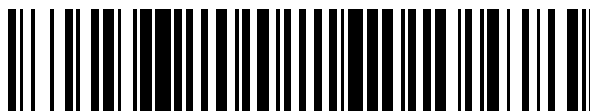


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 029**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 13179055 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2660599**

54 Título: **Predicción del riesgo de sufrir episodios cardíacos adversos graves**

30 Prioridad:

**18.04.2008 US 46158 P**

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

**16.12.2014**

73 Titular/es:

**CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)  
802 6th Avenue, Suite 63  
New York, NY 10001, US**

72 Inventor/es:

**SNIDER, JAMES V. y  
HEYMAN, EUGENE R.**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 525 029 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 del riesgo de sufrir episodios cardíacos adversos graves

**REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD**

5 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense nº de serie 61/046,158, presentada el 18 de abril del 2008.

**CAMPO TÉCNICO**

10 [0002] La invención hace referencia a métodos para predecir el riesgo de sufrir episodios cardíacos adversos graves y para detectar la presencia de enfermedades graves basadas en niveles de circulación de ST2 y en péptidos natriuréticos (NP por sus siglas en inglés), p. ej., NT-proBNP, sólo o en combinación con otros marcadores biológicos.

**ANTECEDENTES**

15 [0003] La evaluación clínica para determinar la gravedad de la enfermedad y el riesgo de sufrir episodios cardíacos adversos graves (MACE por sus siglas en inglés), p. ej., la mortalidad causada por un fallo cardíaco, puede no ser siempre evidente. La decisión sobre si tratar a un sujeto de manera agresiva o conservadora, o de ingresar al sujeto como paciente hospitalizado o dejarlo ir a casa, en ocasiones puede tomarse únicamente basándose en la evaluación clínica del médico o en su "presentimiento" en cuanto al estado actual del paciente. Una fórmula para determinar la probabilidad de que un sujeto sufra un resultado adverso, p. ej., mortalidad, trasplante, y/o reingreso, mejoraría notablemente la capacidad del médico para tomar decisiones informadas sobre el tratamiento, mejoraría la atención al paciente y reduciría los costes totales de la sanidad.

20 [0004] US2007/0248981 describe la medición al circular concentraciones de ST2 y su uso para predecir un resultado clínico dentro de un periodo de tiempo específico o para detectar la presencia de una enfermedad grave. Los autores también sugieren que se utilicen niveles de biomarcadores adicionales junto con niveles de ST2, incluyendo el uso de NT-pro-BNP.

**SUMARIO**

25 [0005] La presente invención se basa, al menos en parte, en el uso de cambios en los niveles de suero del marcador biológico ST2 (gen 2 expresado por estimulación del crecimiento, también conocido como receptor de interleucina I tipo I (IL1RL-1)), junto con los niveles de un péptido natriurético (NP) como el fragmento N-terminal inactivo de un péptido natriurético de tipo cerebral (NT-pro-BNP), para predecir la probabilidad de sufrir un episodio cardíaco adverso grave (MACE), p. ej., la recurrencia del episodio cardíaco inicial (p. ej., un segundo IAM); angina; descompensación de insuficiencia cardíaca; hospitalización por una enfermedad cardiovascular; mortalidad causada por una enfermedad cardiovascular; o un trasplante, dentro de un periodo de tiempo específico, p. ej., 30 días, 3 o 6 meses, o un año o más, o para detectar la presencia de una enfermedad grave (p. ej., una enfermedad grave que pueda requerir un trasplante u otro tratamiento agresivo). Estos métodos pueden utilizarse para predecir el resultado clínico, p. ej., en pacientes hospitalizados después de un episodio cardíaco agudo.

30

35

40 [0006] En algunos modos de realización, los métodos descritos en el presente documento incluyen la supervisión de cambios en los niveles de ST2 a lo largo del tiempo (p. ej., una relación ST2) y determinar un nivel NP, con el fin de proporcionar una evaluación de diagnóstico y pronóstico de pacientes, p. ej., pacientes con síntomas no específicos, p. ej., pacientes con disnea aguda y aquellos con dolor de pecho, o pacientes que han sido diagnosticados por una insuficiencia cardíaca. Los NP incluyen las formas de péptidos natriuréticos cerebrales, es decir, NT-proBNP, proBNP y BNP, y los péptidos natriuréticos atriales, es decir, NT-proANP, proANP and ANP. En modos de realización preferidos, el péptido natriurético es NT-proBNP.

45 [0007] En algunos modos de realización, la invención describe métodos para evaluar el riesgo de sufrir un MACE dentro de un periodo de tiempo específico, p. ej., 30, 60, 90 o 180 días (p. ej., uno, dos, tres o seis meses), o uno, dos o cinco años, para un sujeto. Los métodos pueden incluir la determinación de las relaciones ST2 y un nivel de NP, p. ej., NT-proBNP, y utilizar esos niveles y relaciones para determinar el riesgo de sufrir un MACE, según se describe en el presente documento. Determinar la relación ST2 puede incluir la obtención de al menos dos muestras, p. ej., muestras de sangre, suero, plasma, orina, o tejido corporal del sujeto (ambas muestras son del mismo fluido o tejido, tomadas en dos momentos diferentes); la determinación de los niveles de ST2 en las muestras; y la división de los niveles en biomarcadores de ST2 en las muestras anteriores en niveles de ST2 en la muestra posterior, alcanzando así la relación de ST2. Dicha relación proporciona una indicación de cómo cambian los niveles de ST2 en el sujeto a lo largo del tiempo. Así, en algunos modos de realización, los métodos

50

incluyen la determinación u obtención de un primer nivel ST2, p. ej., un punto de referencia en una muestra tomada, p. ej., al ingresar o al comenzar el tratamiento, y un segundo nivel ST2, p. ej., en una muestra tomada un tiempo después, p. ej., uno, dos, tres, cuatro o más días más tarde. Además, los métodos incluirán generalmente determinación u obtención de un nivel NP, p. ej., un nivel NT-proBNP al menos en el segundo momento, p. ej., en una muestra de sangre, suero, plasma, orina o tejido corporal del sujeto.

**[0008]** En un aspecto, la invención proporciona métodos, p. ej., métodos implementados por ordenador, para evaluar el riesgo de un sujeto de sufrir un episodio cardíaco adverso grave (MACE) en el periodo de un año. Los métodos incluyen la determinación de la puntuación de riesgo de MACE (MACERS) para un sujeto basándose en, al menos en parte, la relación de un segundo nivel de gen 2 expresado por estimulación del crecimiento (ST2) en el sujeto en un segundo momento (ST2 T0) hasta un primer nivel de ST2 en el sujeto en un primer momento (ST2 T1), junto con un logaritmo ponderado de un nivel de péptido natriurético (NP) en el sujeto en el segundo momento (NP T1), y la comparación de la puntuación de riesgo de MACE (MACERS) con una MACERS de referencia, en la que la MACERS en comparación con la MACERS de referencia indica el riesgo del sujeto de sufrir un MACE en el periodo de un año.

**[0009]** En algunos modos de realización, los métodos descritos en el presente documento incluyen el uso de la siguiente fórmula para determinar el riesgo de MACE de un sujeto:

$$X = (ST2\ T1/ST2\ T0) + \alpha \ln(NP\ T1)$$

**[0010]** En modos de realización preferidos, las relaciones ST2 y los niveles NT-proBNP, se utilizan para determinar la puntuación de riesgo de MACE utilizando la siguiente fórmula:

$$X = (ST2\ T1/ST2\ T0) + \alpha \ln(NTproBNP\ T1)$$

**[0011]** En algunos modos de realización, el coeficiente alfa es 0,33.

**[0012]** En algunos modos de realización, la puntuación de riesgo de MACE se compara con una puntuación de riesgo de MACE de referencia (p. ej., un valor límite). Una comparación entre la puntuación de riesgo de MACE de un sujeto y la puntuación de referencia indica el riesgo del sujeto de sufrir un MACE en un periodo de tiempo específico. En algunos modos de realización, el periodo de tiempo específico es un año.

**[0013]** En algunos modos de realización, la puntuación de riesgo de MACE de referencia representa la puntuación en un sujeto o en un grupo de sujetos con un riesgo muy bajo de morir en un año. En algunos modos de realización, una puntuación de riesgo de MACE de un sujeto que sea mayor o igual a la puntuación de riesgo de MACE de referencia indica que el sujeto presenta un riesgo alto, es decir, estadística y considerablemente alto, de morir en un año. En algunos modos de realización, el alto riesgo de muerte es al menos un 20 % mayor, p. ej., un 30 %, 40 %, o 50 % mayor.

**[0014]** En algunos modos de realización, los métodos incluyen la determinación de la puntuación de riesgo de MACE, y opcionalmente la elección o modificación de un tratamiento para el sujeto, basado en la puntuación de riesgo de MACE. Por ejemplo, si la puntuación de riesgo de MACE es superior a la referencia seleccionada, entonces el sujeto tiene un riesgo alto y debería tratarse de manera más agresiva, si el sujeto ya está siendo tratado, entonces el sujeto no está respondiendo de forma favorable al tratamiento actual y debería elegirse un nuevo tratamiento, es decir, un tratamiento alternativo al que el paciente puede responder de forma más favorable.

**[0015]** En algunos modos de realización, el sujeto muestra uno o más síntomas no específicos, p. ej., dolor o molestias en el pecho, dificultad al respirar (disnea), náuseas, vómitos, eructos, sudores, palpitaciones, mareos, fatiga y desmayos. En algunos modos de realización, el síntoma es disnea o dolor de pecho.

**[0016]** En algunos modos de realización, el sujeto no presenta un trastorno cardiovascular. En varios modos de realización, el sujeto presenta un trastorno pulmonar, p. ej., una infección aguda (p. ej., neumonía), una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y un embolismo pulmonar.

**[0017]** En determinados modos de realización, el sujeto presenta un trastorno hepático, p. ej., un trastorno hepático asociado a la quimioterapia, la toxicidad por alcohol o toxicidad farmacológica según se determine mediante las pruebas de laboratorio de función hepática convencionales.

**[0018]** En algunos modos de realización, los métodos también incluyen la determinación del nivel de un marcador biológico complementario (no ST2, no IL-33, no NT-proBNP), p. ej., Troponina, PCR, dímeros D, BUN, albúmina, enzimas de función hepática, medidas de función renal, p. ej., creatinina, índice de depuración de creatinina o índice de filtrado glomerular, y/o endotoxina bacteriana, en la muestra; y la comparación del nivel del biomarcador complementario en la muestra con un nivel de referencia del biomarcador complementario. El nivel

del biomarcador complementario en la muestra en comparación con la referencia, junto con la puntuación de riesgo de MACE en la muestra comparada con una puntuación de referencia de riesgo de MACE, indica si el sujeto tiene un riesgo elevado de morir en un periodo de tiempo específico, y/o presenta una enfermedad grave presente. En algunos modos de realización, los métodos incluyen la determinación de un cambio en los niveles a lo largo del tiempo (p. ej., una relación) para el biomarcador complementario, mediante la comparación de un primer nivel, p. ej., un nivel de punto de referencia, con un segundo nivel, p. ej., un nivel tomado un tiempo después, p. ej., uno, dos, tres, cuatro o más días más tarde.

**[0019]** En algunos modos de realización, el sujeto presenta un IMC de 25-29, un IMC  $\geq$  30 o una insuficiencia renal, p. ej., el sujeto se selecciona partiendo de la base de que presenta un IMC de 25-29, un IMC  $\geq$  30 o una insuficiencia renal.

**[0020]** En otro aspecto, la invención incluye métodos para evaluar la afección del sujeto a lo largo del tiempo, p. ej., para evaluar la eficacia de un tratamiento en un sujeto. Los métodos incluyen la determinación de una primera puntuación de riesgo de MACE en un sujeto, basada en la relación de un primer nivel base de ST2 y un segundo nivel de ST2 tomado en un segundo momento, y un primer nivel de un NP, p. ej., NT-proBNP, tomado en el segundo momento, con el fin de determinar una primera puntuación de riesgo de MACE; y la determinación de una segunda puntuación de riesgo de MACE basada en la relación del primer nivel base de ST2 y un tercer nivel ST2 tomado en un tercer momento, y un nivel de un NP, p. ej., NT-proBNP, tomado en un tercer momento, donde el tercer momento es un tiempo después del segundo momento, p. ej., días, semanas, meses o años después. Una comparación entre la primera y la segunda puntuación de riesgo de MACE indica si el estado del sujeto empeora, mejora o se mantiene, p. ej., indica la eficacia del tratamiento en el sujeto. Por ejemplo, una segunda puntuación de riesgo de MACE que sea inferior a la primera puntuación de riesgo de MACE indica que el tratamiento es eficaz.

**[0021]** En el presente documento, una "muestra" incluye cualquier fluido o tejido corporal, p. ej., uno o más de entre sangre, suero, plasma, orina, y tejido corporal. En determinados modos de realización, una muestra es un suero, plasma o muestra de sangre.

**[0022]** Un anticuerpo que "combina específicamente con" un antígeno, combina preferentemente con el antígeno en una muestra que contiene otras proteínas.

