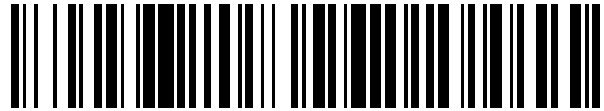


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 169**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2007 E 12152464 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2482078**

54 Título: **Diagnóstico de enfermedad cardiovascular**

30 Prioridad:

01.05.2006 US 796912 P

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

11.04.2016

73 Titular/es:

**CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
140 West 57th, Suite 3B
New York, New York 10019, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 169 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de enfermedad cardiovascular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la detección de insuficiencia cardíaca y embolia pulmonar en individuos con un índice de masa corporal (IMC) alto y en aquellos con la función renal alterada.

Antecedentes

10 Se ha demostrado que los niveles de péptidos natriuréticos, como el péptido natriurético de tipo B (BNP) y BNP N-terminal-pro (NT-proBNP) son diagnósticos de enfermedades cardiovasculares (Clerico y Erndin, Clin. Chem. 50:33-50 (2004)). No obstante, se sabe y acepta en el campo que algunos sujetos presentan niveles de péptido natriurético menores de lo esperado con respecto a un sujeto "normal" para el mismo nivel de enfermedad. El mecanismo exacto de este fenómeno no se sabe. Estos sujetos incluyen personas con la 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)), y personas con sobrepeso (índice de masa corporal (IMC) de 25-29) u obesos (IMC \geq 30) (Krauser y col., Am. Heart J. 149(14):744-50 (2005); McCord y col., Arch. Intern. Med. 164 (20); 2247-52 (2004)).

Sumario

15 Un procedimiento in vitro de diagnóstico de una enfermedad cardiovascular (ECV) en un sujeto con un índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 25 o la función renal alterada, comprendiendo el procedimiento:

20 determinar el índice de masa corporal del sujeto (IMC) y, si el IMC del sujeto es superior o igual a 25, seleccionar al sujeto, o evaluar la función renal de un sujeto y, si el sujeto presenta la función renal alterada, seleccionar al sujeto; y
 determinar los niveles de BNP y de ST2 soluble en una muestra biológica del sujeto seleccionado;
 en los que el nivel de BNP y de ST2 soluble indica si el sujeto tiene una ECV.

25 La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que, al contrario que los péptidos natriuréticos (NP), el biomarcador ST2 (también conocido como receptor de interleucina 1 de tipo 1 (IL1RL1)) no se ve afectado por el índice de masa corporal (IMC) alto ni por la función renal alterada y, por tanto, proporciona un mejor pronóstico e información diagnóstica que los NP en sujetos con un (IMC) alto o la función renal alterada. Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen determinar si un sujeto tiene un IMC alto y/o insuficiencia renal y si el sujeto tiene una o ambas afecciones, seleccionar el sujeto y determinar los niveles de IL1RL1 y, opcionalmente, del BNP y/o dímero D en el sujeto. Estos procedimientos se pueden usar para diagnosticar enfermedades cardiovasculares (ECV), por ejemplo síndrome coronario agudo (SCA), insuficiencia cardíaca (IC) y embolia pulmonar (EP) en el sujeto, por ejemplo en sujetos con disnea.

30

Los inventores también describen procedimientos que incluyen determinar los niveles de IL-33 además de, o como alternativa a, determinar los niveles de ST2.

35 En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para diagnosticar enfermedades cardiovasculares (ECV), por ejemplo síndrome coronario agudo (SCA), insuficiencia cardíaca (IC) o embolia pulmonar (EP) en un sujeto que tiene un índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 25. Los procedimientos incluyen determinar el IMC del sujeto y si el IMC del sujeto es igual o superior a 25, seleccionar el sujeto y determinar los niveles de ST2 y los niveles del BNP u opcionalmente del dímero D, en la sangre, plasma o suero del sujeto. La relación entre los niveles de ST2 y un nivel de referencia de ST2, por ejemplo un nivel de referencia que representa un nivel de sfST2 en un sujeto que no tiene ECV indica si el sujeto tiene ECV. Como se describe en el presente documento, si los niveles de BNP del sujeto son inferiores a 500 pg/ml, por ejemplo 100-500 pg/ml, y los niveles del dímero D son inferiores a 500 μ g/l, la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2, por ejemplo un nivel de referencia que representa un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene IC, indica si el sujeto tiene IC. Como se describe en el presente documento, si el nivel de BN del sujeto es inferior a 100 μ g/l y el dímero D es 500-4000 μ g/l, la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2, por ejemplo nivel de referencia que representa un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene EP, indica si el sujeto tiene EP.

40

45

50 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para diagnosticar enfermedad cardiovascular (ECV), por ejemplo síndrome coronario agudo (SCA), insuficiencia cardíaca (IC) y embolia pulmonar (EP) en un sujeto que tiene la función renal alterada. Los procedimientos incluyen evaluar la función renal del sujeto y si el sujeto tiene la función renal alterada, seleccionar el sujeto y determinar un nivel de ST2 y un nivel de BNP y opcionalmente del dímero D, en la sangre, plasma o suero del sujeto. La relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2, por ejemplo un nivel de referencia que representa un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene ECV, indica si el sujeto tiene ECV. Como se describe en el presente documento, si el nivel de BNP del sujeto es inferior a 500 pg/ml, por ejemplo 100-500 pg/ml, y el nivel del dímero D es inferior a 500 μ g/l, la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2, por ejemplo nivel de referencia que representa un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene IC, indica si el sujeto tiene IC. En algunas realizaciones, el nivel de BNP es inferior a 100 pg/ml y el nivel de dímero D es

55

500-4000 μ g/ml, la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2, por ejemplo un nivel de referencia que representa un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene EP, indica si el sujeto tiene EP.

Como se describe en el presente documento, el nivel de referencia representa un nivel en un sujeto que no tiene ECV, por ejemplo no tiene SCA, IC y/o EP. En algunas realizaciones, por ejemplo en las que el nivel de biomarcador de ST2 se mide usando un inmunoensayo, por ejemplo un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), por ejemplo como se ha descrito en el Ejemplo 1, el nivel de referencia es de aproximadamente 0,2 a 0,3 ng/ml, por ejemplo el nivel puede ser de 0,20, 0,23, 0,25, 0,27 o 0,29 ng/ml de suero y los valores superiores al nivel indican la presencia de ECV, por ejemplo SAC, IC y/o EP. 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. No obstante, los números específicos citados en el presente documento se interpretarán como equivalentes a los correspondientes números generados usando otras técnicas analíticas.

En general, determinar un nivel de ST2, BNP y/o dímero D en un sujeto incluye obtener una muestra biológica del sujeto, poner en contacto composiciones de unión con la muestra, en las que las composiciones de unión se unen específicamente a ST2, BNP y dímero D, y medir o determinar la unión específica de la composición de unión a la muestra. Las composiciones de unión pueden ser, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de ST2, BNP y el dímero D (p. ej., un Ac anti-ST2, un Ac anti-BNP y un Ac anti-Dímero D) o sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente a polinucleótidos de ST2, BNP y dímero D (p. ej., una sonda específica de ST2, una sonda específica de BNP y una sonda específica de dímero D).

Los procedimientos también pueden incluir determinar los niveles de uno o más biomarcadores adicionales, por ejemplo NT-proANP, proANP, ANP, troponina, CRP, creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de la función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana.

En algunas realizaciones, determinar si el sujeto tiene la función renal alterada incluye determinar la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o los niveles de creatinina en suero. El sujeto tiene alteración leve, moderada o grave de la función renal si tienen una TGF o un nivel de creatinina en suero en la Tabla 1:

Tabla 1

| Grado | TFG (ml/minuto) | Creatinina en suero (μmol/litro) |
|-----------------|------------------------|--|
| Leve | 20-50 | 150-300 |
| Moderado | 10-20 | 300-700 |
| Grave | < 10 | > 700 |

En el presente documento también se proporcionan kits para diagnóstico de enfermedad cardiovascular (ECV), que incluyen tres anticuerpos diferentes que se unen específicamente a polipéptidos de ST2, BNP y dímero D, respectivamente, o a tres sondas de ácido nucleico diferentes que se unen específicamente a los ácidos nucleicos que codifican ST-2, BNP y dímero D, respectivamente, e instrucciones de uso en un procedimiento descrito en el presente documento.

“Regulado por incremento”, como se usa en el presente documento, se refiere a un incremento de la expresión de un gen y/o su polipéptido codificado. “Incremento de la expresión” se refiere a incrementar (es decir, hasta un nivel detectable) la replicación, transcripción y/o traducción de IL-33, ya que la regulación por incremento de cualquiera de estos procedimientos tiene un incremento de la concentración/cantidad del polipéptido codificado por el gen. Por el contrario, “regulación por disminución” o “expresión disminuida”, como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción de la replicación, transcripción y/o traducción del gen de la IL-33y/o su polipéptido codificado. La regulación por incremento o la regulación por disminución de la expresión génica puede determinarse directamente detectando un incremento o disminución, respectivamente, del nivel de ARNm del gen o del nivel de expresión proteica del polipéptido codificado por el gen, usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tal como hibridación de ácido nucleico o procedimientos de detección de anticuerpos, respectivamente, y en comparación con los controles. “Expresión”, como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión de ácido nucleico y/o polipéptido.

Como se usa en el presente documento, un “sujeto” es un mamífero, por ejemplo un ser humano. En todas las realizaciones se pueden usar ácidos nucleicos, polipéptidos humanos y sujetos humanos.

Como se usa en el presente documento, una “muestra biológica” incluye una o más de sangre, suero, plasma, orina y tejido corporal. En algunas realizaciones, una muestra es una muestra de sangre o suero.

