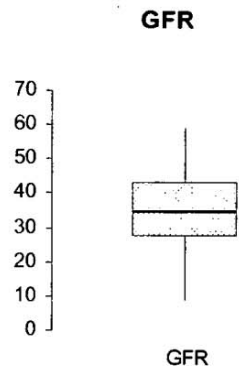


FIGURA 12B

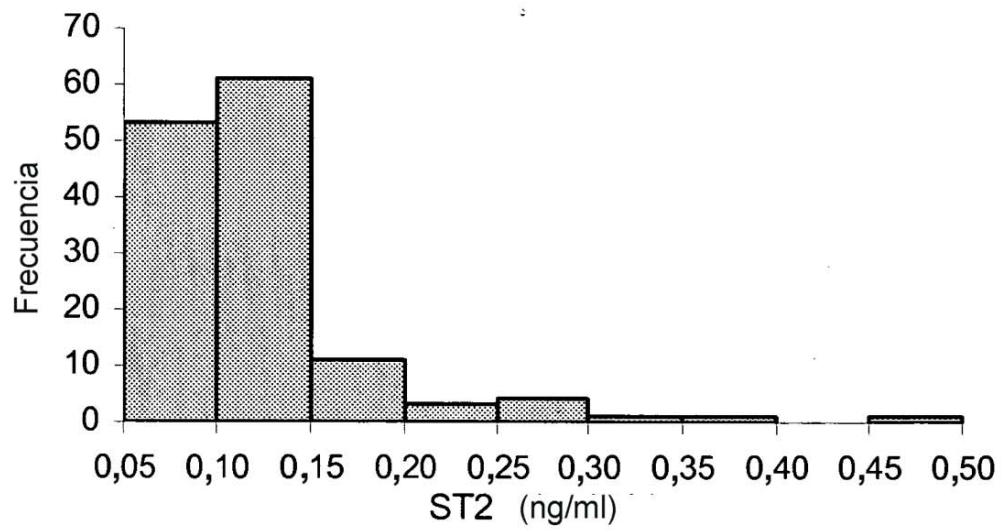
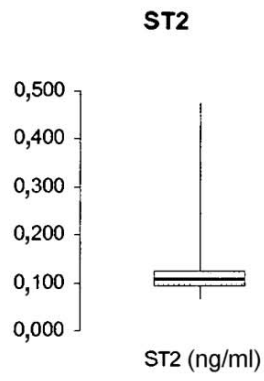


FIGURA 13