**[0023]** Los métodos y kits descritos en el presente documento proporcionan numerosas ventajas. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para determinar si se debería ingresar a un paciente o mantenerlo hospitalizado para una mayor evaluación, aunque se haya realizado un diagnóstico definitivo. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para una estratificación del riesgo de un sujeto determinado, p. ej., para tomar decisiones respecto al nivel de agresividad del tratamiento que es apropiado para el sujeto, basándose en su puntuación de riesgo de MACE según se determina mediante un método descrito en el presente documento. Mejores decisiones de tratamiento pueden llevar a una morbilidad y mortalidad reducidas y a una mejor distribución de los escasos recursos sanitarios. Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para realizar valoraciones generales sobre si un paciente debería someterse a más pruebas para determinar un diagnóstico específico. Los métodos descritos en el presente documento también pueden utilizarse para la estratificación de riesgo de la población de pacientes, p. ej., para proporcionar información sobre la acción clínica o la respuesta esperada a una intervención terapéutica. Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse independientemente de la causa subyacente o del diagnóstico final, por lo que no se limitan a indicaciones específicas.

**[0024]** Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que suele entender alguien experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Los métodos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretende servir como limitación.

**[0025]** Además, se hace referencia en el presente documento a todo el contenido de la solicitud de Patente estadounidense nº 11/789.169 y a las solicitudes de patente internacional nº PCT/US2007/067626, PCT/US2007/067914 y PCT/US2007/068024

**[0026]** En caso de conflicto, dominará la presente memoria, incluyendo las definiciones. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las Figuras, y de las reivindicaciones.

**DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS****[0027]**

- La Figura 1 es un gráfico lineal del análisis de puntuación de la curva Característica Operativa del Receptor (ROC) del algoritmo que combina la relación ST2 y el valor de NT-proBNP de la segunda semana.
- 5 La Figura 2 es un gráfico lineal de sensibilidad, especialidad y riesgo relativo trazado como una función de la puntuación.
- La Figura 3 es una curva ROC para una puntuación de riesgo de MACE y episodios en 1 año.
- La Figura 4A es un diagrama de caja y bigotes de la puntuación de riesgo de MACE y una relación ST2 para los episodios cardíacos en un año.
- 10 La Figura 4B es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier en episodios utilizando una puntuación de riesgo de MACE con un límite de 3,2.
- La Figura 5 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier en episodios utilizando la relación ST2.
- La Figura 6 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier en episodios utilizando una relación de NT-proBNP con un límite de 0,75.
- 15 La Figura 7 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de muerte o trasplante en un año utilizando una relación de ST2 con un límite de 0,85.
- La Figura 8 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de muerte o trasplante en un año utilizando una relación NT-proBNP con un límite de 0,70.
- 20 La Figura 9 es una curva ROC para una puntuación y muerte o trasplante en 1 año. Pese a que el análisis ROC identifica 3,5 como el límite óptimo, un análisis adicional confirma que el límite de 3,2 identificado anteriormente proporciona una mejor precisión del pronóstico.
- La Figura 10 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de muerte o trasplante en un año utilizando una puntuación de riesgo de MACE con un límite de 3,2.
- 25 La Figura 11 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la puntuación de riesgo de MACE de sufrir episodios o no (muerte o trasplante).
- La Figura 12 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación ST2 de sufrir episodios o no (muerte o trasplante).
- La Figura 13 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación NT-proBNP de sufrir episodios o no (muerte o trasplante).
- 30 La Figura 14 es un diagrama de bigotes y puntos que muestra valores ST2 por día.
- La Figura 15 es un diagrama de bigotes y puntos que muestra valores NT-proBNP por día.
- La Figura 16 es un diagrama de bigotes y punto que muestra valores BNP por día.
- La Figura 17 es un gráfico lineal que muestra los resultados del análisis ROC de los valores relación de mortalidad en 90 días.
- 35 La Figura 18 es un gráfico lineal que muestra la ROC de la fórmula del riesgo de MACE de sufrir mortalidad en 90 días.
- La Figura 19 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la puntuación de la fórmula del riesgo de MACE de mortalidad en 90 días.
- La Figura 20 es un diagrama de caja y bigotes que muestra ST2 R L:F de mortalidad en 90 días.

**40 DESCRIPCIÓN DETALLADA**

- [0028]** La evaluación clínica de los pacientes, en particular pacientes con síntomas no específicos como la disnea o el dolor de pecho, supone a menudo un desafío. Los resultados descritos en el presente documento proporcionan pruebas de que las puntuaciones de riesgo de MACE basadas en ST2 y NT-proBNP son útiles en la evaluación del pronóstico de los pacientes, sin contar con la causa subyacente de su enfermedad.
- 45 La puntuación de riesgo de MACE es un potente indicador de enfermedad grave o muerte inminente, según se demuestra en el presente documento en diferentes poblaciones.

**Predicción de MACE**

- [0029]** Las concentraciones elevadas de ST2 son pronóstico evidente de muerte en un año, con una divergencia dramática en las curvas de supervivencia para aquellos con un ST2 elevado poco después de su presentación, independientemente del diagnóstico subyacente. Como ejemplo, existe una relación dramática entre las elevaciones del ST2 y el riesgo de mortalidad en un año después de la presentación con disnea. La relación entre ST2 y la muerte en pacientes con disnea era independiente de los diagnósticos, y reemplazaba el resto de biomarcadores indicadores de mortalidad en este nivel, incluyendo otros marcadores de inflamación, mionecrosis, disfunción renal, y más concretamente NT-proBNP, un marcador recientemente descrito por tener un valor para predecir la muerte en esta población (Januzzi *et al.*, *Arch. Intern. Med.* 166(3):315-20 (2006)). De hecho, la mayoría de la mortalidad en el estudio se concentraba entre sujetos con niveles ST2 elevados al presentarse; sin embargo, la combinación de ST2 y NT-proBNP elevados se asociaba con los altos índices de muerte en un año.
- 55

[0030] Dicho enfoque del multimarcador para la estratificación del riesgo se ha propuesto generalmente para pacientes con síndromes coronarios agudos (Sabatine *et al.*, *Circulation*105(15):1760-3 (2002)), pero ninguna estrategia como tal ha sido propuesta aún para la evaluación del paciente con síntomas no específicos como disnea indiferenciada o queja general de dolor de pecho.

## 5 Determinación de la gravedad de la enfermedad

[0031] Las puntuaciones elevadas de riesgo de MACE se corresponden con la presencia de enfermedades graves en un sujeto, independientemente de la causa subyacente de la enfermedad. Como ejemplo, en una población de pacientes que presenta dolor de pecho, las puntuaciones más altas se asociaron con un riesgo aumentado de episodios adversos, incluyendo el trasplante, que generalmente se asocian con la presencia de una enfermedad grave.

[0032] Por lo tanto, para sujetos sin diagnosticar, los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para determinar cómo debería ser de agresiva la búsqueda de un diagnóstico; un alto nivel ST2 indicaría la presencia de una enfermedad grave, y sugiere que el sujeto debería tratarse como un caso de alto riesgo. Para sujetos con un diagnóstico conocido, los métodos aquí descritos pueden utilizarse para ayudar a determinar la gravedad de la patología subyacente; de nuevo, un nivel ST2 más alto se asocia con una enfermedad más grave.

### Metodología general - Determinar la puntuación del riesgo de MACE de un sujeto

[0033] En general, los métodos descritos en el presente documento incluyen evaluar los niveles de circulación (p. ej., niveles en sangre, suero, plasma, orina o tejido corporal) de ST2 y NT-proBNP en un sujeto, p. ej., un mamífero, p. ej., un ser humano. Estos niveles proporcionan información en cuanto a la probabilidad de que el sujeto experimente un resultado adverso, p. ej., mortalidad, p. ej., en un periodo de tiempo específico, p. ej., 30 días, 60 días, 90 días, 6 meses, un año, dos años, tres años o cinco años. Estos niveles también proporcionan información en cuanto a la gravedad de la enfermedad en el sujeto. En algunos modos de realización, un nivel de ST2 se determina una primera vez (T0), p. ej., en la presentación, p. ej., 2, 4, 6, 8, 12, 18 y/o 24 horas, y/o 1-3 o 1-7 días, después de la aparición de los síntomas. A continuación, se determinan los niveles ST2 y NT-proBNP una segunda vez (T1); el segundo momento puede ser, p. ej., al menos 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 o 24 horas, 1-7 días, 1-14 días o 2-14 días, p. ej., hasta 14 días, después del primer momento. Estos niveles se utilizan para determinar la puntuación de riesgo de MACE utilizando la siguiente fórmula:

$$X = (ST2 T1/ST2 T0) + \ln(NTproBNP T1)$$

[0034] El coeficiente alfa es un factor de ponderación para la variable sobre la que actúa. En algunos modos de realización, el coeficiente alfa se encuentra entre 0,25 y 0,5, p. ej., aproximadamente 3, p. ej., 0,33.

[0035] La evaluación de los niveles de circulación del ST2 y NTpro-BNP en un sujeto típicamente incluye obtener una muestra biológica, p. ej., suero, plasma o sangre, del sujeto. Los niveles de ST2 y NTpro-BNP en la muestra pueden determinarse midiendo los niveles de polipéptido en la muestra, utilizando métodos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, p. ej., inmunoensayos como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA por sus siglas en inglés). Por ejemplo, en algunos modos de realización un anticuerpo monoclonal se pone en contacto con la muestra; a continuación se detecta una unión del anticuerpo y opcionalmente se cuantifica, y los niveles de la proteína se determinan basándose en niveles de unión de anticuerpo. De manera alternativa, los niveles de ARNm ST2 y NTpro-BNP pueden medirse, de nuevo utilizando los métodos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, p. ej., por una PCR cuantitativa o una transferencia Northern.

[0036] En algunos modos de realización, la puntuación de riesgo de MACE se calcula utilizando un dispositivo informático, p. ej., un ordenador portátil.

[0037] Una vez que se ha determinado la puntuación de riesgo de MACE, esta puede compararse con una puntuación de referencia. En algunos modos de realización, la puntuación de referencia representará un nivel límite, por encima del cual el sujeto presenta un riesgo de muerte alto y/o presenta una enfermedad grave. La puntuación de referencia elegida puede depender de la metodología utilizada para medir los niveles de ST2. Por ejemplo, en algunos modos de realización, donde los niveles de circulación de ST2 soluble se determinan utilizando un inmunoensayo, p. ej., según se describe en el presente documento, la puntuación de referencia está entre 3, p. ej., 3,2 o 3,5, y una puntuación por encima de ese nivel de referencia indica que el sujeto presenta un alto riesgo de muerte y/o presenta una enfermedad grave.

[0038] En los casos en los que se ha determinado más de una puntuación de riesgo de MACE según se describe en el presente documento, un cambio en la puntuación indica si ha aumentado o disminuido el riesgo de muerte del sujeto. Si la puntuación aumenta significa que el sujeto presenta un riesgo creciente de muerte inminente, p.

ej., un pronóstico cada vez peor, y que el tratamiento no funciona o debería cambiarse o iniciarse. Las puntuaciones que disminuyen a lo largo del tiempo indican que ha disminuido el riesgo del sujeto de sufrir una muerte inminente, p. ej., un pronóstico cada vez más positivo, y que puede ser indicativo de la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, y debe continuarse el tratamiento, o, si la puntuación se vuelve lo suficientemente baja, posiblemente retirarse. Como ejemplo, las puntuaciones en aumento pueden indicar la necesidad de un tratamiento más agresivo o la hospitalización (p. ej., el ingreso inicial u hospitalización en una instalación para casos más agudos, p. ej., en una unidad de cuidados intensivos, o el uso de telemetría u otros métodos para monitorizar el estado cardíaco del sujeto), mientras que las puntuaciones decrecientes pueden indicar la posibilidad de un tratamiento menos agresivo, una breve hospitalización o el alta. Esta información permite al médico al cargo tomar decisiones sobre el tratamiento mucho más precisas; por ejemplo, el sujeto puede ingresar en el hospital como un paciente hospitalizado, p. ej., en una sala de cuidados críticos o intensivos.

**[0039]** Puede realizarse una prueba adicional, p. ej., para determinar el situación real del sujeto. Un tratamiento más agresivo puede administrarse ya sea antes o después de la prueba adicional. Por ejemplo, en caso de sospechar un infarto de miocardio (IM), puede someterse al sujeto a estudios de diagnóstico por imágenes más extensos y/o un cateterismo cardíaco.

**[0040]** En algunos modos de realización, los métodos incluyen el uso de métodos de diagnóstico adicionales para identificar la patología subyacente. Puede utilizarse cualquier método de diagnóstico conocido en la técnica y alguien especialista en la técnica será capaz de seleccionar los métodos de diagnóstico apropiados para los síntomas del sujeto. En algunos modos de realización, los métodos descritos en el presente documento incluyen otros métodos de diagnóstico además de la medición de otros biomarcadores, o como alternativa, p. ej., mediciones físicas de la función pulmonar o la función cardíaca según se conocen en la técnica.