A menos que se defina en contra, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Los

procedimientos y materiales se describen en el presente documento para usar en la presente invención; también se pueden usar otros procedimientos adecuados y materiales conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

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

Descripción de los dibujos

10 La FIG 1 es una curva de características operativas del receptor (ROC) del segundo estudio prospectivo, aleatorizado de evaluación de la supervivencia con amlodipina (PRAISE-2), que ilustra las características de la población del estudio, edad, peso, altura, IMC, fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF), creatinina, ST2t1, norepinefrina (NEt1), epinefrina (Et1), dopamina (DAt1), angiotensina (ANGt1), malondialdehído (MDAt1), adrenolutina (ADRt1), ANPt1 y BNPt1. "t1" se refiere a un nivel tomado una primera vez.

15 La FIG. 2 es una curva ROC para BNP y la proporción de ST2 Ratio en el estudio PRAISE-2; las dos medidas tienen una AUC similar, siendo la de BNP algo mayor.

La FIG 3 es una curva ROC para la utilidad pronóstica de BNP y la proporción ST2 en individuos de IMC alto, en este caso la proporción de ST2 tiene una AUC mayor.

20 La FIG. 4 es un gráfico de cajas de los niveles de ST2 en sujetos con varios IMC (< 25, 25-29, y \geq 30), que muestra que no existe una diferencia significativa en los niveles de ST2 entre los IMC.

Las FIG. 5A-B son gráficos de cajas que ilustran la Tasa de Filtración Glomerular (GFR, 5A) media y los niveles de ST2 (5B) en una población de sujetos con insuficiencia renal de moderada a grave.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que ilustra la distribución de los niveles de ST2 en la población descrita en el Ejemplo 3, que muestra que la gran mayoría de sujetos en la población tiene niveles de ST2 inferiores a 0,2 ng/ml.

Descripción detallada

25 La evaluación clínica de la enfermedad cardiovascular (ECV) usando péptidos natriuréticos (NP) en sujetos con un índice de masa corporal (IMC) alto o la función renal alterada se ve complicado por el hecho de que estos sujetos tienen niveles de péptido natriurético inferiores a lo esperado para un sujeto "normal" para el mismo nivel de enfermedad. El mecanismo exacto de este fenómeno no se sabe. No obstante, una teoría, sin desear que sea limitante, es que los niveles de NP menores en sujetos obesos y con sobrepeso y en sujetos con la función renal alterada pueden estar relacionados con los mecanismos de eliminación para los NP, que pueden tener un

30 componente tanto renal como epitelial. El ST2, aunque posiblemente se produzca de un modo similar a los NP, no sufren estas limitaciones. Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen el uso de ST2 (y/o de IL-33, el ligando de ST2) en estos sujetos especiales, para los que los NP pueden proporcionar información errónea.

Metodología general

35 Los procedimientos generales para usar los niveles de ST2 para diagnóstico se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. 2004/0048286 de Lee y col.

Los procedimientos descritos en el presente documento son particularmente útiles en poblaciones de sujetos para los que los NP son menos útiles en el diagnóstico y pronóstico de la ECV. Estos sujetos incluyen los que tienen un IMC alto, por ejemplo sujetos con sobrepeso (IMC de 25-29) o sujetos obesos (IMC \geq 30). Por tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar el IMC de un sujeto y, si el sujeto tiene sobrepeso o es obeso, seleccionar al paciente (p. ej., seleccionar los sujetos en base a su IMC). Estos sujetos también incluyen los que presentan alteración renal. Por tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos incluyen determinar si un sujeto tiene la función renal alterada y si el sujeto tiene la función renal alterada, seleccionar al paciente.

40

En general, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen evaluar los niveles de ST2 en una muestra biológica (p. ej., sangre, suero, plasma, orina o muestra de tejido corporal) y, opcionalmente, de BNP y/o del dímero D en un sujeto, por ejemplo un mamífero, por ejemplo un ser humano. Estos niveles proporcionan información sobre la presencia de ECV, por ejemplo IC y/o EP, en un sujeto. Por ejemplo, un diagnóstico de ECV, por ejemplo IC en un sujeto con un nivel ambiguo de BNP, se puede confirmar mediante la presencia de niveles elevados de ST2 y bajos del dímero D. Un diagnóstico de ECV, por ejemplo EP en un sujeto con un nivel ambiguo del dímero D, se puede confirmar mediante la presencia de niveles elevados de ST2 y bajos de BNP.

45

50

La evaluación de los niveles circulantes de ST2, BNP o dímero D en un sujeto normalmente incluye una muestra biológica del sujeto, por ejemplo suero o sangre. Los niveles de ST2, BNP y dímero D en la muestra se pueden determinar 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 de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA). Como alternativa, los niveles de ARNm de ST2, BNP y dímero D se pueden medir, de nuevo usando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento, por ejemplo mediante PCR cuantitativa y análisis de transferencia Northern.

55

Un anticuerpo que “se une específicamente” a un antígeno, se une preferentemente al antígeno en una muestra que contiene otras proteínas. El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o parte inmunológicamente activa de la misma, es decir una porción de unión a antígeno. Ejemplos de partes inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina incluyen los fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que se pueden generar tratando el anticuerpo con una enzima como, por ejemplo, pepsina. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, recombinante, por ejemplo quimérico o humanizado, completamente humano, no humano, por ejemplo murino, monoespecífico o monocatenario. En algunas realizaciones tiene una función efectora y puede fijar el complemento.

Una “sonda” es un ácido nucleico que tiene una longitud de al menos 10, y menos de 200 (habitualmente menos de aproximadamente 100 o 50) pares de bases. Una sonda que “se une específicamente a” un ácido nucleico diana hibrida con la diana en condiciones de rigurosidad alta. Como se usa el presente documento, la expresión “hibrida en condiciones de rigurosidad alta” describe condiciones de hibridación y lavado. Como se usa el presente documento, condiciones de rigurosidad alta son fosfato sódico 0,5M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados de 0,2X de SSC, SDS al 1% a 65 °C. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para realizar ensayos de hibridación de ácido nucleico y se pueden encontrar en Ausubel y col., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

La detección se puede facilitar por acoplamiento (p. ej., pegar físicamente) del anticuerpo o la sonda a una sustancia detectable (p. ej., marcaje de anticuerpo). Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, puntos cuánticos o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acurina, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

Se pueden usar ensayos diagnósticos con matrices biológicas, tales como células vivas, extractos celulares, lisados celulares, células fijadas, cultivos celulares, fluidos corporales o muestras forensicas. Anticuerpos conjugados para fines diagnósticos o kits incluyen anticuerpos acoplados a pigmentos, isótopos, enzimas y metales, véase, por ejemplo, Le Doussal y col., New Engl. J. Med. 146:169-175 (1991); Gibellini y col., J. Immunol. 160:3891-3898 (1998); Hsing y Bishop, New Engl. J. Med. 162:2804-2811 (1999); Everts y col., New Engl. J. Med. 168:883-889 (2002). Existen varios formatos de ensayo, tales como radioinmunoensayos (RIA), ELISA y lab en un chip (patente de EE.UU. nº 6.176.962 y 6.517.234).

En los procedimientos descritos en el presente documento se pueden usar técnicas conocidas en bioquímica y biología molecular (véase, por ejemplo, Maniatis y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook y Russell, Molecular Cloning, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Wu, Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif (1993); y Ausbel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley y Sons, Inc, New York, N.Y. (2001)).

Una vez que se ha determinado el nivel de ST2, el nivel se puede comparar con un nivel de referencia o correlacionar directamente con un valor conocido que corresponde a la presencia o ausencia de ECV. Por ejemplo, el nivel de referencia representará un nivel umbral, por encima del cual el sujeto tiene ECV, por ejemplo SCA, PE o IC, y/o tiene una gravedad dada de una ECV, por ejemplo SCA, IC o EO, por ejemplo enfermedad grave. El nivel de referencia escogido puede depender de la metodología usada para medir los niveles de ST2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando los niveles circulantes de ST2 solubles se determinan usando un inmunoensayo, por ejemplo como se ha descrito en el presente documento, el nivel de referencia es de aproximadamente 0,2 a 0,3 ng/ml, por ejemplo 0,20, 0,23 o 0,29 ng/ml de suero, y un nivel de ST2 superior al nivel de referencia indica que el sujeto tiene ECV, por ejemplo SCA, EP o IC, y/o tiene ECV grave, por ejemplo SCA, EP o IC grave; estos niveles de referencia se aplican cuando los niveles se determinan usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 del presente documento. Por ejemplo, el nivel de referencia es un intervalo de niveles.

Los procedimientos descritos en el presente documento incluyen determinar los niveles de IL-33 además de, o como alternativa a, los niveles de ST2. Por ejemplo, se determinan los niveles tanto de ST2 como de IL-33 y la información de la comparación de ambos biomarcadores con sus respectivos niveles de referencia proporciona una información acumulada sobre la presencia de ECV y/o la presencia de ECV grave en el sujeto. Por ejemplo, la proporción entre ST2 e IL-33 puede determinarse y la proporción compararse con una proporción de referencia que representa una proporción umbral por encima de la cual el sujeto tiene ECV y/o tiene ECV grave. Como alternativa o además de, la presencia y/o niveles de los complejos IL33/ST2 se pueden determinar y comparar con un nivel de referencia para proporcionar información sobre la presencia de ECV, por ejemplo SCA, EP o IC, en un sujeto, por ejemplo los niveles del complejo superiores a un umbral seleccionado indicaría que el sujeto tiene ECV, por ejemplo SCA, EP o IC.

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen el uso de procedimientos diagnósticos adicionales. Se puede

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

Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento pueden también incluir medir los niveles de ST2, opcionalmente de BNP y/o dímero D, y uno o más biomarcadores adicionales, por ejemplo biomarcadores que ayudan al diagnóstico del sujeto. Como ejemplo, para un sujeto con dolor torácico o disnea se pueden medir los biomarcadores indicativos de enfermedad cardíaca o cardiovascular, por ejemplo troponina cardíaca (cTn), por ejemplo cTnI o cTnT, NT-proBNP, proBNP, NT-proANP, proANP, y/o ANP; como alternativa, o además de, se pueden medir biomarcadores adicionales de enfermedad pulmonar. Por tanto, en sujetos que presentan con síntomas que incluyen IM en sus diagnósticos diferenciales, los procedimientos pueden incluir la medición de niveles de cTnI, para determinar si el sujeto está sufriendo un IM. Un experto en la técnica apreciará que hay una serie de procedimientos diagnósticos adicionales que se pueden usar, en función de la situación y del estado del sujeto.

En el presente documento también se incluyen kits que incluyen un reactivo para la detección de los polipéptidos o ácido nucleico de ST2. BNP y dímero D, por ejemplo anticuerpos (es decir, anticuerpos que se unen específicamente a uno de los polipéptidos de ST2, BNP y dímero D), o sondas de ácido nucleico (es decir, sondas que son complementarias de todo o parte de uno de los ácidos nucleicos de ST2, BNP y dímero D) e instrucciones de uso en un procedimiento descrito en el presente documento.

Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en el diagnóstico de sujetos con ECV, por ejemplo SCA, EP o IC. En los procedimientos descritos en el presente documento, si un sujeto con sobrepeso u obeso (p. ej., un sujeto con un IMC de 25-29 o 30 o superior) tiene niveles ambiguos, por ejemplo bajos o moderados, de BNP (es decir < 500 pg/ml de suero), de dímero D inferiores a 500 µg/l en plasma y elevados de ST2 (p. ej., niveles por encima de una referencia, por ejemplo 0,2 ng/ml de suero), se puede diagnosticar al sujeto ECV, por ejemplo IC, y se le puede tratar en consecuencia, por ejemplo con intervención quirúrgica o farmacéutica, y/o cambio en el estilo de vida, a pesar de los niveles bajos o moderados de BNP.

En los procedimientos descritos en el presente documento, si un sujeto (p. ej., un sujeto con un IMC de 25-29 o 30 o superior) tiene niveles bajos de BNP (es decir < 100 pg/ml en suero), niveles ambiguos del dímero D, p. ej., 500-4000 µg/l en plasma, y elevados de ST2 (p. ej., niveles por encima de una referencia, por ejemplo 0,2 ng/ml de suero), se puede diagnosticar al sujeto ECV, por ejemplo EP, y se le puede tratar en consecuencia, por ejemplo con terapia anticoagulante, a pesar de sus niveles ambiguos de dímero D.

ST2/Receptor de la interleucina 1 de tipo 1 (IL1RL1)

El gen de SR2 es un miembro de la familia de receptores de la interleucina 1, cuyo producto proteico existe en forma transmembrana así como en forma de 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., *Hybridoma* 19(2):151-9 (2000)). Recientemente se ha descrito que el ST2 está marcadamente regulado por incremento 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 aquéllos con IC grave crónica (Weinberg y col., *Circulation* 107(5):721-6 (2003)) así como en aquéllos con infarto de miocardio agudo (IM) (Shimpo y col., *Circulation* 109(18):2186-90 (2004)).

Se piensa que la forma transmembrana de ST2 desempeña un papel en la modulación de las respuestas de las células T colaboradoras de tipo 2 (Lohning y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(12):6930-5 (1998); Schmitz y col., *Immunity* 23(5):479-90 (2005)), y puede desempeñar 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 por incremento en fibroblastos con crecimiento estimulado (Yanagisawa y col., 1992, citado anteriormente). Los datos experimentales sugieren que el gen de ST2 está marcadamente regulado por incremento en estados de estiramiento de miocitos (Weinberg y col., 2002, citado anteriormente) de un modo análogo a lo que ocurre en la inducción del gen del BNP (Bruneau y col., *Cardiovasc. Res.* 28(10):1519-25 (1994)).

Tominaga, *FEBS Lett.* 258:301-304 (1989), aisló genes murinos específicamente expresados por estimulación del crecimiento en células BALB/c-3T3; denominaron uno de estos genes St2 (para el gen 2 expresado por estimulación del crecimiento). El gen de ST2 codifica dos productos proteicos: ST2 (IL1RL1), que es una forma secretada soluble; y ST2L, un receptor transmembrana que es muy similar a los receptores de la interleucina 1. El Comité de Nomenclatura HUGO designó el homólogo humano de ST2, cuya clonación se describió en Tominaga et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1171:215-218 (1992), como receptor de interleucina 1 de tipo 1 (IL1RL1). Los dos términos se usan de forma intercambiable en el presente documento.

La secuencia del ARNm de la isoforma soluble más corta de ST2 se puede encontrar en GenBank con número de registro NM_003856.2 y la secuencia polipeptídica está en GenBank con número de registro NP_003847.2; la secuencia del ARNm de la forma más larga del ST2 humano está en GenBank con número de registro

NM_016232.4; la secuencia polipeptídica está en NP_057316.3. Se dispone de información adicional en las bases de datos públicas en GenID: 9173, MIM ID # 601203 y UniGene No. Hs.66. En general, en los procedimientos descritos en el presente documento se mide la forma soluble del polipéptido ST2.

5 En la técnica se conocen procedimientos para detectar y medir el ST2, por ejemplo como se describe en las publicaciones de patente de EE.UU. nº 2003/0124624, 2004/0048286 y 2005/0130136. Los kits para medir el polipéptido ST2 también están disponibles comercialmente, por ejemplo el kit de ELISA para ST2 fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), nº 7638. Además, en la publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0250156 se describen procedimientos para medir el ST2 y otros biomarcadores.

10 Por ejemplo, el nivel de ST2 se determina una vez, por ejemplo en la presentación. En algunas realizaciones, el nivel de ST2 se determina a uno o más de 2, 4, 6, 8, 12, 18 y/o 24 horas, y/i 1-7 días después del inicio de los síntomas.

15 Por ejemplo, el nivel de ST2 se determina más de una vez; en este caso, se puede usar la medición más elevada. En algunas realizaciones en las que el nivel de ST2 se determina más de una vez se puede usar el nivel más elevado o se puede usar el cambio en los niveles. Los niveles de ST2 también se pueden determinar múltiples veces para evaluar la respuesta de un sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, se puede comparar un nivel de ST2 tomado tras la administración de un tratamiento, por ejemplo una o más dosis o ciclos de un tratamiento, con los niveles de ST2 antes de iniciar el tratamiento, por ejemplo un nivel basal. El cambio en los niveles de ST2 indicaría si el tratamiento era eficaz; por ejemplo, una reducción de los niveles de ST2 indicaría que el tratamiento era eficaz.

20 Por ejemplo, los procedimientos incluyen determinar la identidad de la secuencia de nucleótidos en RefSNP ID:rs1041973.

Interleucina-33 (IL-33)

En los procedimientos descritos en el presente documento se pueden medir los niveles de IL-33 en lugar de o además de los niveles de ST2.

25 Recientemente se ha identificado a la IL-33 como el ligando de ST2 y se ha descrito la presencia de mayores niveles de IL-33 en varios trastornos inflamatorios (véase Schmitz y col., Immunity 23(5):479-90 (2005); publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0203046). También se puede determinar la proporción entre ST2 e IL-33.

30 La proteína IL-33 se expresa en forma de molécula inactiva, pre-IL-33, que se activa tras la escisión producida por la caspasa 1, que tiene como resultado un péptido de IL-33 activo así como el producto peptídico de la escisión, pro-IL-33. Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen medir uno, dos o las tres formas de IL-33 madura, pre-IL33 y/o pro-IL33, todas ellas incluidas en el término "IL-33".

35 La secuencia de ácido nucleico de IL-33 se puede encontrar en GenBank con número de registro NM_033439.2, y la secuencia de polipéptidos está en GenBank con número de registro NP_254274.1. Se dispone de información adicional en las bases de datos públicas en GenID: 90865, MIM ID # *608678, y UniGene No. Hs.348390, la IL-33 también se conoce como marco de lectura abierto 26 en el cromosoma 9 (C9ORF26); factor nuclear de vénulas endoteliales altas (NFHEV) e interleucina 33. Véase también Backkevold y col., Am. J. Path. 163: 69-79 (2003).

Procedimientos para medir los niveles del polipéptido IL-33 y de ácido nucleico se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Schmitz y col., Immunity 23(5):479-90 (2005); publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0203046.

Índice de Masa Corporal (IMC)

40 La obesidad influye en la expresión de BNP en la IC crónica. Se sabe que hay una relación inversa significativa entre el índice de masa corporal (IMC) y los niveles de BNP.

El IMC se determina mediante el peso en relación con la altura y equivale al peso de la persona en kilogramos dividido por la altura en metros cuadrados ($IMC = \text{kg/m}^2$). En la Tabla 2 se proporcionan las interpretaciones aceptadas.

Tabla 2

| Categoría | IMC |
|-------------|-----------|
| Bajo peso | ≤ 18,5 |
| Peso normal | 18,5-24,9 |
| Sobrepeso | 25-29,9 |
| Obeso | ≥ 30 |

Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir determinar la altura de un sujeto, determinar el peso de un sujeto y calcular el IMC a partir de los valores determinados de este modo. Como alternativa, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir revisar el historial médico de un sujeto para determinar su IMC.