**[0041]** Por ejemplo, los métodos aquí descritos incluyen la determinación de una puntuación de riesgo de MACE junto con la medición de uno o más biomarcadores adicionales que ayudan en el diagnóstico del sujeto. Como ejemplo, para un sujeto que tiene dolor de pecho o disnea, pueden medirse los biomarcadores indicadores de enfermedad cardíaca, p. ej., troponina cardíaca (cTn), p. ej., cTnI, BNP, y/o ANP; de forma alternativa o adicional, pueden medirse los biomarcadores de enfermedad pulmonar, p. ej., dímeros D para una embolia pulmonar. Así, en sujetos que presentan síntomas que incluyen IM en sus diagnósticos diferenciales, los métodos pueden incluir la medición de los niveles de, p. ej., cTnI, BNP, o proBNP además de la determinación de una puntuación de riesgo de MACE, con el fin de determinar si el sujeto sufre un IM. En sujetos que presentan los síntomas que incluyen insuficiencias cardíacas (IC) en sus diagnósticos diferenciales, los métodos pueden incluir la medición de niveles de BNP o proBNP además de la determinación de una puntuación de riesgo de MACE, con el fin de determinar si el sujeto sufre una IC. En sujetos que presentan síntomas que incluyen EPOC en sus diagnósticos diferenciales, los métodos pueden incluir la medición de la función pulmonar además de la determinación de una puntuación de riesgo de MACE, con el fin de determinar si el sujeto sufre una EPOC. Alguien experto en la técnica entenderá que existen varios métodos de diagnóstico adicionales que pueden aplicarse, dependiendo de la situación y la situación del sujeto. En algunos modos de realización, los métodos incluyen la medición de los niveles de BUN, y la presencia de BUN elevado y una puntuación alta de riesgo de MACE sitúa al paciente en la categoría de máximo riesgo.

## ST2

**[0042]** El gen ST2 es un miembro de la familia del receptor Interleucina 1, cuyo producto de proteína existe tanto en forma de transmembrana, así como receptor soluble que se detecta en suero (Kieser *et al.*, *FEBS Lett.* 372(2-3):189-93 (1995); Kumar *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270(46):27905-13 (1995); Yanagisawa *et al.*, *FEBS Lett.* 302(1):51-3 (1992); Kuroiwa *et al.*, *Hybridoma* 19(2):151-9 (2000)). Recientemente se describió que ST2 había aumentado notablemente en un modelo experimental de insuficiencia cardíaca (Weinberg *et al.*, *Circulation* 106(23):2961-6 (2002)), y los resultados preliminares sugieren que las concentraciones de ST2 pueden ser elevadas en aquellos pacientes con IC grave crónico (Weinberg *et al.*, *Circulation* 107(5):721-6 (2003)) así como en aquellos con infarto agudo de miocardio (IAM) (Shimpo *et al.*, *Circulation* 109(18):2186-90 (2004)).

**[0043]** Se cree que la forma transmembrana de ST2 juega un papel en la modulación de las respuestas de células T colaboradoras Tipo 2 (Lohning *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 95(12):6930-5 (1998); Schmitz *et al.*, *Immunity* 23(5):479-90 (2005)), y puede jugar su papel en el desarrollo de la tolerancia en estados de inflamación aguda o crónica (Brint *et al.*, *Nat. Immunol.* 5(4): 373-9 (2004)), mientras que la forma soluble de ST2 aumenta en fibroblastos estimulados por el crecimiento (Yanagisawa *et al.*, 1992, *supra*). Los datos experimentales sugieren que el gen ST2 aumenta notablemente en estados de estiramiento de miocitos (Weinberg *et al.*, 2002, *supra*) de manera análoga a la inducción del gen de BNP (Bruneau *et al.*, *Cardiovasc. Res.* 28(10): 1519-25 (1994)).

**[0044]** 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 de transmembrana que es muy similar a los receptores de Interleucina-1. El Comité de Nomenclatura HUGO denominó al homólogo humano, cuya clonación se describió en Tominaga *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1171: 215-218 (1992), receptor de interleucina-1 tipo 1 (IL1 RL1). Los dos términos se utilizan en el presente documento indistintamente.

5 [0045] La secuencia ARNm de la isoforma soluble más corta del ST2 humano puede encontrarse en el número de acceso de GenBank NM\_003856.2, y la secuencia del polipéptido está en el número de acceso de GenBank NM\_003847.2; la secuencia de ARNm para la forma más larga de ST2 humano está en el número de acceso de GenBank NM\_016232.4; la secuencia polipeptídica está en el número de acceso de GenBank NP\_057316.3. Existe información adicional disponible en las bases de datos públicas de GeneID: 9173, MIM ID nº 601203, y UniGene Núm. Hs.66. En general, en los métodos descritos en el presente documento, se mide la forma soluble del polipéptido ST2.

15 [0046] En la técnica se conocen procedimientos para detectar y medir ST2, por ejemplo, como se describe en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2003/0124624, 2004/0048286 y 2005/0130136, cuyo contenido total se incorpora al presente documento como referencia. También están disponibles en el mercado kits para medir el polipéptido ST2, por ejemplo, el kit ELISA ST2 fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA) nº 7638. Además, en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2005/0250156 se describen dispositivos para medir ST2 y otros biomarcadores.

### Péptidos natriuréticos

20 [0047] Los péptidos natriuréticos son una familia de hormonas de péptido vasoactivo que actúan como vasodilatadores arteriales y venosos equilibrados, regulando la natriuresis y la diuresis. Los niveles de circulación de estas hormonas están bajo investigación para su uso en la mejora de la evaluación de diagnóstico y pronóstico de los pacientes con enfermedades cardiovasculares. Estudios anteriores han demostrado que los niveles de circulación del NT-proBNP aumentan en pacientes con un infarto agudo de miocardio y predicen la mortalidad (Talwar *et al.* *Eur. Heart J.* 21:1514-1521 (2000); Omland *et al.*, *Am. J. Cardiol.* 76:230-235 (1995) Sabatine *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 44:1988-1995 (2004), demostraron una unión entre la gravedad de un insulto isquémico agudo y los niveles de circulación de BNP. Los métodos para medir NT-proBNP son conocidos en la técnica, véase, p. ej., Talwar *et al.*, 2000, *supra*; Omland *et al.*, 1995, *supra*; Sabatine *et al.*, 2004, *supra*; Alehagen y Dahlström, "Can NT-proBNP predict risk of cardiovascular mortality within 10 years? Results from an epidemiological study of elderly patients with symptoms of heart failure," *Int J Cardiol.* 2008 11 abril [Publicación electrónica previa a impresión]; y Kavsak *et al.*, *Clin Chem.* 54(4):747-51 (2008).

30 [0048] Se cree que, pese a que los ejemplos presentados en el presente documento se relacionan con NT-proBNP, cualquiera de los NP puede utilizarse en los métodos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, se puede medir más de un NP.

### Otros Biomarcadores

35 [0049] Los métodos descritos en el presente documento también pueden incluir la medición de niveles de otros biomarcadores además de ST2 y un NP. Los biomarcadores adecuados incluyen troponina, CRP, IL-6, dímeros D, BUN, enzimas de función hepática, albúmina, medidas de función renal, p. ej., creatinina, tasa de eliminación de creatinina o tasa de filtración glomerular y/o endotoxina bacteriana. Los métodos para medir estos biomarcadores son conocidos en la técnica, véase, p. ej., las publicaciones de patente estadounidense nºs 2004/0048286 and 2005/0130136 de Lee *et al.*; Dhalla *et al.*, *Mol. Cell. Biochem.* 87:85-92 (1989); Moe *et al.*, *Am. Heart. J.* 139:587-95 (2000); Januzzi *et al.*, *Eur. Heart J.* 27(3):330-7 (2006); Maisel *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 44(6):1328-33 (2004); y Maisel *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 347(3):161-7 (2002), cuyo contenido total se incorpora al presente documento como referencia. Las enzimas de función hepática incluyen alanina transaminasa (ALT); aspartato transaminasa (AST); fosfatasa alcalina (ALP); y bilirrubina total (TBIL).

45 [0050] En estos modos de realización, se determina la puntuación de riesgo de MACE y los niveles de uno o más biomarcadores adicionales, y la información de la puntuación y una comparación de los biomarcadores con sus respectivos niveles de referencia proporciona información adicional en cuanto al riesgo de muerte del sujeto y/o la presencia de una enfermedad grave en el sujeto, que puede proporcionar información más precisa y específica del riesgo al que se expone el sujeto. Los niveles pueden compararse entonces con una relación de referencia que representa un nivel de umbral por encima de la cual el sujeto presenta mayor riesgo de muerte y/o presenta una enfermedad grave.

### Seleccionar un Tratamiento - Agresivo frente a Conservador

55 [0051] Una vez que se ha determinado que un sujeto presenta una puntuación de riesgo de MACE por encima de una puntuación de referencia predeterminada, la información puede utilizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, si el sujeto presenta una puntuación elevada, p. ej., comparado con el nivel de referencia, puede



tomarse la decisión de tratar de manera agresiva, y el sujeto puede, p. ej., ingresar en un hospital para su tratamiento como paciente hospitalizado, p. ej., en una sala de cuidados críticos o intensivos. Los kits de ensayo portátiles pueden permitir al personal médico de emergencia evaluar a un sujeto en el campo, para determinar si deberían transportarlo al servicio de urgencias. Las decisiones de priorización, p. ej., en el servicio de urgencias o en otra instalación clínica, también pueden basarse en la información provista por un método descrito en el presente documento. Puede darse prioridad a los pacientes con puntuaciones elevadas con respecto a los que presentan puntuaciones más bajas.

**[0052]** Los procedimientos descritos en el presente documento también proporcionan información en relación a si un sujeto mejora, p. ej., responde al tratamiento, p. ej., si un sujeto hospitalizado ha mejorado lo suficiente como para darle de alta y continuar con su tratamiento en el ambulatorio. En general, estos métodos incluirán la determinación de una puntuación de riesgo de MACE en el sujeto en varias ocasiones. Una disminución de la puntuación de riesgo de MACE a lo largo del tiempo indica que es probable que el sujeto mejore. La puntuación de riesgo de MACE también puede compararse con una puntuación de referencia, según se describe en el presente documento, con el fin de determinar si el sujeto ha mejorado lo suficiente para darle de alta.

**[0053]** El sujeto también puede considerarse para inclusión en un ensayo clínico, por ejemplo, de un tratamiento que conlleva un riesgo relativamente alto. Se puede tratar al sujeto con un régimen que conlleva un riesgo relativamente mayor que el considerado apropiado para alguien que tenía un riesgo menor de MACE inminente, p. ej., un MACE en un periodo de 30 días o un 1 año desde su presentación.

**[0054]** Más allá del contexto clínico, la información que concierne la puntuación de riesgo de MACE del sujeto puede utilizarse de otras maneras, p. ej., para las decisiones de pago por parte de terceros, o para el establecimiento de primas de seguros médicos o de vida por parte de las compañías aseguradoras. Por ejemplo, una puntuación alta de riesgo de MACE, p. ej., una puntuación por encima de un umbral predeterminado, puede utilizarse para decidir aumentar las primas del seguro del sujeto.

#### **Poblaciones de pacientes**

**[0055]** Los métodos descritos en el presente documento son útiles en una gran variedad de contextos clínicos. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para un cribado de población general, incluyendo los cribados por parte de los médicos, p. ej., en hospitales y clínicas externas, así como en los servicios de urgencia. Como ejemplo, puede determinarse una puntuación de riesgo de MACE en cualquier momento, y si la puntuación de riesgo de MACE es elevada, el médico puede actuar de manera acorde.

**[0056]** Pese a que los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para cualquier sujeto en cualquier momento, son especialmente útiles para aquellos sujetos para los que es difícil determinar el diagnóstico o la gravedad de una afección. Por ejemplo, dichos sujetos pueden presentar síntomas no específicos, p. ej., síntomas que no indican un diagnóstico específico. Entre los síntomas no específicos se incluyen, sin carácter limitativo, dolor de pecho o molestia, dificultad respiratoria, náuseas, vómitos, eructos, sudoración, palpitaciones, mareos, fatiga y desmayos. Cada síntoma puede tener una etiología variada.

#### *Dolor de pecho*

**[0057]** El dolor de pecho es la queja principal en aproximadamente el 1 al 2 por ciento de las citas de pacientes externos, y pese a que la causa no suele ser cardíaca, las enfermedades cardíacas siguen siendo la causa principal de muerte en los Estados Unidos. Por lo tanto, distinguir entre causas graves y benignas del dolor de pecho es crucial. Los métodos descritos en el presente documento son útiles para realizar esta determinación.

**[0058]** Un sujeto que se presenta en los servicios de urgencia con dolor en el pecho puede presentar dolor esofágico, una úlcera, problemas pulmonares agudos tales como una embolia pulmonar (EP) (potencialmente letal), 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 letal). Puede ser difícil realizar inmediatamente un diagnóstico preciso, pero la decisión de si ingresar al sujeto o tratarlo de manera conservadora generalmente debería tomarse de manera inmediata. Si los métodos descritos en el presente documento indican que ha aumentado el riesgo del sujeto de sufrir un resultado clínico adverso, p. ej., MACE inminente o una enfermedad grave, entonces puede tomarse la decisión de tratar al sujeto de manera agresiva, para prevenir potencialmente este resultado adverso.

**[0059]** Puede encontrarse información adicional sobre el tratamiento y diagnóstico del dolor de pecho, p. ej., en Cayley, *Am. Fam. Phys.* 72(10):2012-2028 (2005).

#### *Disnea*

**[0060]** La disnea, o falta de aire (también definida como respiración anormal o molesta), es un síntoma común de

los sujetos que se presentan en los servicios de urgencia. El diagnóstico diferencial para la disnea incluye cuatro categorías generales: (1) cardíaca, (2) pulmonar, (3) mezcla de cardíaca o pulmonar, y (4) no cardíaca o no pulmonar.

5 [0061] Entre las causas cardíacas de la disnea se incluyen insuficiencia cardíaca congestiva biventricular, derecha o izquierda con disfunción sistólica resultante, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio reciente o remoto, cardiomiopatía, disfunción valvular, hipertrofia del ventrículo izquierdo con disfunción diastólica resultante, hipertrofia septal asimétrica, pericarditis y arritmias.

10 [0062] 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).

[0063] Los trastornos cardíacos y pulmonares incluyen trastornos EPOC con hipertensión pulmonar y cor pulmonale, mal estado físico, tromboembolismo pulmonar y trauma.

15 [0064] Los trastornos no cardíacos o no pulmonares incluyen afecciones metabólicas como la 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 de obstrucción rinofaríngeos incluyen obstrucción nasal debido a pólipos o desviación septal, amígdalas dilatadas y estenosis de las vías respiratorias supraglóticas o subglóticas.

20 [0065] También puede presentarse disnea como una manifestación somática de trastornos psiquiátricos, por ejemplo, un trastorno de ansiedad con hiperventilación resultante.

[0066] Puede encontrarse información adicional que concierne a la evaluación y tratamiento de la disnea, p. ej., en Morgan y Hodge, *Am. Fam. Phys.* 57(4):711-718 (1998).

#### *Poblaciones especiales*

25 [0067] Determinadas poblaciones de sujetos pueden beneficiarse particularmente de los métodos descritos en el presente documento. Estos sujetos incluyen a las personas para las que solo BNP o NT-proBNP es menos útil, como para aquellos con la función renal dañada (Anwaruddin *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 47(1):91-7 (2006); McCullough *et al.*, *Am. J. Kidney Dis.* 41(3):571-9 (2003)), o para aquellos con sobrepeso (Índice de Masa Corporal (IMC) de 25-29) u obesos ((IMC  $\geq$  30) (Krauser *et al.*, *Am. Heart J.* 149(4):744-50 (2005); McCord *et al.*, *Arch. Intern. Med.* 164(20):2247-52 (2004)). Es conocido y aceptado en el campo que los pacientes con un IMC alto suelen tener niveles de péptido natriurético 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 de circulación del ST2 no se ven influidos por el IMC, por lo tanto, la determinación de una puntuación de riesgo de MACE es más útil que solo los niveles de péptido natriurético en sujetos con un alto IMC. De esta manera, los métodos 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 para determinar la puntuación de riesgo de MACE, según se describe en el presente documento.

30

35

#### **EJEMPLOS**

[0068] La invención se describe en detalle en los siguiente ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

40 **Ejemplo 1. Derivación de una fórmula combinando ST2 con NT-proBNP para determinar el riesgo de MACE en pacientes con una insuficiencia cardíaca (IC) aguda descompensada**

[0069] Se ha demostrado de forma individual que la medición tanto de ST2 como de NT-proBNP al presentarse o en momentos durante su tratamiento o seguimiento resulta valiosa para el pronóstico. También se ha determinado que la medición más fuerte para el pronóstico es el cambio en ST2 entre dos momentos. En este análisis se evaluaron cuarenta y ocho (48) pacientes con una IC sintomática establecida atendiendo a dos clínicas de IC con signos y síntomas de una IC que empeoraba. Se obtuvieron las mediciones del punto de partida (T0) y de la semana 2 (T1) de las concentraciones de sST2 y de la prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP). Se declararon episodios cardíacos adversos (muerte, ingreso por una IC, y trasplante de corazón) en el 56% de los pacientes durante un periodo de seguimiento de 1 año. El área bajo los valores de la curva ROC (ABC) mostrados en la Tabla 1 calculados para una serie de mediciones realizadas en este conjunto de datos ilustra este punto cuando se utilizan todos los episodios cardíacos como resultado.

45

50

Tabla 1: Resumen de valores ABC ROC para cada medición individual y valores de la relación para episodios en 1 año

	ABC	SE	95% CI
ST2_T0	0,622	0,082	0,470 to 0,757
ST2_T1	0,583	0,0827	0,432 to 0,724
NTproBNP_T0	0,479	0,0845	0,333 to 0,628
NTproBNP_T1	0,619	0,081	0,467 to 0,755
ST2_R	0,772	0,0675	0,628 to 0,880
NTproBNP_R	0,717	0,0737	0,568 to 0,837

[0070] Utilizando la relación ST2 en un enfoque de aproximación de estratificación binaria simple obtenemos los resultados mostrados en la Tabla 2, en este caso utilizando el valor de umbral óptimo ROC de 0,75.

5 Tabla 2: Resumen de la estratificación de pacientes por riesgo de episodios cardíacos en 1 año utilizando un umbral de relación ST2 de 0,75.

	relación ST2		mediana	media
	<0,75	≥0,75		
			0,875	1,030
N	19	29		
Episodio N	6	20		
% Episodio	31,6%	69,0%		
PPV	69%			
NPV	68%			
RR	2,2			

15 [0071] Como puede verse en esta Tabla el umbral óptimo ROC es menor a la mediana o a la media. Sin embargo, si se utiliza un umbral más alto, como el valor de mediana, el riesgo relativo disminuye a 1,9 así que a efectos de este análisis utilizaremos el umbral de 0,75, que proporciona la mayor precisión de pronóstico.

20 [0072] En otros estudios (Januzzi *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 50:607-613 (2007); Mueller *et al.*, *Clin. Chim.* 54(4):752-756 (2008)) también se ha observado que existe una relación sinérgica entre ST2 y NT-proBNP cuando se utiliza para una estratificación de riesgo o pronóstico. En un esfuerzo por confirmar esa relación en esta cohorte así como para identificar el método más potente de utilizar ST2 y NT-proBNP juntos, se consideraron varias combinaciones matemáticas. La tabla 3 representa los mejores resultados obtenidos en un simple análisis binario donde el cambio en ST2 representado como una relación se combina con el valor NT-proBNP en el segundo momento. El umbral de 0,75 para el valor de relación ST2 se determinó por el análisis ROC, y se verificó subjetivamente, para que fuera óptimo y generalmente un valor NT-proBNP de 1000 pg/ml se considera ideal para el pronóstico en 1 año de periodo de seguimiento.

25 Tabla 3: Resumen de la estratificación de pacientes utilizando la relación ST2 y el valor NT-proBNP de la semana 2, utilizando los umbrales de 0,75 para la relación ST2 y 1000 pg/ml para NT-proBNP

0,75, 1000	ST2 R & NTproBNP W2					
	ST2-,NT-	ST2-,NT+	ST2+,NT-	ST2+,NT+	ambos -	cualquiera +
N	4	15	4	25	4	44
Episodio N	0	6	2	18	0	26
% Episodio	0,0%	40,0%	50,0%	72,0%	0,0%	59,1%

30 [0073] Pese a que es efectivo para identificar tanto a los pacientes con riesgo más alto como a los pacientes con riesgo más bajo, la debilidad en esta aproximación es que existe un número muy pequeño de pacientes en el grupo de riesgo más bajo y un alto porcentaje de pacientes en el rango indeterminado.

[0074] Para definir mejor la utilidad funcional de la relación ST2 combinado con un valor NT-proBNP se desarrolló una fórmula:

$$X = (ST2 T1/ST2 T0) + \alpha \ln(NTproBNP T1)$$

5 [0075] Esta fórmula se desarrolló evaluando el resultado como una función ABC ROC para un intervalo de coeficientes asociados con el término NT-proBNP. El resultado de esta serie de cálculos se muestra en la Figura 1.

[0076] El valor ABC máximo se consiguió con un coeficiente para  $\alpha$  de 0,33 resultando en que la ecuación final es:

$$X = (ST2 T1/ST2 T0) + 0.33 \ln(NTproBNP T1)$$

10 [0077] Al utilizar este algoritmo en una serie de cálculos comparando la sensibilidad, especificidad y riesgo relativo (eje lateral derecho) obtenemos el gráfico de la Figura 2.

[0078] En este gráfico el valor de puntuación que resulta en el máximo valor de riesgo relativo es 3,2. El análisis ROC de estos datos confirma que el valor de umbral óptimo es 3,3, ilustrado en la Figura 3. Además cabe destacar que el valor ABC utilizando esta puntuación es de 0,80 según se compara con el 0,77 para la relación ST2 y 0,72 para la relación NT-proBNP, que generó los siguientes valores ABC más altos.

15 [0079] Cuando se utiliza esta puntuación, en el valor de umbral de 3,2, para estratificar a los pacientes en esta cohorte que están en riesgo de padecer un episodio: un ingreso, un trasplante o la mortalidad, se consigue una clara distinción entre los pacientes con riesgo bajo y los pacientes con riesgo alto. Estos resultados se ilustran en la Tabla 4.

20 Tabla 4: Resumen de la estratificación de pacientes por el riesgo de sufrir episodios adversos en 1 año utilizando un punto de corte de la puntuación de 3,2.

	Puntuación		mediana	media
	<3,2	>3,2		
N	17	31	3,55	3,71
Episodio N	3	23		
% Episodio	17,6 %	74,2 %		
PPV	74,2 %			
NPV	82,4 %			
RR	4,2			

[0080] Al comparar directamente estos resultados con los resultados que utilizan sólo la relación ST2, mostrados en la Tabla 2, se ilustra que combinando la relación ST2 con un valor NT-proBNP todos los parámetros relevantes que representan la evaluación de predicción del riesgo son más fuertes; PPV, NPV y RR.

25 [0081] Para comparar los resultados de estratificación para el siguiente valor más fuerte, la relación NT-proBNP se resume en la Tabla 5. Los valores que utilizan la relación NT-proBNP son mucho más bajos que cuando se utiliza la relación ST2 o desde la fórmula que combina ST2 con NT-proBNP

Tabla 5: Resumen de la estratificación de pacientes por el riesgo de sufrir episodios adversos en 1 año utilizando la relación NT-proBNP

	Relación NT-proBNP		mediana	media
	<0,75	>0,75		
N	24	24	0,74	0,83
Episodio N	10	16		
% Episodio	41,7 %	66,7 %		
PPV	66,7 %			
NPV	58,3 %			

RR	1,1
----	-----

Tabla 6: Comparación de los valores de puntuación y relación ST2

	Relación NT-proBNP	relación ST2	Puntuación
PPV	67 %	69 %	74 %
NPV	58 %	68 %	82 %
RR	1,1	2,2	4,2

5

**[0082]** Las diferencias relativas entre los valores de puntuación y relación ST2 también pueden representarse de manera gráfica utilizando gráficos de caja y bigotes, según se muestra en la Figura 4A. Según lo previsto, ambos grupos presentaban una resolución significativa estadísticamente entre los grupos de episodio y de no episodio,  $P=0,0004$  para la Puntuación y  $P=0,0013$  para la relación ST2.

10

**[0083]** La distinción entre la puntuación generada por esta fórmula y el radio de valores ST2 también se observa cuando se analiza mediante las curvas de supervivencia Kaplan-Meier. La Figura 4B muestra los resultados de la curva de supervivencia para la puntuación de la fórmula con una relación de riesgo calculado de 5,93. Acorde con los cálculos anteriores, la Figura 5 muestra que este mismo análisis para la relación ST2 presentaba una relación de riesgo de 2,72, que es similar al valor calculado para la relación NT-proBNP de 2,39, según se muestra en la Figura 6.

15

**[0084]** Los índices de riesgo calculados a partir de las curvas Kaplan-Meier eran consistentes con el análisis de regresión de Cox de Riesgo Proporcional. La Tabla 7 resume los valores de relación de riesgo (HR) de ambos cálculos para las tres medidas más informativas.

20

Tabla 7: Resumen de los valores de relación de riesgo para el riesgo de sufrir un episodio durante un periodo de seguimiento de 1 año

	Puntuación CCD		Relación ST2		Relación NT-proBNP	
	HR	p	HR	p	HR	p
curva K-M	5,93	0,0009	2,72	0,025	2,39	0,025
cox	6,07	0,003	2,73	0,03	2,12	0,059

25

**[0085]** Esta fórmula también se evaluó en cuanto a la precisión al predecir los puntos finales más definitivos de muerte y/o trasplante, según se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Resumen de valores ABC ROC para cada medición individual y valores de la relación de muertes o trasplantes en 1 año

	ABC	SE	95% CI
ST2_S0	0,625	0,0813	de 0,474 a 0,761
ST2_S2	0,521	0,0858	de 0,372 a 0,667
NTPROBNP_S0	0,564	0,086	de 0,414 a 0,707
NTPROBNPS2	0,679	0,0813	de 0,528 a 0,806
ST2_R	0,706	0,0793	de 0,557 a 0,828
NTPROBNP_R	0,672	0,0818	de 0,521 a 0,800

30

**[0086]** En este análisis, la única variable que tuvo un ABC mayor que 0,7 es la relación ST2. Para el resultado de muerte o trasplante se determinó un valor de umbral de 0,85 para la relación ST2 mediante el análisis ROC para que fuera óptimo, según se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Valores ROC de relación ST2

Criterio	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	+LR	-LR
>0,85	68,42	43,5-87,3	58,62	38,9 – 76,5	1,65	0,54

5 **[0087]** Cuando estos resultados se compararon con un valor de umbral generalmente aceptado para un cambio en NT-proBNP de 0,7 (el valor óptimo de ROC para la relación NT-proBNP es 0,58), se generaron los resultados mostrados en la Tabla 10. Observe que el valor de umbral óptimo para la relación ST2 y el riesgo de muerte o trasplante en 1 año era mayor con 0,85 que el valor de umbral óptimo de 0,75 para cualquier episodio cardíaco adverso en 1 año.