- 5 En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir seleccionar sujetos que tienen un IMC de 30 o superior (es decir, sujetos obesos).

Función renal

Las medidas de la función renal pueden incluir resultados de creatinina en suero, así como la tasa de filtración glomerular (TFG) estimada (véase, por ejemplo, Levey y col., Ann. Intern. Med. 130(6):461-70 (1999)).
10 Normalmente, la alteración renal se clasifica en tres grados, que se muestran en la Tabla 3,

Tabla 3

| Grado | TFG (ml/minuto) | Creatinina en suero ($\mu\text{mol/litro}$) |
|----------|-----------------|---|
| Leve | 20-50 | 150-300 |
| Moderado | 10-20 | 300-700 |
| Grave | < 10 | > 700 |

Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir determinar los niveles de creatinina en suero de un sujeto y la TFG. Como alternativa, los procedimientos descritos en el presente documento pueden
15 incluir revisar el historial médico de un sujeto para determinar sus niveles de creatinina en suero y/o la TFG.

BNP

El péptido natriurético de tipo B (BNP) es un marcador de insuficiencia cardíaca. Los niveles de BNP se puede determinar en, por ejemplo, sangre entera o suero, usando la metodología estándar. Por ejemplo, se dispone
20 comercialmente de una serie de kits de ensayo, por ejemplo el Triage BNP Test (Biosite, inc., San Diego, CA), un ensayo en el lugar de la atención en sangre entera o plasma y producir resultados en aproximadamente 15 minutos; un inmunoensayo de tipo sándwich quimioluminiscente (Bayer HealthCare Diagnostics, Tarrytown, NY) para BNP que es nm en las plataformas ADVIA Centaur y ACS:180; un inmunoensayo basado en micropartículas (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) para BNP que se realiza en la plataforma AxSYM; y un ensayo inmunoenzimático quimioluminiscente (Biosite, Inc., San Diego, CA) para BNP que se realiza en las siguientes plataformas Beckman
25 Coulter: Access, Access 2, Synchron LXI y the UniCel DXI. Existe un ensayo electroquimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) para medir el NT-proBNP.

Los intervalos de referencia para BNP y NTproBNP varían en función de una serie de factores. Los siguientes intervalos son para usar cuando los niveles de BNP se miden usando un procedimiento de tipo ELISA y un experto en la técnica podrá determinar qué niveles obtenidos usando otros procedimientos son equivalentes. Si el nivel de
30 BNP es > 500 pg/ml, la IC es muy probable. Los niveles de BNP de 100-500 pg/ml a menudo se describen como una "zona gris", en la que el diagnóstico es menos seguro. En sujetos delgados, si los niveles de BNP < 100 pg/ml, es improbable la IC, no obstante, la obesidad influye sobre la expresión de BNP en la IC crónica (Mehra y col., J Am Cell Cardiol. 43(9):1590-1595 (2004)), por lo que niveles < 100 pg/ml no descartan la insuficiencia cardíaca en sujetos obesos (Sliver y col., Cong. Heart Fail. 10(5 suppl. 3):1-30 (2004)).

35 Dímeros D

Un dímero D es un producto final estable de la degradación de la fibrina. Niveles mayores de dímeros D en sangre se asocian con mayor formación de fibrina y fibrinólisis y, por tanto, son diagnósticos de afecciones asociadas con estos procedimientos.

En la técnica se conocen procedimientos para determinar los niveles de dímero D en sangre. Entre los kits de
40 ensayo disponibles comercialmente se incluyen VIDAS D-Dimer Exclusion (bioMérieux, Durham, NC) un ELISA rápido ya automatizado; Minutex® D-dimer, Biopool Auto-Dimer™ (un ensato inmunoturbidimétrico automatizado para la lectura por los analizadores a longitudes de onda de 540 - 880 nm), MiniQuant™, AMAX Auto D-Dimer™ (ensayo automatizado del dímero D para instrumentos AMAX), y ensayos Accuclot D-Dimer™ (un ensayo semicuantitativo) (Trinity Biotech, Bray, Co. Wicklow, Irlanda); y el ensayo HemosIL™ D-Dimer (Instrumentation
45 Laboratory, distribuido por Beckman Coulter), un ensayo inmunoturbidimétrico completamente automatizado.

Niveles en plasma del dímero D superiores a 4000 $\mu\text{g/ml}$ se correlacionan considerablemente con la presencia de EP aguda y los niveles inferiores a 500 se pueden usar para descartar EP (véase, por ejemplo, Perrier y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 156(2):492-496 (1997)). Niveles en plasma del dímero D de 500-4000 $\mu\text{g/l}$ son más

ambiguos debido al número de afecciones que activan los procesos de coagulación y fibrinolítico.

Otros biomarcadores

5 Los procedimientos descritos en el presente documento también pueden incluir la medición de niveles de otros biomarcadores además de ST2 y/o IL-33. Biomarcadores adecuados incluyen NT-proBNP, proBNP, BNP, NT-proANP, proANP, ANP, troponina, CRP, creatinina, dímeros D (productos de degradación de fibrina reticulada cuyo nivel se eleva tras la formación de coágulos), BUN (nitrógeno ureico en sangre), enzimas de la función hepática, IL-6 y/o endotoxina bacteriana. En la técnica se conocen procedimientos para medir estos biomarcadores, véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. n° 2004/0048286 y 2005/0130136 de Lee y col.; Dhalla y co., Mol. Cell Biochem. 87:85-92 (1989); Moe y col., Am. Heart J, 139-587-95 (2000). Las enzimas de función hepática incluyen alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP) y bilirrubina total (BILT).

10 Por ejemplo, se determinan los niveles de ST2 y de uno o más biomarcadores adicionales, y la información de la comparación de los biomarcadores con sus respectivos niveles de referencia proporciona información acumulada sobre la presencia de ECV en el sujeto y/o el nivel de gravedad de ECV en el sujeto.

15 Ejemplos

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

Ejemplo 1: Ensayo ELISA de tipo sándwich

20 Este ejemplo usa el kit de ELISA de ST2 fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), n° 7638. Este kit es un ensayo ELISA de tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales para captura y detección. Este procedimiento está destinado para analizar una placa completa de muestras analizadas por duplicado con un factor de dilución de 1:3 y sigue minuciosamente el protocolo de los fabricantes. Los kits se almacenarán a 4 °C hasta su uso. El procedimiento descrito en este ejemplo está optimizado para suero o plasma recogido en tubos con anticoagulante citrato o EDTA. El plasma recogido en tubos con anticoagulante heparina no se usará en este ensayo, ya que la heparina se une a ST2 e inhibe la medición mediante este protocolo de ELISA. Las muestras de plasma o suero se pueden usar frescas o almacenadas congeladas. Este ensayo no se ve afectado de forma adversa por hasta 3 ciclos de congelación y descongelación de las muestras de plasma.

25 Los reactivos deberán prepararse frescos a partir de un kit nuevo inmediatamente antes de realizar los ensayos. Dejar el kit equilibrar hasta temperatura ambiente antes de usar. Los reactivos no tratados explícitamente más adelante son proporcionados listos para usar por el fabricante.

30 1. Solución de lavado- el fabricante suministra la solución de lavado como una solución concentrada 10X. Para hacer 1 litro de solución de lavado, diluir 100 ml del concentrado 10X proporcionado con 900 ml de agua destilada.

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

a. NOTA: este reactivo se deberá preparar durante la primera etapa de incubación del ensayo.

40 3. Reserva de calibración- reconstituir la proteína calibradora disolviendo la proteína liofilizada en la cantidad de agua destilada definida por el fabricante para este lote de fabricación, para dar una solución de reserva de 8 ng/ml. Esta especificación del volumen está incluida en la ficha del producto.

Preparación de patrones y muestras:

45 • Lo siguiente se preparará en tubos de polipropileno marcados de 1,5 ml para transferir a la placa de ensayo con el pipeteador P200.

Patrones:

La curva estándar se prepara fabricando diluciones en serie de 2 de la solución de reserva de 8 ng/ml.

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

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

a. Mezclar perfectamente pipeteando suavemente 3 veces tomando precauciones para no crear burbujas.

3. Usando la misma pipeta P1000 y una punta nueva para cada uno de los 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, por tanto no se transferirá la proteína de calibración a este pocillo.

5 a Ahora, los tubos S1-S6 y S8 tendrán 250 µl del reactivo y el tubo S7 tendrá 450 µl

Muestras

La placa se prepara de modo que cada muestra se analiza como su dilución 1:3 por duplicado. En la Tabla 4 a continuación se muestra un ejemplo de organización.

- 10 1. Marcar un tubo de polipropileno de 1,5 ml para cada muestra.
2. Usando una pipeta P200, transferir 160 µl del diluyente de ensayo a cada tubo.
3. Usando una pipeta P200, transferir 80 µl o suero o plasma de la muestra 1 al tubo 1. Mezclar cuidadosamente pipeteando 3 veces sin formar burbujas.
4. Continuar transfiriendo muestras a los tubos de muestras repitiendo la etapa 2 para cada muestra.