Tabla 10: Resumen de la estratificación de pacientes por el riesgo de sufrir muerte o trasplante en 1 año comparando la relación ST2 y la relación NT-proBNP

	Relación ST2		Relación NT-proBNP	
	<0,85	≥0,85	<0,7	≥0,7
N	22	26	22	26
Episodio N	5	14	5	14
% Episodio	22,7 %	53,8 %	23 %	54 %
PPV	53,8 %		53,8 %	
NPV	77,3 %		77,3 %	
RR	2,4		2,4	

10 **[0088]** Pese a que cada biomarcador tenía una fuerza de predicción similar, de los cinco pacientes identificados por debajo del umbral, solo a uno se le pronosticó con ambos biomarcadores.

15 **[0089]** El análisis de la curva de supervivencia Kaplan-Meier también mostró que, cuando se considera individualmente en esta población, la relación ST2 y la relación NT-proBNP eran funcionalmente indistinguibles en cuanto a la predicción resultante, pese a que la curva para la relación NT-proBNP diverge pronto y se mantiene divergente, mientras que la curva para la relación ST2 diverge mucho después. Para la relación ST2 la HR es 2,66 (p=0,0506), mientras que para la relación NT-proBNP la HR es 2,60 (P=0,0201).

**[0090]** Los resultados obtenidos por el análisis de regresión de Cox de riesgo proporcional son parcialmente diferentes. Cuando se analizaron individualmente los valores HR eran 1,94 para la relación ST2 y 0,55 para la relación NT-proBNP, y eran casi iguales cuando se analizaron juntos en 2,03 para la relación ST2 y 0,53 para la relación NT-proBNP. El valor p no era significativo para ninguna variable, en 0,176 y 0,168 respectivamente.

20 **[0091]** Sin embargo, según se observó cuando se evaluaron los episodios como el parámetro resultante, si la relación de ST2 se combinaba con el segundo valor NT-proBNP los resultados del análisis ROC ilustran una mayor precisión en la predicción utilizando esta fórmula, como se muestra en la Figura 9.

25 **[0092]** Pese a que el análisis ROC identificó 3,5 como el umbral óptimo, un análisis adicional confirma que el umbral anteriormente identificado de 3,2 proporciona una mejor precisión de pronóstico. La HR del análisis de supervivencia Kaplan-Meier (Figura 10) fue 6,02 (p=0,0060). La HR calculada a partir del análisis de regresión de Cox de riesgo proporcional fue muy similar a 6,08 (p=0,016).

**[0093]** La Tabla 11 proporciona un resumen de los cálculos de riesgo relativo comparando los valores previamente determinados para las relaciones ST2 y NT-proBNP así como la puntuación de riesgo de MACE.

Tabla 11: El resumen de la estratificación de paciente por riesgo a la muerte o trasplante en 1 año.

Muerte o trasplante en un año						
	Relación ST2		Relación NT-proBNP		Puntuación riesgo MACE	
	<0,85	>0,85	<0,7	≥0,7	<3,2	≥3,2
N	22	26	22	26	17	31

Episodio N	5	14	5	14	2	17
% Episodio	22,7 %	53,8 %	23 %	54 %	11,8 %	54,8 %
PPV	53,8 %		53,8 %		54,8 %	
NPV	77,3 %		77,3 %		88,2 %	
RR	2,4		2,4		4,7	

**[0094]** Una ilustración de diagrama de caja simple (Fig.11) confirma la distinción entre el grupo de episodio y el de no episodio para los valores de puntuación de riesgo de MACE. Para este diagrama  $p=0,002$ . Nótese que los valores de mediana no se superponen con el límite 25-75%. Esta misma comparación para la relación ST2 y la relación NT-proBNP se muestra en las Figuras 12 y 13. Los valores p para estos diagramas son 0,017 y 0,046 respectivamente y la distinción entre el grupo de episodio y el de no episodio no es definitiva como lo es para la puntuación de riesgo de MACE.

**Conclusión**

**[0095]** Según se deriva de este conjunto de datos, la fórmula descrita que combina los valores de la relación de ST2 entre dos momentos y un valor NT-proBNP medido en el segundo momento proporciona la medida de riesgo más precisa y fuerte en relación al hecho de que un paciente podrá sufrir un episodio cardíaco adverso definido como ingreso, trasplante o muerte.

**Ejemplo 2. Análisis de validación de la fórmula que combina ST2 con NT-proBNP para la predicción de riesgo de MACE**

**[0096]** En el estudio descrito en este ejemplo, se hizo un seguimiento a 150 pacientes hospitalizados con IC gravemente desestabilizados en el Sistema de Atención a Veteranos en San Diego, California. Se midieron múltiples parámetros relacionados con el corazón, incluyendo ST2, BNP, NT-proBNP, y nitrógeno ureico en sangre (BUN). Las muestras de plasma se recogieron en seis momentos entre el ingreso y el alta. Las concentraciones de biomarcadores se correlacionan con la supervivencia en 90 días. Estos 150 pacientes se clasificaron además mediante los siguientes criterios para optimizar la coordinación entre las diferentes mediciones que se llevaron a cabo y los momentos en los que se hicieron estas mediciones:

1. Valor de ST2 en el día 1
2. Valor de ST2 en el día 3 o después para un mínimo de tiempo transcurrido de 2 días
3. Valor NT-proBNP el mismo último día que el último valor ST2
4. Vivo al darle el alta

**[0097]** Esta clasificación resultó en un número (N) de pacientes restantes de 107 en total, con 35 episodios, reingresos o muertes, en 90 días y 13 de esos episodios fueron muertes en 90 días. El siguiente análisis compara varias medidas individuales para predecir con precisión la mortalidad en 90 días y valida la fórmula que combina ST2 con NT-proBNP.

**[0098]** Si los biomarcadores se comunican día a día como una función de si el paciente sobrevivió o murió, existe una clara distinción a lo largo del tiempo. En pacientes que no sobrevivieron los valores para ST2, así como el BNP y nT-proBNP aumentaron, mientras que en aquellos pacientes que sobrevivieron estos valores descendieron y permanecieron bajos. En las Figuras 14-16, la mediana se traza con barras de error que representan los percentiles 25-75.

**[0099]** En este análisis, el día cuatro (transcurridos tres días), los tres biomarcadores alcanzaron una separación máxima en los valores de mediana entre los supervivientes y los fallecidos, pero sólo ST2 y NT-proBNP también fueron capaces de alcanzar y mantener una resolución significativa no sólo entre los valores de mediana sino también entre los valores percentiles de 25-75.

**[0100]** El análisis ROC, resumido en la Tabla 13, afirmó esta observación con un máximo de valores ABC para cada biomarcador ya sea en la medición individual del día 4 o del cambio, indicado como una relación, entre un punto de referencia y el día 4. Sin embargo, la fuerza funcional para utilizar las mediciones del día 4 se limitó en este caso porque a partir de esta cohorte de 107 pacientes sólo se indicaron 60 valores para el día 4. Con el fin de maximizar el número de pacientes que se incluyeron en el análisis, se obtuvo un valor para el último (U) tomando el último valor disponible para cada paciente desde el día 3 o después. Se observa que los valores ABC para el último valor no eran significativamente diferentes a los valores para el valor del día 4 de cada biomarcador, ni tampoco los valores ABC para la relación de las mediciones 4:1 o las mediciones L:F. Por consiguiente, para el resto de este análisis los valores usados fueron el primero (1), el último (L) y la relación del

último al primero (L:F).

Tabla 13: Valores individuales ABC a partir del análisis ROC para la mortalidad en 90 días

5

	ABC
	Muerte 90
BNP 1	0,602
BNP 4	0,739
BNP L	0,729
BNP R 4:1	0,684
BNP R L:F	0,684
NTproBNP 1	0,735
NTproBNP 4	0,836
NTproBNP L	0,824
NTproBNP R 4:1	0,820
NTproBNP R L:F	0,776
ST2 1	0,530
ST2 4	0,889
ST2 L	0,773
ST2 R 4:1	0,816
ST2 R L:F	0,838
BUN	0,830

10

15

20

**[0101]** La Figura 17 y la Tabla 14 resumen el análisis ROC para los valores de relación L:F para cada biomarcador. En una comparación similar ninguna de las curvas consigue una resolución estadísticamente significativa.

Tabla 14: Resultados del análisis ROC de relaciones de mortalidad en 90 días

25

	ABC	SE	95% CI
ST2_RL_F	0,838	0,0708	de 0,754 a 0,902
NT_RL_F	0,776	0,079	de 0,685 a 0,851
BNP_RL_F	0,684	0,0859	de 0,587 a 0,770

30

**[0102]** Según se determinó utilizando los datos de la cohorte de péptidos para la derivación, el resultado de la fórmula de puntuación de riesgo por mortalidad produjo ABC del análisis ROC mayor que cualquiera de las mediciones individuales o de los valores relación. El análisis ROC para esta fórmula se muestra en la Figura 18 y los datos del análisis ROC se resumen en la Tabla 15.

35



Tabla 15: datos de ROC de la fórmula de puntuación de riesgo de MACE para mortalidad en 90 días

Grupo positivo	
Muerte90	= 1
Tamaño de muestra	13
Grupo negativo	
Muerte90	= 0
Tamaño de muestra	94

Área bajo la curva ROC (ABC)	0.876
Error estándar	0.0639
95% Intervalo de confianza	0.798 a 0.931
Nivel de significancia P (Área = 0,5)	0.0001

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC						
Criterio	Sensibilidad	95% IC	Especificidad	95% IC	+LR	-LR
>=1.67	100.00	75.1 - 100.0	0.00	0.0 - 3.9	1.00	
>3.1	100.00	75.1 - 100.0	42.55	32.4 - 53.2	1.74	0.00
>3.12	92.31	63.9 - 98.7	42.55	32.4 - 53.2	1.61	0.18
>3.52 *	92.31	63.9 - 98.7	72.34	62.2 - 81.1	3.34	0.11
>3.59	84.62	54.5 - 97.6	73.40	63.3 - 82.0	3.18	0.21
>3.61	84.62	54.5 - 97.6	75.53	65.6 - 83.8	3.46	0.20
>3.62	76.92	46.2 - 94.7	75.53	65.6 - 83.8	3.14	0.31
>3.75	76.92	46.2 - 94.7	84.04	75.0 - 90.8	4.82	0.27

[0103] El valor óptimo ROC a partir de este análisis fue 3,52. Como observamos utilizando los datos de la cohorte de péptidos (véase el **Ejemplo I**), la ROC de la fórmula de puntuación de riesgo de MACE óptima también fue 3,5 pero la mejor precisión de pronóstico (mortalidad) se alcanzó con un valor 3,2 en esa cohorte. Un diagrama de caja y bigotes básico (Figura 19) muestra una resolución clara entre el grupo de supervivientes y de fallecidos,  $p < 0,0001$ . Para comparar, un análisis de gráfico de caja y bigotes de ST2 R L:F es similar, con un  $p = 0,0001$  (Figura 20). También se observó utilizando los datos de la cohorte de péptidos que un análisis de matriz básico y un cálculo de riesgo relativo confirman que la puntuación de riesgo de MACE proporciona la predicción de mortalidad más precisa.

Tabla 16: Análisis de matriz y riesgo relativo de las variables de predicción de mortalidad más fuertes

	ST2 R L:F		NTproBNP R L:F		Puntuación de riesgo MACE	
	<0,85	≥0,85	<0,7	≥0,7	<3,5	≥3,5
N	76	31	49	58	65	42
N mortalidad	3	10	2	11	1	12
% mortalidad	3,9%	32,3%	4,1%	19,0%	1,5%	28,6%
PPV	32,3%		19,0%		28,6%	
NPV	96,1 %		95,9%		98,5%	
RR	8,2		4,6		18,6	

[0104] Pese a que tanto la relación ST2 como la relación NTproBNP produjeron buenos valores de riesgo relativo, el riesgo relativo utilizando la puntuación de riesgo de MACE fue mucho mayor.

**Conclusión**

[0105] Según se determinó utilizando los datos de la cohorte de péptidos (**Ejemplo 1**) la fórmula de puntuación de riesgo de MACE descrita en el presente documento proporciona la mayor precisión de pronóstico, específicamente cuando el parámetro resultante es la mortalidad, según se determina por la ROC, la relación de riesgo y el cálculo de riesgo relativo. Existe una pequeña pero significativa diferencia entre los valores de umbral

en estas dos cohortes. La cohorte de péptidos descrita en el **Ejemplo 1** es un grupo de pacientes no ingresados con un umbral de relación ST2 de 0,75 y un umbral de fórmula de puntuación de riesgo de MACE de 3,2, mientras que la cohorte VET descrita en este **Ejemplo 2** es un grupo de pacientes no ingresados, y los valores de umbral respectivos son 0,85 y 3,5. Esta diferencia en valores de umbral puede deberse a la diferencia en la gravedad de la enfermedad entre el estado de un paciente ingresado y uno no ingresado o puede deberse a la diferencia temporal entre mediciones, ya que hubo un periodo de 2 semanas entre las mediciones en la cohorte de pacientes no ingresados en comparación con un periodo de 3-5 días en la cohorte de pacientes ingresados. Shimpo *et al.*, *Circulation* 109(18):2186-90 (2004), indicó que los valores ST2 aumentan rápidamente en las primeras 12 horas que siguen al infarto de miocardio. Los resultados descritos en estos dos ejemplos ilustran claramente que existe también un cambio dinámico en los niveles ST2 en pacientes con un fallo cardíaco pero los parámetros cinéticos todavía están por determinar.