Procedimiento:

- 15 1. Usando la pipeta P200, transferir los patrones y las muestras de suero diluido rápidamente a la placa de ensayos de 96 pocillos.
 - a. Fijar la pipeta P200 para 100 µl
 - b. Transferir 100 µl de las diluciones de la curva estándar a cada una de las columnas 1 y 2 en la placa de ensayo
 - 20 c. Transferir 100 µl de cada una de las muestras de suero a la placa de ensayo en exactamente las mismas posiciones que se muestran en el mapa de la placa siguiente.
2. Cubrir la placa de ensayo con la tapa proporcionada a tal efecto e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- 25 3. Usando el autolavador de placas, lavar las placas 4 veces.
4. Detector: Usando la pipeta multicanales de 8 canales transferir 100 µl de la solución de detección a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
 - a. NOTA: este reactivo se deberá preparar durante la primera etapa de incubación.
 - b. NOTA: usar un vaso de reactivos desechable para esta adición de reactivo. usar SIEMPRE un vaso de reactivos desechable fresco para cada reactivo. No es necesario cambiar las puntas de la pipeta durante esta etapa.
 - 30
5. Lavar la placa como en la etapa 3
6. Sustrato: usando la pipeta multicanales de 8 canales transferir 100 µl del sustrato a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - a. El fabricante del reactivo del sustrato lo proporciona listo para usar.
 - 35
7. Terminación: Al finalizar la incubación del sustrato usando la pipeta de múltiples canales de 8 canales, transferir 100 µl de la solución de terminación a cada pocillo.
 - a. El fabricante del reactivo Solución de Terminación lo proporciona listo para usar.
8. Leer la placa a 450 nm con corrección de fondo a 620 nm.
 - a. La placa se leerá en un plazo de 30 minutos después de detener la reacción.
 - 40
9. Introducir las lecturas de absorbancia en la hoja de cálculo proporcionada para el análisis.

Tabla 4 Mapa de placa de ensayo de 96 pocillos de Ejemplo

| | 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 |

(continuación)

| | | | | | | | | | | | | |
|------|--------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| E | 0,25 | | 5 | 5 | 13 | 13 | 21 | 21 | 29 | 29 | 37 | 37 |
| F | 0,125 | | 6 | 6 | 14 | 14 | 22 | 22 | 30 | 30 | 38 | 38 |
| G | 0,0625 | | 7 | 7 | 15 | 15 | 23 | 23 | 31 | 31 | 39 | 39 |
| H tb | 0,0 | | 8 | 8 | 16 | 16 | 24 | 24 | 32 | 32 | 40 | 40 |

Ejemplo 2: PRAISE-2

5 El segundo estudio aleatorizado y prospectivo de evaluación de supervivencia con amlodipina (PRAISE-2) fue un ensayo aleatorizado, doble ciego, de diseño prospectivo para identificar predictores de ecocardiografía de la supervivencia entre pacientes con miocardiopatía no isquémica e insuficiencia cardíaca y para determinar los componentes de la información ecocardiográfica y pronóstica con respecto a la información basal demográfica y clínica (Cabell y col., Am. Heart J. 147(1):151-7 (2004)). En el estudio ecocardiográfico PRAISE-2 participaron cien
10 pacientes; de ellos, 93 tenían análisis ecocardiográficos fallidos e interpretables. Se extrajeron muestras de suero basales y a las 2 semanas y se determinaron los niveles de IL1RL1 como se describe en el Ejemplo 1.

15 El análisis de la curva de las características operativas del receptor (ROC) se realizó usando el software Analyse-It (Analyse-It, Ltd, Leeds. Reino Unido). La curva ROC se muestra en la Figura 1 y la información de la AUC (área bajo la curva) para los parámetros de la muestra que se muestran en la Figura 1 se proporciona en la Tabla 5 siguiente. El análisis de la ROC proporciona un resumen de todos los marcadores evaluados por su valor pronóstico en la situación basal (II). Una AUC indicaría un resultado neutro; cualquier resultado por encima de 0,5 indica un incremento de la precisión de la predicción en base a dicha medición, mientras que un resultado inferior a 0,5 indica una pérdida de precisión (es decir, la variabilidad es alta para dicho marcador) y ausencia de correlación con el parámetro medido.

Tabla 5: Resultados de la ROC del PRAISE

| Variable | AUC | p |
|------------|-------|-------|
| Edad | 0,620 | 0,027 |
| Altura | 0,562 | 0,250 |
| Peso | 0,425 | 0,168 |
| IMC | 0,391 | 0,043 |
| LVEF | 0,421 | 0,146 |
| Creatinina | 0,599 | 0,066 |
| ST2t1 | 0,611 | 0,040 |
| NEt1 | 0,632 | 0,015 |
| Et1 | 0,496 | 0,941 |
| DAt1 | 0,637 | 0,012 |
| ANGt1 | 0,471 | 0,587 |
| MDAt1 | 0,541 | 0,451 |
| ADRR1 | 0,504 | 0,934 |
| ANPt1 | 0,811 | 0,000 |
| BNPt1 | 0,779 | 0,000 |

20

El valor de ST2 para predicción del criterio de valoración se comparó con otros marcadores en tres grupos de IMC.

Los resultados, mostrados en la Tabla 6, indican que para los pacientes con un IMC alto, el ST2 (p. ej., la proporción de ST2) es un predictor más fuerte que BNP. Los números negativos en el grupo del peso de en medio para ST2 pueden deberse a la presencia de niveles anómalos en algunos sujetos.

Tabla 6: Predicción del criterio de valoración PRAISE en 3 grupos de IMC

| Grupo de IMC | Predictor | R | S.E. | Sig. |
|--------------|------------------|--------|-------|-------|
| Menor de 25 | Log BNP tiempo 0 | 2,472 | 1,301 | 0,058 |
| | Edad | 0,032 | 0,032 | 0,319 |
| | Sexo | 0,274 | 0,986 | 0,781 |
| | Proporción ST2 | 3,094 | 1,997 | 0,121 |
| 25 a 30: | Log BNP tiempo 0 | 4,031 | 1,467 | 0,006 |
| | Edad | 0,042 | 0,037 | 0,258 |
| | Sexo | -0,516 | 0,960 | 0,591 |
| | Proporción ST2 | -0,764 | 1,643 | 0,642 |
| Mayor de 30 | Log BNP tiempo 0 | 1,283 | 0,966 | 0,184 |
| | Edad | 0,008 | 0,039 | 0,844 |
| | Sexo | -2,128 | 1,056 | 0,044 |
| | Proporción ST2 | 6,581 | 2,539 | 0,010 |

5

La ROC de PRAISE para BNP y la proporción de ST2 también se calcularon. Los resultados, mostrados en la Figura 2 y la Tabla 7, indican que la proporción de ST2 es comparable a BNP en toda la población del PRAISE, que incluyó sujetos tanto sin sobrepeso como no obesos, así como sujetos en los que la IC se había estabilizado; los niveles de ST2 tienden a retornar a los valores basales cuando la IC se estabiliza.

10

Tabla 7: ROC para BNP y proporción ST2

| Predictor | AUC | SE | p | Inferior | Superior |
|-----------------|-------|-------|-------|----------|----------|
| BNPt1 | 0,783 | 0,043 | 0,000 | 0,698 | 0,868 |
| Proporción ST-2 | 0,660 | 0,054 | 0,004 | 0,555 | 0,766 |

La utilidad pronóstica de BNP y de la proporción de ST2 se calculó para los individuos con un IMC alto; los resultados, mostrados en la Tabla 8 y la Figura 3, demuestran que la proporción de ST2 es un predictor mejor que BNP en el grupo de IMC alto, ya que tiene una AUC mayor y una correlación mejor

15

Tabla 8: Utilidad pronóstica para BNP y proporción de ST2 en IMC alto

| Grupo IMC | Predictor | AUC | BE | p | Inferior | Superior |
|---------------|----------------|-------|-------|-------|----------|----------|
| Menor de 25 | BNP basal | 0,788 | 0,077 | 0,002 | 0,637 | 0,939 |
| | Proporción ST2 | 0,717 | 0,082 | 0,022 | 0,555 | 0,878 |
| 25-29 | BNP basal | 0,864 | 0,055 | 0,000 | 0,756 | 0,972 |
| | Proporción ST2 | 0,521 | 0,097 | 0,829 | 0,330 | 0,711 |
| 30 y superior | BNP basal | 0,669 | 0,100 | 0,102 | 0,473 | 0,865 |
| | Proporción ST2 | 0,772 | 0,083 | 0,009 | 0,609 | 0,934 |

Estos resultados indican que ST2 es predictor del resultado en pacientes con insuficiencia cardíaca compensados cuando se usa como un cambio en el tiempo y proporciona resolución pronóstica adicional en pacientes con un IMC alto.

Ejemplo 3: El ST2 no está afectado por el IMC

- 5 En el estudio PRIDE se reclutó a 600 sujetos con disnea para analizar la utilidad del NT-proBNP en el diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardíaca (IC) aguda. En el reclutamiento se obtuvo una muestra de sangre con enmascaramiento, se procesó y se congeló a -80 °C. Para los fines de análisis de ST2 se descongeló una alícuota de sangre citada (segundo ciclo de congelación-descongelación) y se analizó la concentración de la proteína ST2- El efecto del IMC sobre los niveles de ST2 se analizó.
- 10 Los resultados se muestran en la Figura 4 y la Tabla 9. La mediana de los valores de ST2 fue la misma en los tres grupos de IMC y el IIC fue casi idéntico también.

Tabla 9: IMC y niveles de ST2

| IMC | ST2 (mediana, ng/ml) | Intervalo intercuartílico (ng/ml) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------------|
| < 25 (n= 77) | 0,56 | 0,31-1,39 |
| 25-29,9 (n= 65) | 0,46 | 0,23-1,13 |
| ≥30 (n= 66) | 0,48 | 0,23-1,04 |

Estos resultados demuestran que, al contrario que BNP, los niveles de ST2 no están afectados por el IMC.