[0106] Aspectos adicionales de la invención se describen en las siguientes cláusulas:

- a. Un método para evaluar el riesgo de sufrir un episodio cardíaco adverso grave (MACE) para un sujeto en un periodo de un año, método que comprende:
  - 15 la determinación de una puntuación de riesgo de MACE (MACERS) para un sujeto basándose, al menos en parte, en la relación de un segundo nivel de gen 2 expresado por estimulación del crecimiento (ST2) en el sujeto en un segundo momento (ST2 T0) con un primer nivel de ST2 en el sujeto en un primer momento (ST2 T1), junto con un logaritmo ponderado de un nivel de un péptido natriurético (NP) en el sujeto en el segundo momento (NP T1) y
    - 20 la comparación de la MACERS con una MACERS de referencia; donde la MACERS en comparación con la MACERS de referencia indica el riesgo al que se expone el sujeto de sufrir un MACE en el periodo de un año.
  - b. Método de acuerdo con la cláusula a, que comprende además:
    - 25 la obtención de un primer nivel de ST2 en el sujeto en un primer momento, con el fin de determinar ST2 T0; la obtención de un segundo nivel de ST2 en el sujeto en un segundo momento, con el fin de determinar ST2 T1; y
    - 30 la obtención de un nivel de un péptido natriurético (NP) en el sujeto en el segundo momento, con el fin de determinar NP T1.
  - c. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que el logaritmo de NP T1 incluye un logaritmo natural.
  - d. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que la MACERS se determina utilizando la siguiente fórmula:
 
$$\text{MACERS} = (\text{ST2 T1}/\text{ST2 T0}) + \alpha \ln(\text{NP T1}),$$
 donde el coeficiente alfa es un factor de ponderación para la variable sobre la que actúa.
  - 35 e. Método de acuerdo con la cláusula d, en el que el coeficiente alfa es aproximadamente 0,33.
  - f. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que el NP es un péptido natriurético de tipo cerebral (NT-proBNP).
  - 40 g. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que el primer momento es entre 1-7 días desde la aparición de los síntomas.
  - h. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que el segundo momento es entre 2-14 días después del primer momento.
  - i. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que el episodio adverso se selecciona del grupo que consiste en la recurrencia de un episodio cardíaco inicial; una angina de pecho, una descompensación de insuficiencia cardíaca; un ingreso por enfermedad cardiovascular; la mortalidad debido a una enfermedad cardiovascular; y el trasplante.
  - 45 j. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que al sujeto se le ha diagnosticado una insuficiencia cardíaca.
  - k. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que la MACERS de referencia representa una puntuación correspondiente a un riesgo bajo de sufrir un episodio adverso en el periodo de un año.
  - 50 l. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que la muestra comprende suero, sangre, plasma, orina o

tejido corporal.

- 5
- m. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que la MACERS de referencia es aproximadamente 3,2, y una puntuación que sea mayor o igual a la puntuación de referencia indica que el sujeto presenta un riesgo elevado de sufrir un episodio adverso en el periodo de un año, comparado con un sujeto con una puntuación inferior al nivel de referencia.
  - n. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que el sujeto presenta un IMC de 25-29, un IMC  $\geq$  30 o una insuficiencia renal.
  - o. Método de acuerdo con la cláusula a, en el que la decisión de dar de alta o continuar tratando al paciente manteniéndolo ingresado se toma basándose en la MACERS.

**Reivindicaciones**

1. Un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto, método que comprende:

5 la determinación de una puntuación de riesgo de sufrir un episodio cardíaco adverso grave (MACERS) para un sujeto basándose, al menos en parte, en la relación de un segundo nivel de gen soluble 2 expresado por estimulación del crecimiento (ST2) en el sujeto en un segundo momento (ST2 T1) con un primer nivel de ST2 soluble en el sujeto en un primer momento (ST2 T0), junto con un logaritmo natural ponderado de un nivel de la prohormona N-terminal del péptido natriurético de tipo cerebral (NT-proBNP) en el sujeto en un segundo momento (NP T1) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{MACERS} = (\text{ST2 T1}/\text{ST2 T0} + \alpha \ln(\text{NP T1})), \text{ donde } \alpha \text{ es un factor de ponderación;}$$

10 la comparación de la MACERS con una MACERS de referencia; y la elección de:

(a) hospitalización inicial, tratamiento continuo sobre pacientes hospitalizados o cateterismo cardíaco para un sujeto con una MACERS elevada en comparación con la MACERS de referencia,

15 (2) un tratamiento alternativo para un sujeto que recibe un tratamiento y que presenta una MACERS elevada en comparación con la MACERS de referencia, o

(3) tratamiento continuo o interrupción del tratamiento, tal como con el alta del hospital, para un sujeto que recibe un tratamiento y que presenta una MACERS disminuida en comparación con la MACERS de referencia.

20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se elige la hospitalización inicial, el tratamiento continuo sobre pacientes hospitalizados o el cateterismo cardíaco para un sujeto que presenta una MACERS elevada en comparación con la MACERS de referencia.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se elige un tratamiento alternativo para un sujeto que recibe un tratamiento y que presenta una MACERS disminuida en comparación con la MACERS de referencia.

25 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se elige un tratamiento continuo o la interrupción del tratamiento, tal como con el alta del hospital, para un sujeto que recibe un tratamiento y que presenta una MACERS disminuida en comparación con la MACERS de referencia.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la MACERS de referencia representa una puntuación correspondiente a un riesgo bajo de sufrir un episodio adverso en el periodo de un año.

30 6. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende:

la obtención de un primer nivel de ST2 soluble en el sujeto en un primer momento, con el fin de determinar ST2 T0;

la obtención de un segundo nivel de ST2 soluble en el sujeto en un segundo momento, con el fin de determinar ST2 T1; y

35 la obtención de un nivel de NT-proBNP en el sujeto en el segundo momento, con el fin de determinar NP T1.

7. Un método para evaluar la eficacia de un tratamiento en un sujeto, método que comprende:

40 la determinación de una puntuación de riesgo de MACE (MACERS) para un sujeto basándose, al menos en parte, en la relación de un segundo nivel de gen soluble 2 expresado por estimulación del crecimiento (ST2) en el sujeto en un segundo momento (ST2 T1) con un primer nivel de ST2 soluble en el sujeto en un primer momento (ST2 T0), junto con un logaritmo natural ponderado de un nivel de la prohormona N-terminal del péptido natriurético de tipo cerebral (NT-proBNP) en el sujeto en un segundo momento (NP T1) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Primera MACERS} = (\text{ST2 T1}/\text{ST2 T0} + \alpha \ln(\text{NP T1})), \text{ donde } \alpha \text{ es un factor de ponderación;}$$

45 la determinación de una segunda puntuación de riesgo de MACE (MACERS) para un sujeto basándose, al menos en parte, en la relación de un tercer nivel de ST2 en el sujeto en un tercer momento (ST2 T2) con un primer nivel de ST2 soluble en el sujeto en el primer momento (ST2 T0), junto con un logaritmo natural ponderado de un nivel de NT-proBNP en el sujeto en el tercer momento (NP T2) de acuerdo con la siguiente fórmula:

Segunda MACERS =  $(ST2\ T2/ST2\ T0 + \alpha \ln(NP\ T2))$ , donde  $\alpha$  es un factor de ponderación; la comparación de la segunda MACERS con la primera MACERS; y la determinación de que el tratamiento es eficaz en un sujeto que presenta una segunda MACERS que ha disminuido en comparación con la primera MACERS, o que el tratamiento no es eficaz en un sujeto que presenta una segunda MACERS que es igual o superior en comparación con la primera MACERS.

5

8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se determina que el tratamiento es eficaz en un sujeto que presenta una segunda MACERS que ha disminuido en comparación con la primera MACERS.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se determina que el tratamiento no es eficaz en un sujeto que presenta una segunda MACERS que es igual o superior en comparación con la primera MACERS.

10

10. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el método comprende:

la obtención de un primer nivel de ST2 soluble en el sujeto en el primer momento, con el fin de determinar ST2 T0;

la obtención de un segundo nivel de ST2 soluble en el sujeto en el segundo momento, con el fin de determinar ST2 T1;

15

la obtención de un tercer nivel de ST2 soluble en el sujeto en el tercer momento, con el fin de determinar ST2 T2;

la obtención de un nivel de NT-proBNP en el sujeto en el segundo momento, con el fin de determinar NP T1 y

la obtención de un nivel de NT-proBNP en el sujeto en el tercer momento, con el fin de determinar NP T2.

20

11. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 7, en el que el factor de ponderación  $\alpha$  es aproximadamente 0,33.

12. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 7, en el que el primer momento es entre 1-7 días desde la aparición de los síntomas en el sujeto.

25

13. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 7, en el que el segundo momento es entre 2-14 días después del primer momento.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 7, en el que al sujeto se le ha diagnosticado una insuficiencia cardíaca o presenta un IMC de 25-29, un IMC  $\geq$  30 o una insuficiencia renal.

15. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 7, en el que la muestra comprende suero, sangre o plasma.

Figura 1

Puntuación = relación ST2 semana 2/Semana 0 + Alfa + log (Semana 2 NTproBNP)



Figura 2

Sensibilidad, especificidad y riesgo relativo en diferentes puntos de corte para la relación + log(NTprpoBNP)/3

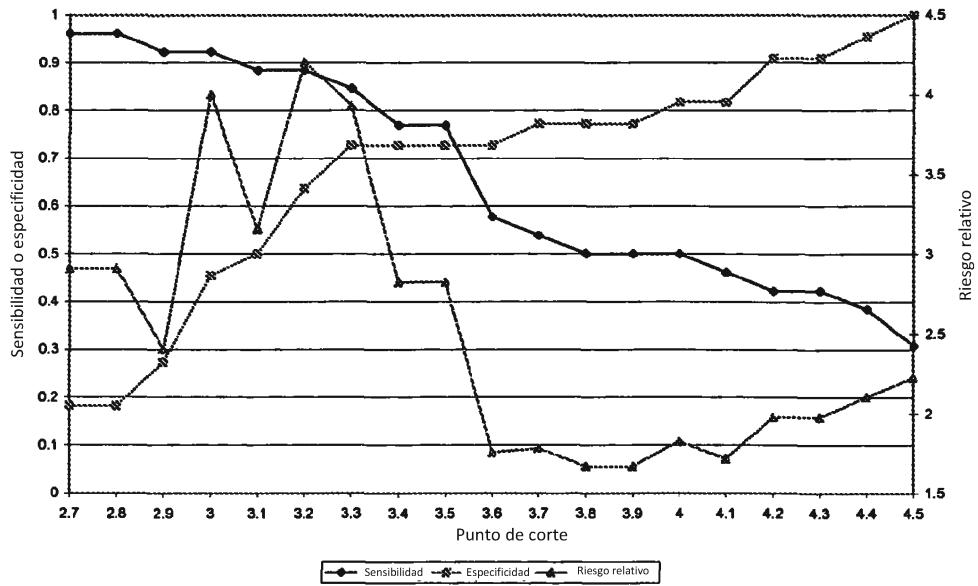
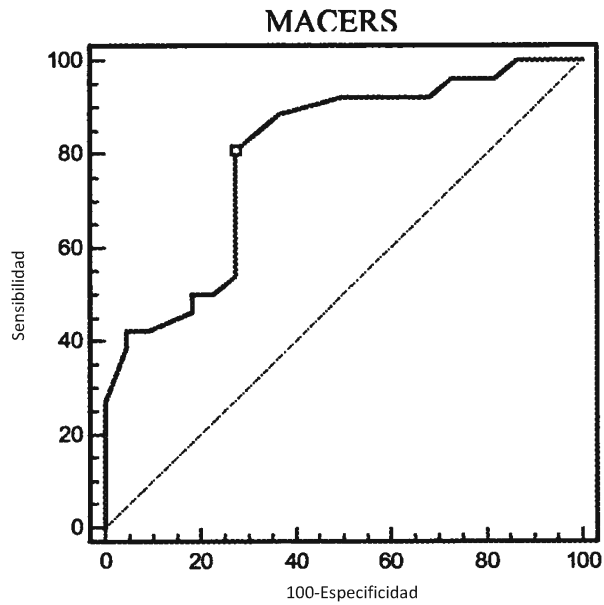


Figura 3



Área bajo la curva ROC (ABC)	<b>0.800</b>
Error estándar	<b>0.0637</b>
Intervalo de confianza 95%	<b>0.659 a 0.901</b>
Nivel de significancia P (Área = 0,5)	<b>0.0001</b>