15 Ejemplo 4- Las concentraciones de ST2 no están afectadas por la insuficiencia renal

- 20 El efecto de la alteración renal sobre las concentraciones de ST2 se evaluó en una población de 135 pacientes con insuficiencia renal moderada o grave. Ninguno de los pacientes estaba recibiendo diálisis y a ninguno se le había diagnosticado anteriormente ECV. Todos los pacientes fueron evaluados usando la tasa de filtración glomerular (TFG en ml/min) determinada mediante el procedimiento de la Modificación de la dieta en la nefropatía (MDRD) como medida de la función renal. En cada sujeto también se realizaron determinaciones ecocardiográficas y del calcio en las arterias coronarias (CA) para detectar ECV latente. También se evaluaron múltiples biomarcadores.

La estadística descriptiva para esta cohorte se muestra en la Tabla 10; la TFG media y el ST2 se ilustran gráficamente en las Figuras 5A-B.

Tabla 10: Tasa de filtración glomerular (TFG) y niveles de ST2

| | TFG | Niveles de ST2 (ng/ml) |
|----------------------------------|-------|------------------------|
| Media | 34,5 | 0,122 |
| Mediana | 34 | 0,107 |
| Error típico | 0,989 | 0,005 |
| Desviación típica | 11,4 | 0,059 |
| Coefficiente de variación | 33,3 | 48,346 |
| IC 95 % inferior | 32,5 | 0,112 |
| IC 95 % superior | 36,4 | 0,132 |
| Percentil 25 | 27 | 0,090 |
| Percentil 75 | 43 | 0,127 |
| Mínimo | 8 | 0,068 |
| Máximo | 59 | 0,476 |
| Recuento | 135 | 135 |

En esta cohorte de pacientes con enfermedad crónica estable, solo diez (8 %) tenían niveles de ST2 superiores a 0,2, el mayor de los cuales fue 0,476 ng/ml. Esta distribución de los valores de ST2 se muestra en la Figura 6. Esto era lo esperado en esta población de sujetos con insuficiencia renal crónica tratada; no se esperaría ver niveles de ST2 muy altos.

- 5 Se realizó un análisis de correlación de Pearson en esta población para determinar si había una correlación entre los niveles de ST2 y la función renal, medido mediante TFG o aclaramiento de creatinina. Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12.

Tabla 11: Resultados de la correlación de Pearson- TFG y ST2

| Estadística descriptiva | | | | |
|----------------------------------|-------|-------------------|--------------|-----|
| Variable | Media | Desviación típica | Error típico | N |
| TFG | 34,5 | 11,5 | 0,989 | 135 |
| ST2 (ng/ml) | 0,122 | 0,059 | 0,005 | 135 |
| Matriz de correlación (R) | | | | |
| | TFG | ST2 (ng/ml) | | |
| TFG | 1,000 | 0,028 | | |
| ST2 (ng/ml) | 0,028 | 1,000 | | |
| Significación de correlación (P) | | | | |
| | TFG | ST2 (ng/ml) | | |
| TFG | - | 0,748 | | |
| ST2 (ng/ml) | 0,748 | - | | |

10

Tabla 12: Resultados de la correlación de Pearson- Aclaramiento de creatinina y ST2

| Estadística descriptiva | | | | |
|---------------------------|---------------|-------------------|--------------|-----|
| Variable | Media | Desviación típica | Error típico | N |
| Cribado Cr | 2,175 | 0,859 | 0,081 | 113 |
| ST2 (ng/ml) | 0,122 | 0,058 | 0,006 | 113 |
| Matriz de correlación (R) | | | | |
| | Cribado de Cr | ST2 (ng/ml) | | |
| Cribado de Cr | 1,000 | -0,018 | | |
| ST2 (ng/ml) | -0,018 | 1,000 | | |

(continuación)

| Estadística descriptiva | | |
|-------------------------------------|---------------|-------------|
| Significación de la correlación (P) | | |
| | Cribado de Cr | ST2 (ng/ml) |
| Cribado de Cr | - | 0,851 |
| ST2 (ng/ml) | 0,851 | - |

5 Estos resultados demuestran que, como era de esperar en esta población de sujetos con insuficiencia renal crónica tratada, no existe una correlación entre los niveles de ST2 y la TFG ($p= 0,75$) o el 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.

10 Los mismos análisis se llevaron a cabo en una población de 139 sujetos en el hospital San Diego Veteran's Administration Hospital. Todos los sujetos habían sido diagnosticados previamente de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD) y el nivel medio de ST2 fue aproximadamente dos veces el observado en la población de
 15 pacientes con insuficiencia renal crónica, pero no IC (véanse las Tablas 11-12). Existe una correlación casi ubicua entre la insuficiencia renal y la insuficiencia cardíaca, con una confluencia de casi el 80 % de los pacientes con IC en estadio III/IV que también tiene la función renal alterada (Fonarow y Heywood, Am. J. Med. (2006) 119(12A):S17-S25). Por tanto, dado que la ICAD se correlaciona con los niveles de ST2, cabría esperar ver una correlación entre la insuficiencia renal (medida mediante la TFG) y los niveles de ST2. Esto es exactamente lo que se observó, como se muestra en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13: Resultados de la correlación de Pearson- TFG y ST2 en la 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 | | |
| Significación de la correlación (P) | | | | |
| | TFG | ST2 (ng/ml) | | |
| TFG | | 0,470 | | |
| ST2 (ng/ml) | 0,470 | - | | |

Tabla 14: Resultados de la correlación de Pearson- TFG y proporciones de ST2 en la ICAD

| Estadística descriptiva | | | | |
|-------------------------------------|--------|-------------------|--------------|-----|
| Variable | Media | Desviación típica | Error típico | N |
| TFG | 59,1 | 25,3 | 2,143 | 139 |
| Proporción ST2 | 1,038 | 3,038 | 0,258 | 139 |
| Matriz de correlación (R) | | | | |
| | TFG | Proporción ST2 | | |
| TFG | 1,000 | -0,161 | | |
| Proporción ST2 | -0,161 | 1,000 | | |
| Significación de la correlación (P) | | | | |
| | TFG | ST2 (ng/ml) | | |
| TFG | - | 0,058 | | |
| Proporción ST2 | 0,058 | - | | |

Estos resultados demuestran que, en los sujetos con ICAD, los valores de ST2, se representen como un nivel único o como una proporción, se correlacionan con medidas de insuficiencia renal, pero son independientes de la insuficiencia renal; por tanto, no existe una relación causal entre los dos. En su lugar, ambas variables están relacionadas e interaccionan de forma independiente con un tercer parámetro (en este caso, insuficiencia cardíaca).

OTRAS REALIZACIONES

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, con la anterior descripción se pretende ilustrar, y no limitar, el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La divulgación se describe adicionalmente en el presente documento en las cláusulas siguientes:

1. Un kit para diagnosticar enfermedades cardiovasculares (ECV), comprendiendo el kit anticuerpos que se unen específicamente a ST2, BNP y el dímero D, o a sondas de ácido nucleico que se unen específicamente a ácidos nucleicos que codifican ST2, BNP y el dímero D, e instrucciones de uso en un procedimiento de diagnóstico de insuficiencia cardíaca (IC) o una embolia pulmonar (EP) en un sujeto que presenta uno o los dos de (i) un índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 25, o (ii) la función renal alterada.

2. Un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad cardiovascular (ECV) en un sujeto que tiene uno o ambos de (i) índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 25, o (ii) la función renal alterada, comprendiendo el procedimiento:

uno o los dos de:

- (A) determinar el IMC del sujeto y, si el IMC del sujeto es igual o superior a 25, seleccionar al sujeto; o
- (B) evaluar la función renal del sujeto y, si el sujeto tiene la función renal alterada, seleccionar al sujeto; y

determinar los niveles de BNP, dímero D y ST2 en una muestra biológica del sujeto; en el que el nivel de BNP, el nivel de dímero D y el nivel de ST2 del sujeto indica si el sujeto tiene ECV.

3. El kit de la cláusula 1 o el procedimiento de la cláusula 2, en el que la ECV es insuficiencia cardíaca (IC) o embolia pulmonar (EP).

4. El kit de la cláusula 1 o el procedimiento de la cláusula 2, en el que el nivel de BNP, el nivel del dímero D y el nivel de ST2 se detectan en una muestra biológica que comprende sangre, plasma o suero.

5. El procedimiento de la cláusula 2, en el que si el nivel de BNP del sujeto es inferior a 500 pg/ml y el nivel del

dímero D es inferior a 500 µg/l, la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2 indica si el sujeto tiene IC.

6. El procedimiento de la cláusula 2, en el que si el nivel de BNP del sujeto es inferior a 100 pg/ml y el nivel del dímero D es 500-4000 µg/l, la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2 indica si el sujeto tiene EP.

7. El procedimiento de la cláusula 5, en el que el nivel de referencia de ST2 representa un nivel en un sujeto que no tiene IC.

8. El procedimiento de la cláusula 5, en el que el nivel de referencia de ST2 es de aproximadamente 0,2 a 0,3 ng/ml en suero y valores por encima de dicho nivel indican la presencia de IC.

9. El procedimiento de la cláusula 6, en el que el nivel de referencia de ST2 representa un nivel en un sujeto que no tiene EP.

10. El procedimiento de la cláusula 6, en el que el nivel de referencia de ST2 es de aproximadamente 0,2 a 0,3 ng/ml en suero y valores por encima de dicho nivel indican la presencia de EP.

11. El procedimiento de la cláusula 2, en el que el nivel de BNP del sujeto es de 100-500 pg/ml.

12. El procedimiento de la cláusula 2, que además comprende determinar un nivel en un sujeto de uno o más biomarcadores adicionales.

13. El procedimiento de la cláusula 12, en el que los otros biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en NT-proANP, proANP, ANP, troponina, CRP, creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de la función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana.

14. El procedimiento de la cláusula 2, en el que la determinación de si el sujeto tiene la función renal alterada comprende determinar la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o el nivel de creatinina en suero y el sujeto tiene la función renal alterada si tiene una TFG o un nivel de creatinina en suero de los mostrados en la tabla siguiente:

| Grado | TFG (ml/minuto) | Creatinina en suero (µmol/litro) |
|----------|-----------------|----------------------------------|
| Leve | 20-50 | 150-300 |
| Moderado | 10-20 | 300-700 |
| Grave | < 10 | > 700 |

15. El kit de la cláusula 1, en el que un sujeto tiene la función renal alterada si tienen una TFG inferior a 50 ml/minuto.

16. El kit de la cláusula 1 o el procedimiento de la reivindicación 2, en el que el sujeto tiene un IMC superior o igual a 30.

17. El kit de la cláusula 1 o el procedimiento de la cláusula 2, en el que el sujeto tiene un IMC de 25 a 29.

18. Un procedimiento de diagnóstico de enfermedad cardiovascular (ECV) en un sujeto con la función renal alterada, comprendiendo el procedimiento:

evaluar la función renal del sujeto y, si el sujeto tiene la función renal alterada, seleccionar al sujeto; y determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto; en el que la relación entre el nivel de ST2 y un nivel de referencia de ST2 indica si el sujeto tiene ECV.

19. El procedimiento de la cláusula 18, en el que el nivel de referencia de ST2 representa un nivel en un sujeto que no tiene ECV.

20. El procedimiento de la cláusula 18, en el que el nivel de referencia de ST2 es de aproximadamente 0,2 a 0,3 ng/ml en suero y valores por encima de dicho nivel indican la presencia de ECV.

21. El procedimiento de la cláusula 18, en el que el nivel de referencia de ST2 representa un nivel en un sujeto que no tiene ECV.

22. El procedimiento de la cláusula 18, en el que la ECV es insuficiencia cardíaca (IC) o embolia pulmonar (EP).

23. El procedimiento de la cláusula 18, en el que la muestra biológica comprende sangre, plasma o suero.

24. El procedimiento de la cláusula 18, que además comprende determinar un nivel en un sujeto de uno o más biomarcadores adicionales.

25. El procedimiento de la cláusula 24, en el que los otros biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en BNP, dímero D, NT-proANP y ANP, troponina, CRP, creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de la función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana.

26. El procedimiento de la cláusula 18, en el que la determinación de si el sujeto tiene la función renal alterada comprende determinar la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o el nivel de creatinina en suero y el sujeto tiene la función renal alterada si tiene una TFG o un nivel de creatinina en suero de los mostrados en la tabla siguiente:

ES 2 566 169 T3

| Grado | TFG (ml/minuto) | Creatinina en suero ($\mu\text{mol/litro}$) |
|--------------|------------------------|---|
| Leve | 20-50 | 150-300 |
| Moderado | 10-20 | 300-700 |
| Grave | < 10 | > 700 |

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad cardiovascular (ECV) en un sujeto que tiene un índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 25, o la función renal alterada, comprendiendo el procedimiento:

5 determinar el IMC del sujeto y, si el IMC del sujeto es igual o superior a 25, seleccionar al sujeto, o evaluar la función renal del sujeto y, si el sujeto tiene la función renal alterada, seleccionar al sujeto; y determinar los niveles del péptido natriurético de tipo B (BNP), dímero D y del receptor de interleucina 1 de tipo 1 (ST2) en una muestra biológica del sujeto; en el que el nivel de BNP, y el nivel de ST2 del sujeto indican si el sujeto tiene ECV.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la ECV es insuficiencia cardíaca o embolia pulmonar.

10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene disnea o dolor torácico.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de ST2 soluble se determina en el momento de la presentación o 1-7 días después del inicio de los síntomas en el sujeto.

15 5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además determinar un nivel en el sujeto de uno o más de otros biomarcadores seleccionados opcionalmente del grupo que consiste en péptido natriurético N-terminal proatrial (NT-proANP), péptido natriurético atrial (ANP), troponina, proteína C reactiva CRP, creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de la función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación de si el sujeto tiene la función renal alterada comprende determinar la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o el nivel de creatinina en suero, y el sujeto tiene la función renal alterada si tiene una TFG o un nivel de creatinina en suero de los mostrados en la tabla siguiente:

| Grado | TFG (ml/minuto) | Creatinina en suero (µmol/litro) |
|--------------|------------------------|---|
| Leve | 20-50 | 150-300 |
| Moderado | 10-20 | 300-700 |
| Grave | < 10 | > 700 |

20 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que un sujeto tiene la función renal alterada si tiene una TFG inferior a 50 ml/minuto.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene un IMC superior o igual a 30 o el sujeto tiene un IMC de 25 a 29.

25 9. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende la determinación física de la función pulmonar o la función cardíaca.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de BNP y el nivel de ST2 soluble se detectan en una muestra biológica que comprende sangre, plasma o suero.