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC

Criterio	Sensibilidad	95% IC	Especificidad	95% IC	+LR	-LR
<b>&gt;=2</b>	<b>100.00</b>	<b>86.7 - 100.0</b>	<b>0.00</b>	<b>0.0 - 15.6</b>	<b>1.00</b>	
<b>&gt;2.5</b>	<b>100.00</b>	<b>86.7 - 100.0</b>	<b>13.64</b>	<b>3.1 - 34.9</b>	<b>1.16</b>	<b>0.00</b>
<b>&gt;2.6</b>	<b>96.15</b>	<b>80.3 - 99.4</b>	<b>18.18</b>	<b>5.3 - 40.3</b>	<b>1.18</b>	<b>0.21</b>
<b>&gt;2.8</b>	<b>96.15</b>	<b>80.3 - 99.4</b>	<b>27.27</b>	<b>10.8 - 50.2</b>	<b>1.32</b>	<b>0.14</b>
<b>&gt;2.9</b>	<b>92.31</b>	<b>74.8 - 98.8</b>	<b>31.82</b>	<b>13.9 - 54.9</b>	<b>1.35</b>	<b>0.24</b>
<b>&gt;3</b>	<b>92.31</b>	<b>74.8 - 98.8</b>	<b>50.00</b>	<b>28.2 - 71.8</b>	<b>1.85</b>	<b>0.15</b>
<b>&gt;3.1</b>	<b>88.46</b>	<b>69.8 - 97.4</b>	<b>63.64</b>	<b>40.7 - 82.8</b>	<b>2.43</b>	<b>0.18</b>
<b>&gt;3.2</b>	<b>84.62</b>	<b>65.1 - 95.5</b>	<b>68.18</b>	<b>45.1 - 86.1</b>	<b>2.66</b>	<b>0.23</b>
<b>&gt;3.3 *</b>	<b>80.77</b>	<b>60.6 - 93.4</b>	<b>72.73</b>	<b>49.8 - 89.2</b>	<b>2.96</b>	<b>0.26</b>
<b>&gt;3.6</b>	<b>53.85</b>	<b>33.4 - 73.4</b>	<b>72.73</b>	<b>49.8 - 89.2</b>	<b>1.97</b>	<b>0.63</b>
<b>&gt;3.7</b>	<b>50.00</b>	<b>29.9 - 70.1</b>	<b>77.27</b>	<b>54.6 - 92.1</b>	<b>2.20</b>	<b>0.65</b>
<b>&gt;3.9</b>	<b>50.00</b>	<b>29.9 - 70.1</b>	<b>81.82</b>	<b>59.7 - 94.7</b>	<b>2.75</b>	<b>0.61</b>
<b>&gt;4</b>	<b>46.15</b>	<b>26.6 - 66.6</b>	<b>81.82</b>	<b>59.7 - 94.7</b>	<b>2.54</b>	<b>0.66</b>
<b>&gt;4.1</b>	<b>42.31</b>	<b>23.4 - 63.1</b>	<b>90.91</b>	<b>70.8 - 98.6</b>	<b>4.65</b>	<b>0.63</b>

Figura 4A

Caja y bigotes

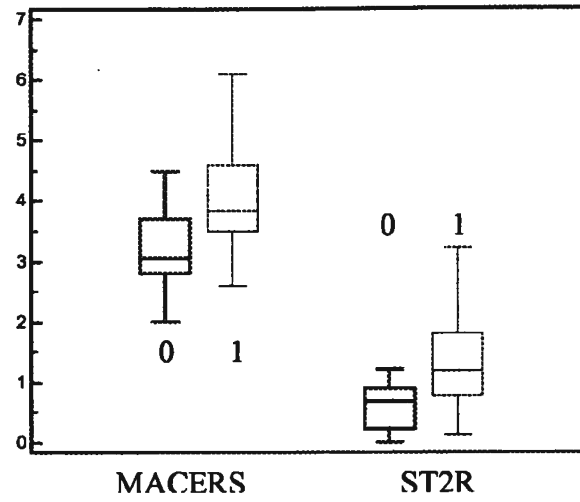


Figura 4B

Episodio

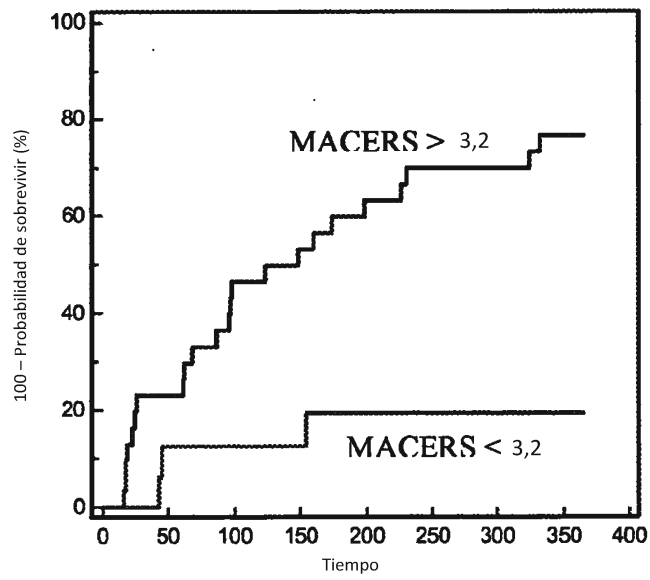




Figura 5

Episodio

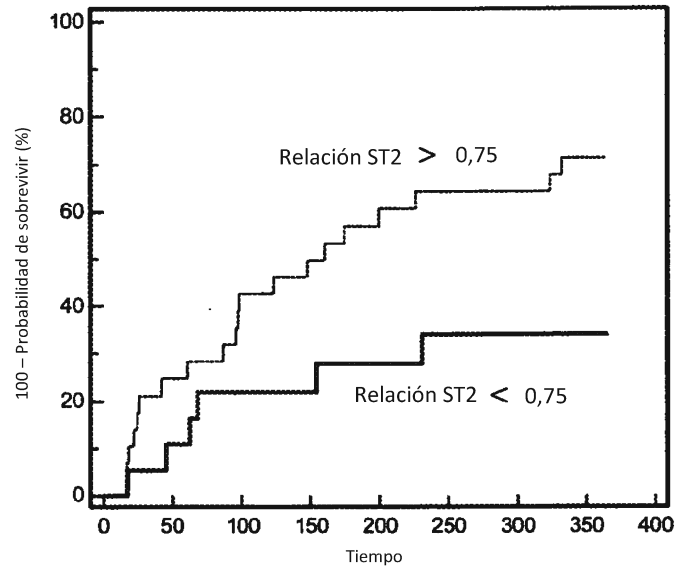
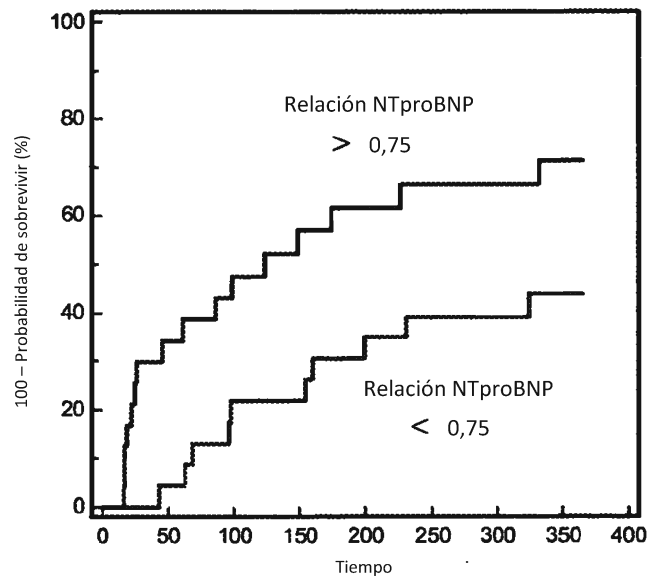


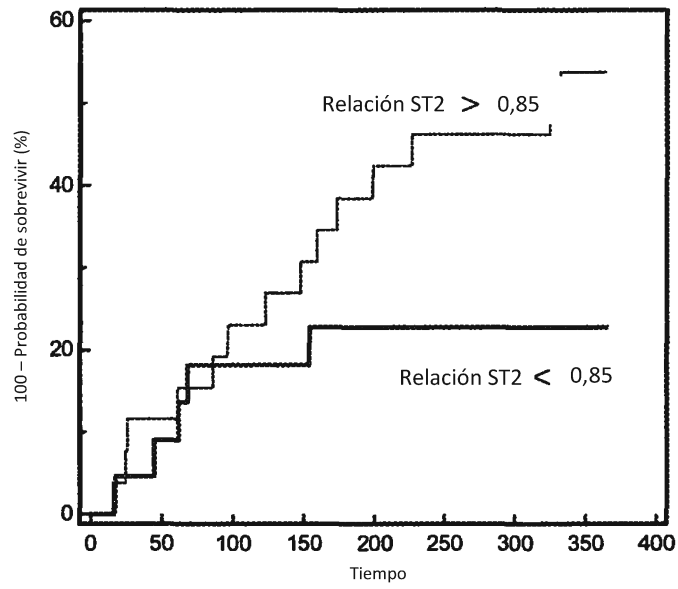
Figura 6

Episodio



**Figura 7**

Muerte o trasplante



**Figura 8**

Muerte o trasplante

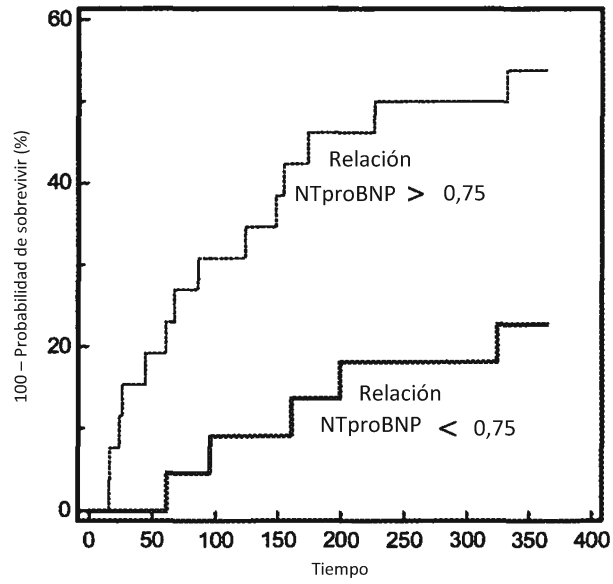
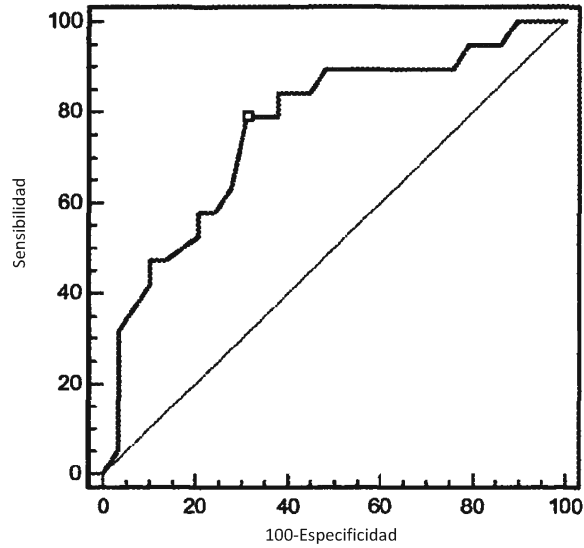


Figura 9

MACERS



Área bajo la curva ROC (ABC)	0.766
Error estándar	0.0734
95% Intervalo de confianza	0.621 a 0.876
Nivel de significancia P (Área = 0,5)	0.0003

Valores de criterio y coordenadas de la curva ROC						
>3.1	89.47	66.8 - 98.4	51.72	32.5 - 70.5	1.85	0.20
>3.2	84.21	60.4 - 96.4	55.17	35.7 - 73.5	1.88	0.29
>3.3	84.21	60.4 - 96.4	62.07	42.3 - 79.3	2.22	0.25
>3.4	78.95	54.4 - 93.8	62.07	42.3 - 79.3	2.08	0.34
>3.5 *	78.95	54.4 - 93.8	68.97	49.2 - 84.7	2.54	0.31
>3.6	63.16	38.4 - 83.6	72.41	52.8 - 87.2	2.29	0.51
>3.7	57.89	33.5 - 79.7	75.86	56.5 - 89.7	2.40	0.56
>3.9	57.89	33.5 - 79.7	79.31	60.3 - 92.0	2.80	0.53
>4	52.63	28.9 - 75.5	79.31	60.3 - 92.0	2.54	0.60