Figura 1

Curva ROC

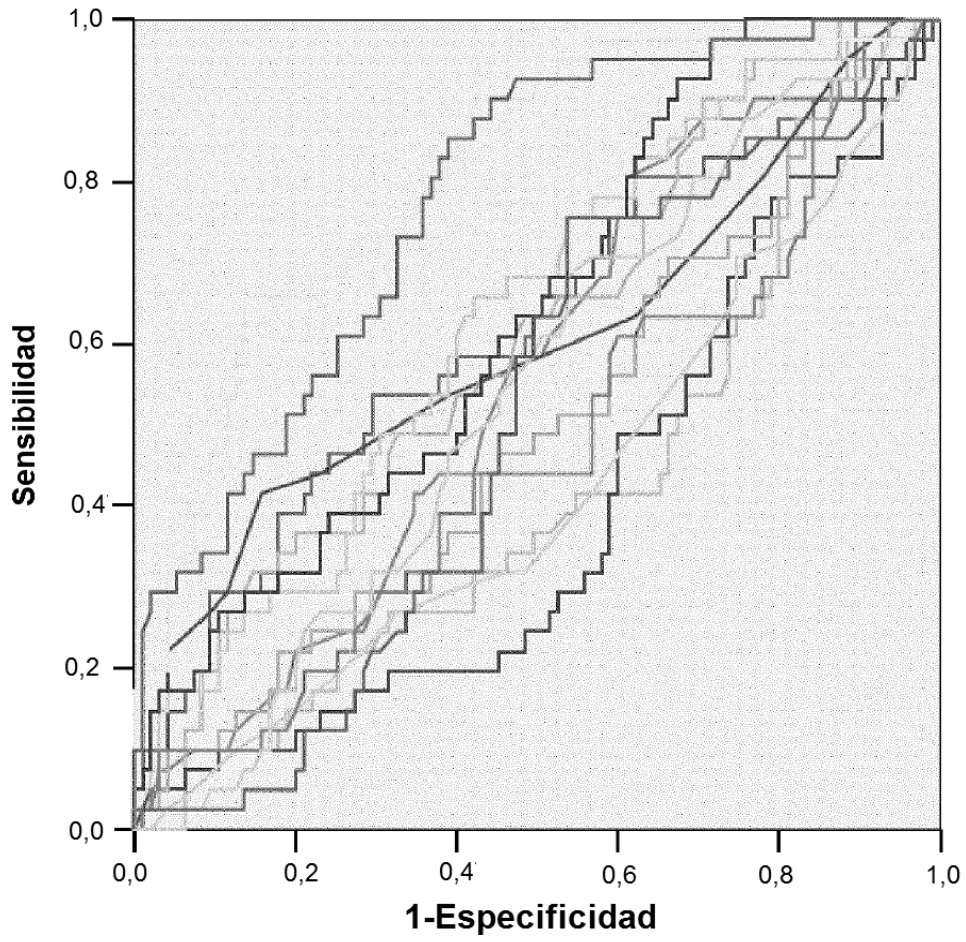


Figura 2

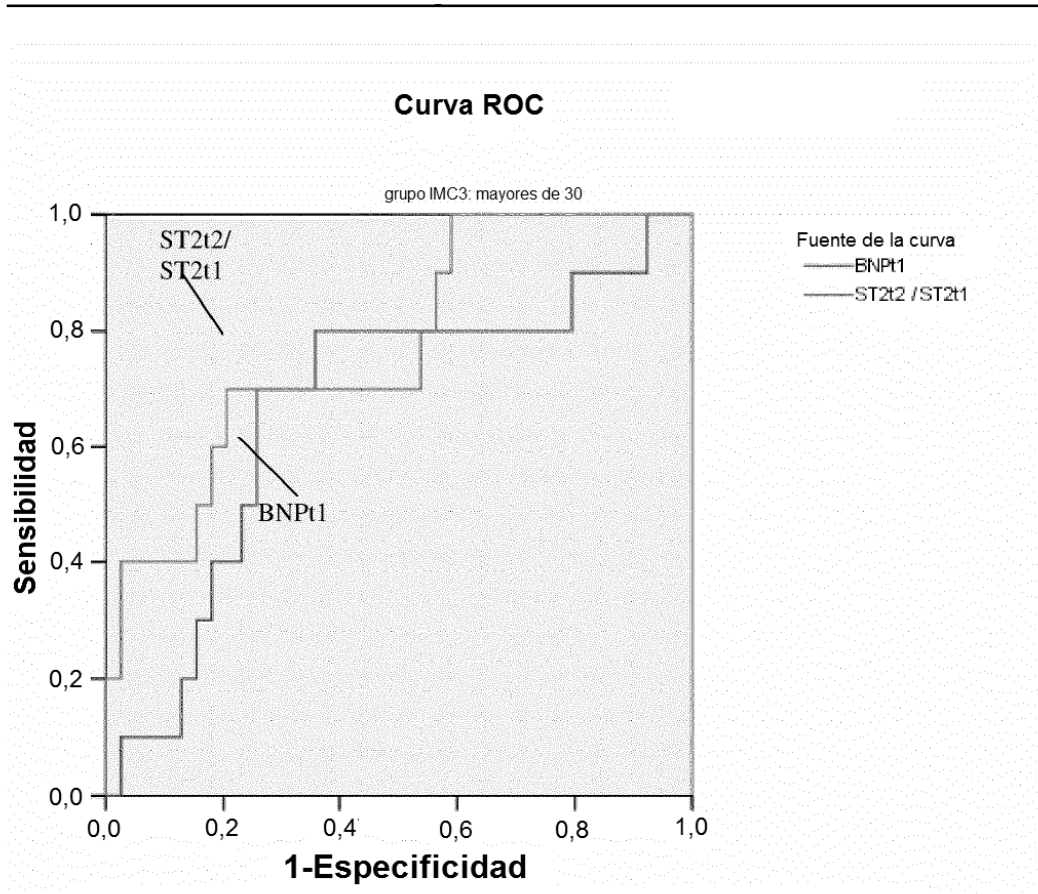


Figura 3

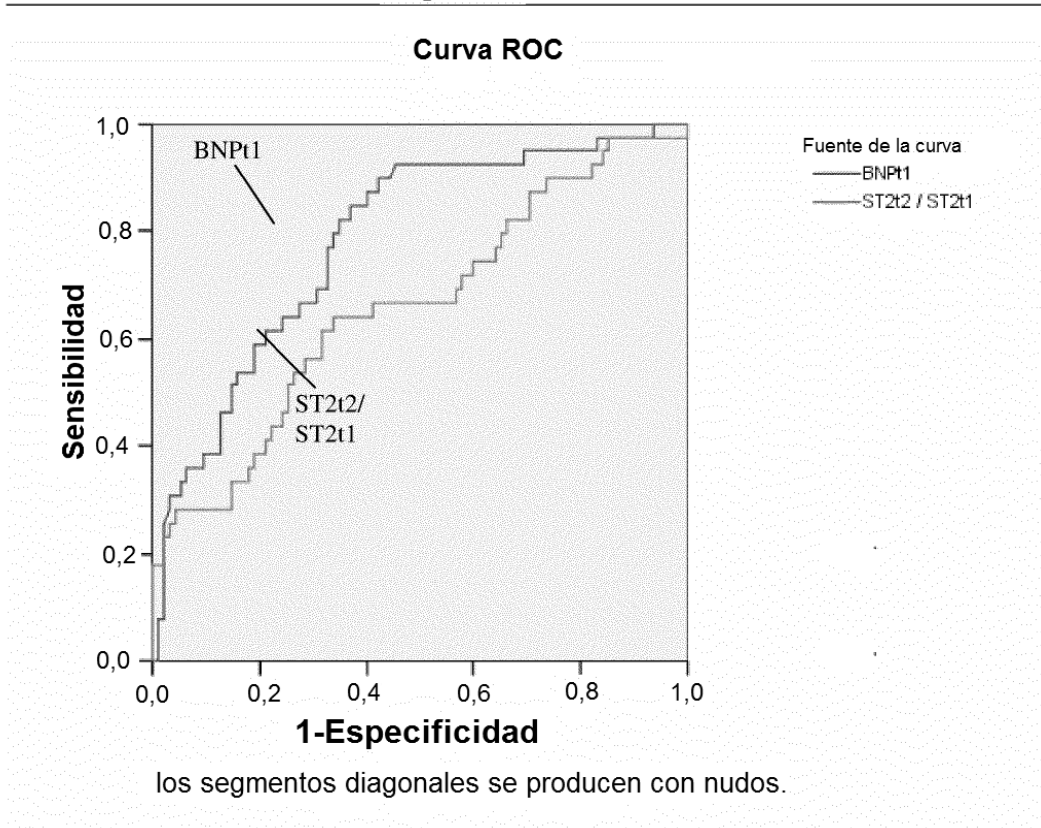


Figura 4

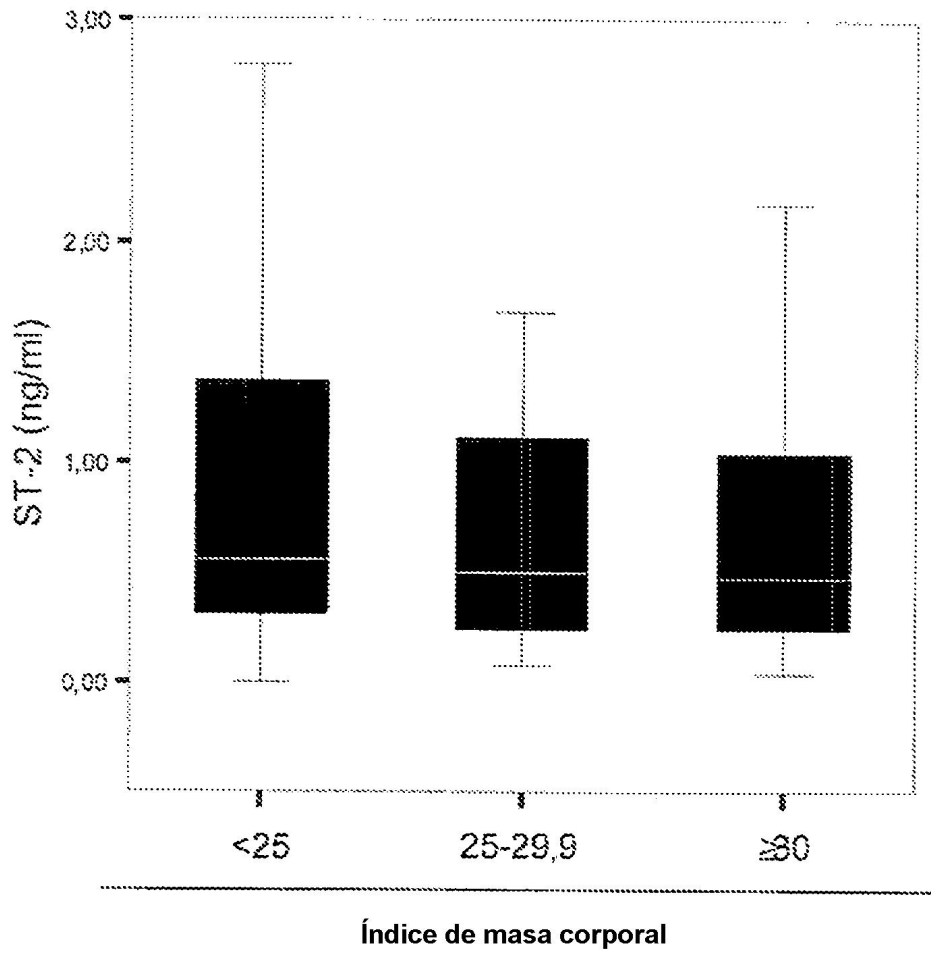
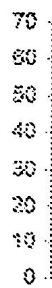


FIGURA 5A

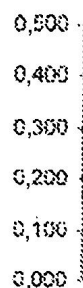
TFG



TFG

FIGURA 5B

ST2



ST2 (ng/ml)

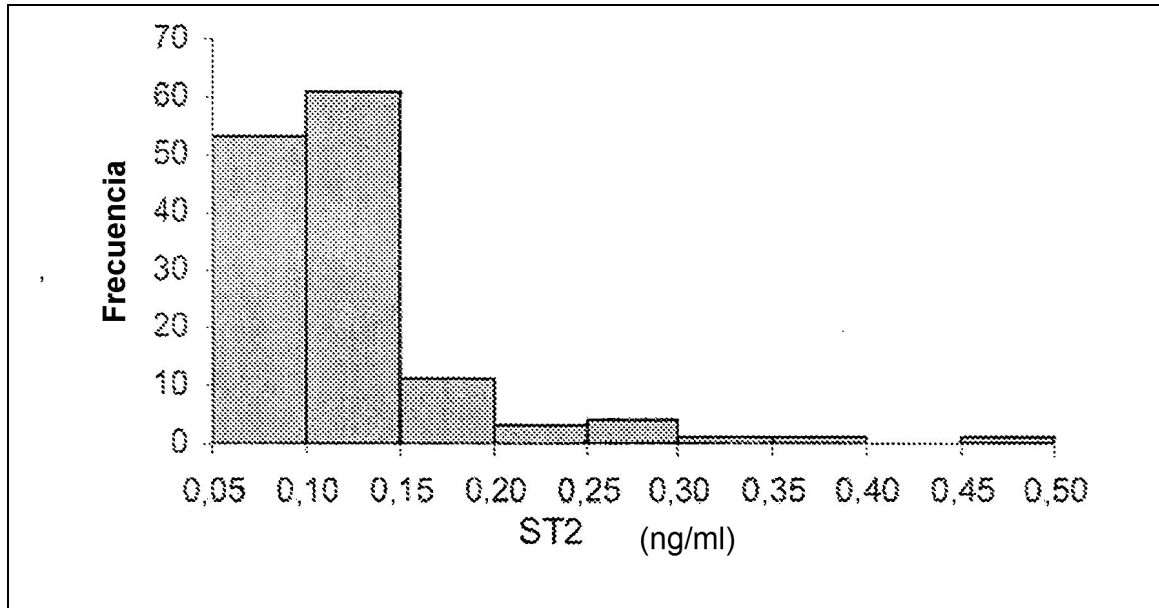


FIGURA 6