Figura 10

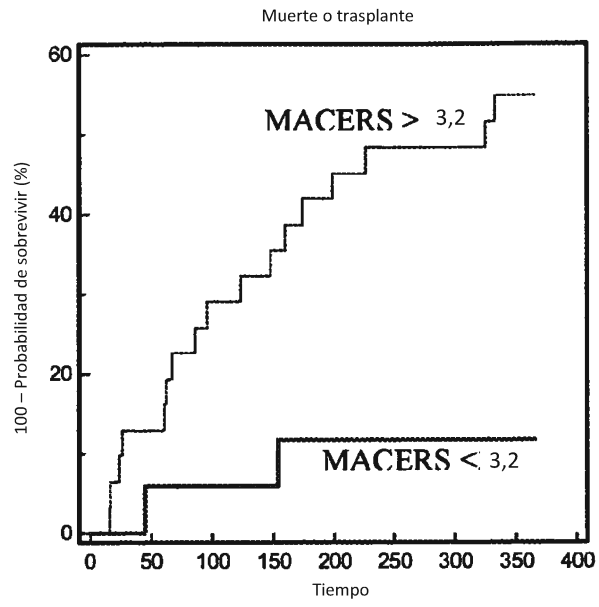


Figura 11

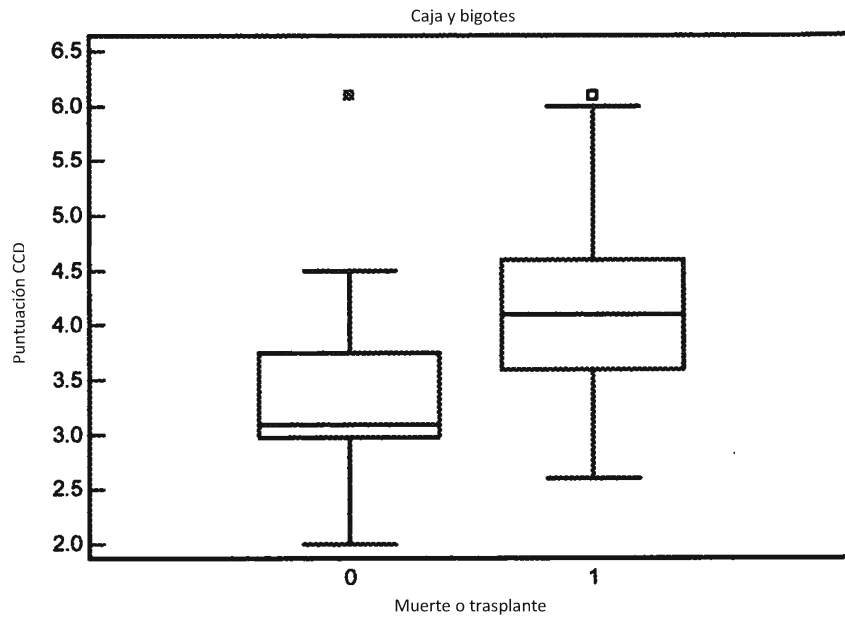


Figura 12

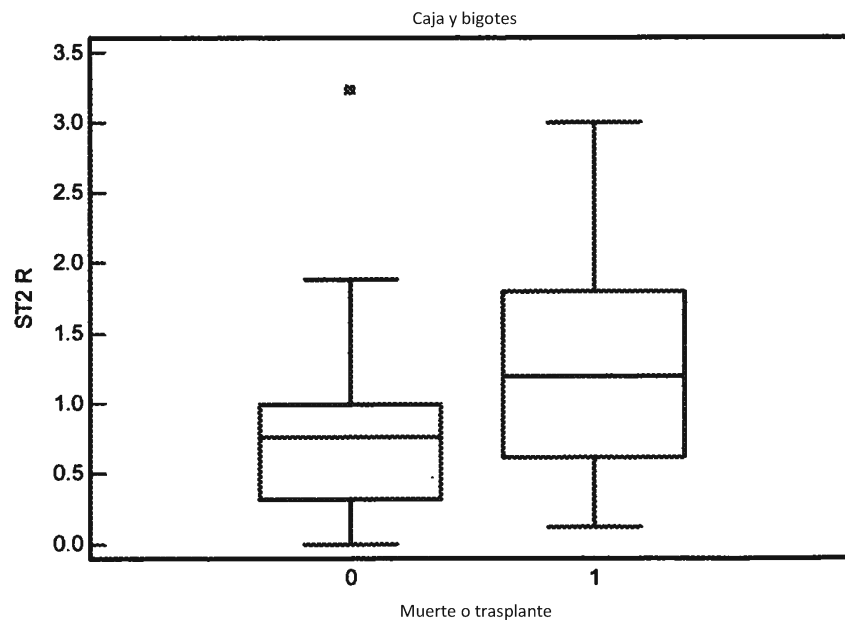


Figura 13

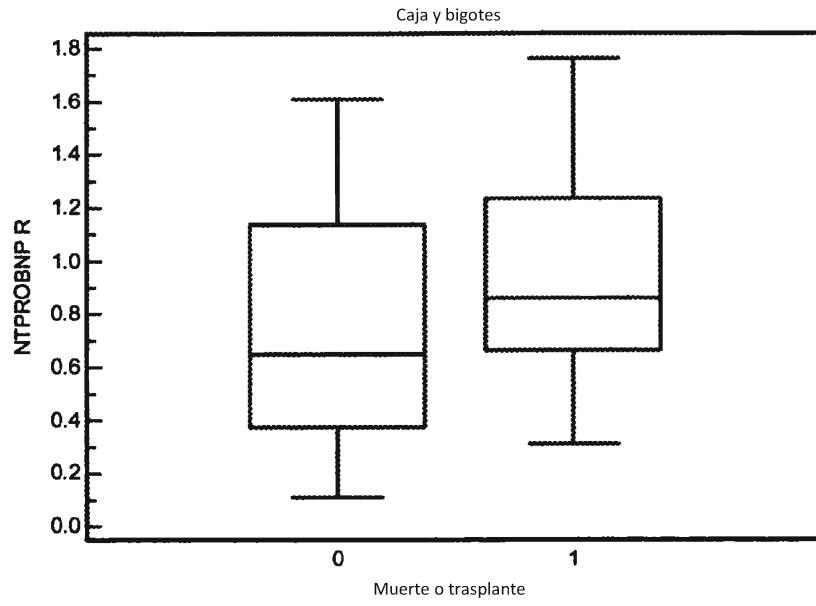


Figura 14

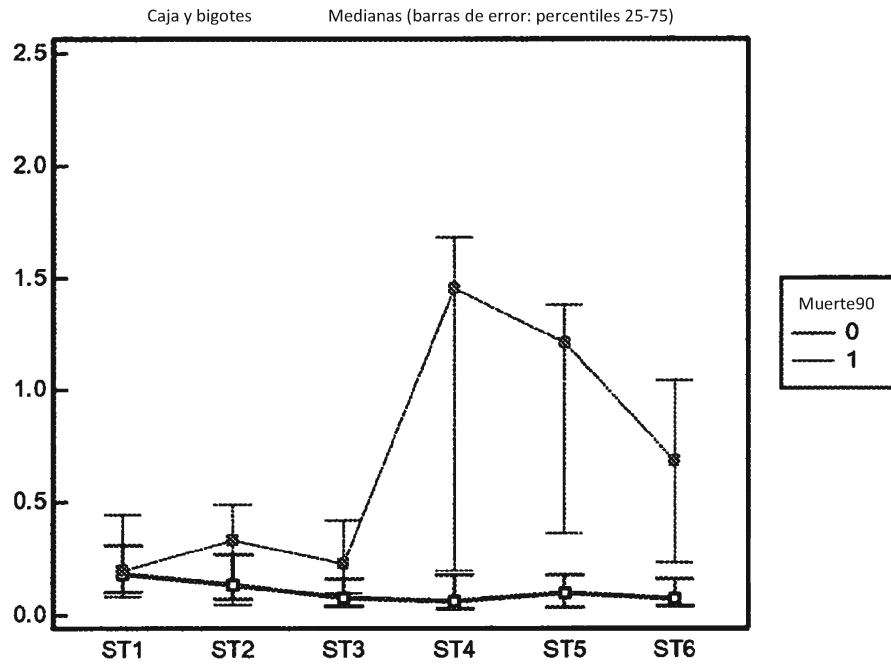


Figura 15

Medianas (barras de error: percentiles 25-75)

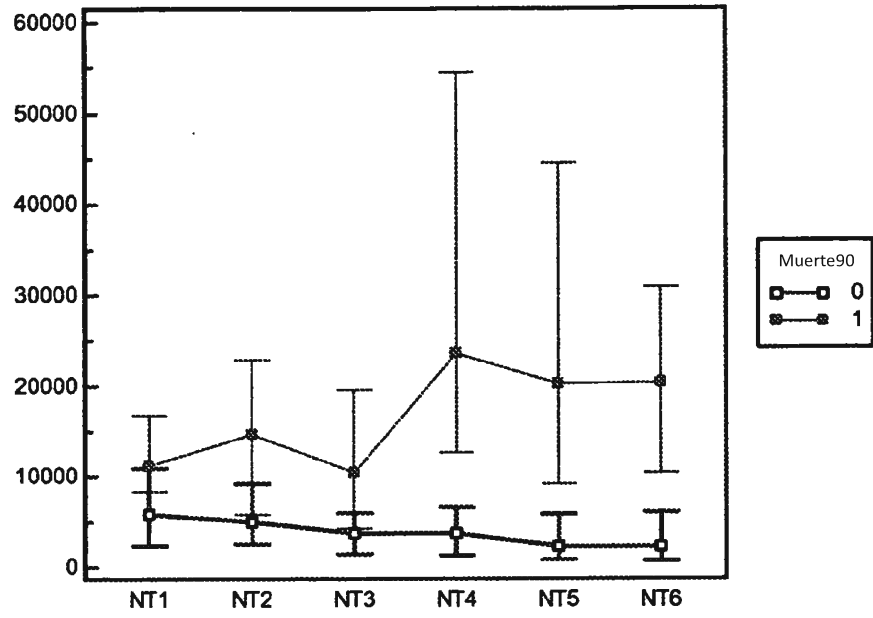


Figura 16

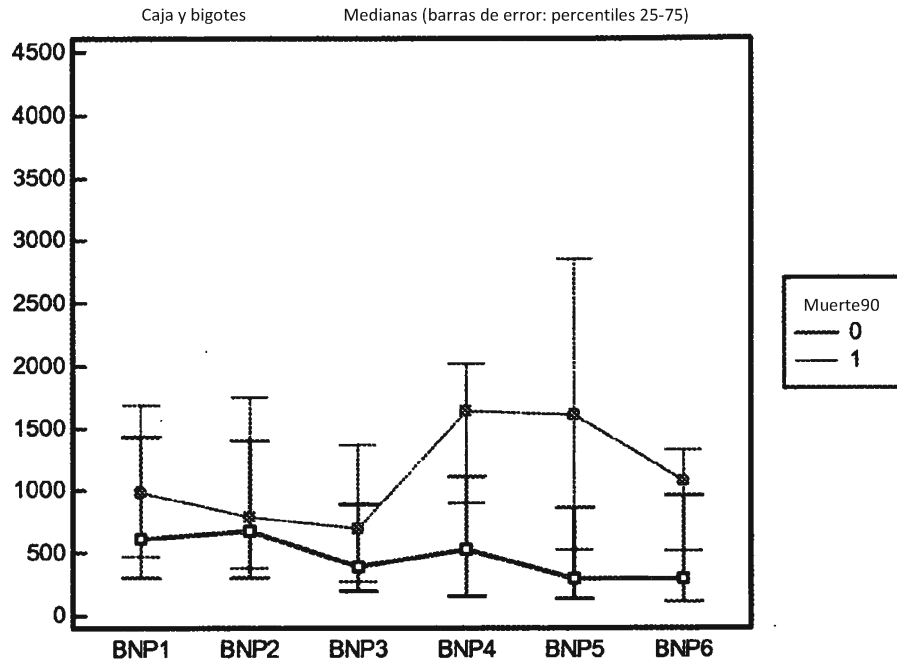


Figura 17

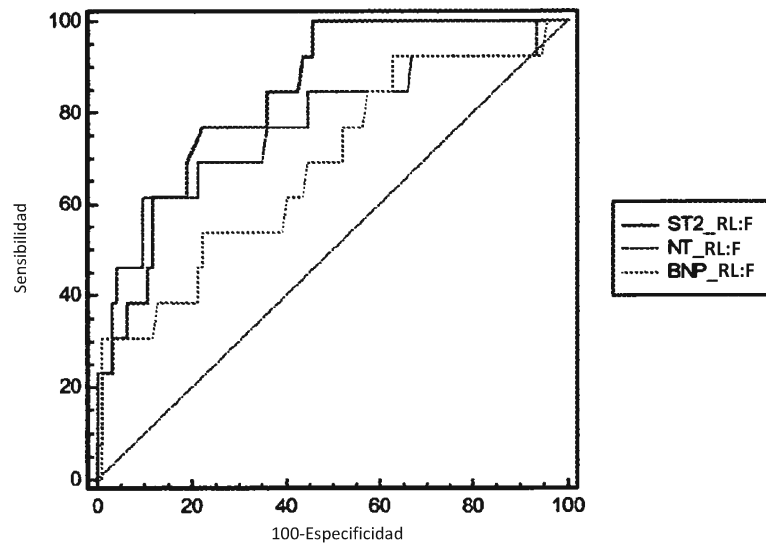




Figura 18

MACERS

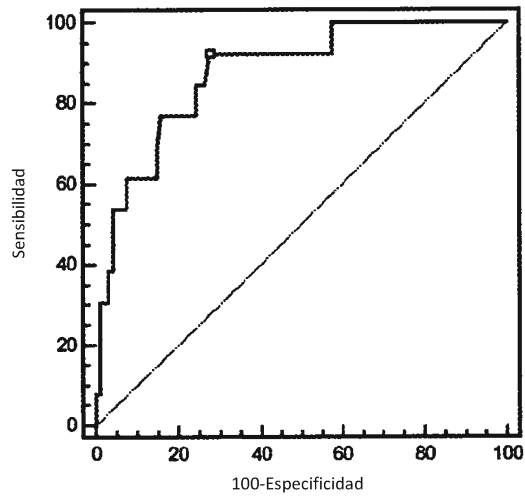


Figura 19

Caja y bigotes

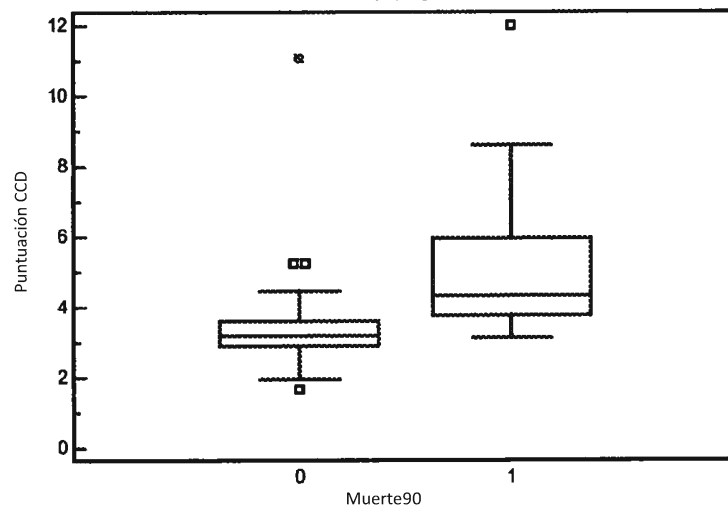


Figura 20

