

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 994**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C12N 5/12** (2006.01)  
**G01N 33/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11766825 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2556090**

54 Título: **Anticuerpos contra ST-2 humana soluble y ensayos**

30 Prioridad:

**09.04.2010 US 322578 P**  
**18.05.2010 US 345837 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.05.2016**

73 Titular/es:

**CRITICAL CARE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)**  
**3030 Bunker Hill St., Suite 115A**  
**San Diego, California 92109, US**

72 Inventor/es:

**SNIDER, JAMES V.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 571 994 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

Anticuerpos contra ST-2 humana soluble y ensayos

### Campo técnico

5 En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen a la proteína soluble humana del gen 2 expresado por estimulación del crecimiento (ST2), kits que contiene estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, y ensayos que usan estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

### Antecedentes

10 ST2 es un miembro de la familia del receptor de interleuquina-1 con isoformas transmembrana (ST2L) y solubles (sST2 o ST2 soluble) (Iwahana y col., Eur. J. Biochem. 264:397-406, 1999). Artículos recientemente publicados describen el actual conocimiento sobre la relación de ST2 con enfermedades inflamatorias (Arend y col., Immunol. Rev. 223:20-38, 2008; Kakkar y col., Nat. Rev. Drug Discov. 7:827-840, 2008; Hayakawa y col., J. Biol. Chem. 282:26369-26380, 2007; Trajkovic y col., Cytokine Growth Factor Rev. 15:87-95, 2004). La concentración en circulación de ST2 soluble humana están elevada en pacientes que padecen diversos trastornos asociados con una respuesta anormal de células auxiliares T de tipo-2 (Th2), incluyendo lupus sistémico eritematoso y asma, así como en afecciones inflamatorias que son principalmente independientes de una respuesta Th2, tal como choque séptico o traumatismo (Trajkovic y col., Cytokine Growth Factor Rev. 15:87-95, 2004; Brunner y col., Intensive Care Med. 30:1468-1473, 2004). Además, la señalización de interleuquina-33/ST2L representa un mecanismo cardioprotector crucial en caso de sobrecarga mecánica (Seki y col., Circulation Heart Fail. 2:684-691, 2009; Kakkar y col., Nat. Rev. Drug Discov. 7:827-40, 2008; Sanada y col., J. Clin. Invest. 117:1538-1549, 2007). Una elevación en ST2 soluble humana también es predictiva de un peor pronóstico en pacientes con fallo cardiaco (HF) y aquellos con infarto de miocardio (Kakkar y col., Nat. Rev. Drug Discov. 7:827-40, 2008; Weinberg y col., Circulation 107:721-726, 2003; Shimpo y col., Circulation 109:2186-2190, 2004; Januzzi y col., J. Am. Coll. Cardiol. 50:607-613, 2007; Mueller y col., Clin. Chem. 54:752-756, 2008; Rehman y col., J. Am. Coll. Cardiol. 52:1458-65, 2008; Sabatine y col., Circulation 117:1936-1944, 2008). Niveles elevados de ST2 soluble humana también son predictivos de muerte de un sujeto en un año (véase, por ejemplo, el documento WO 07/127749). Tomado todo en conjunto, ST2 soluble humana se ha implicado en ciertas enfermedades inflamatorias y el sistema paracrino cardioprotector, y es un marcador predictivo de pronóstico en pacientes con fallo cardiaco y de muerte de un sujeto en un año.

30 El documento WO 99/34217 describe una forma unida a membrana de la proteína ST2 conocida como proteína ST2L y desvela el desarrollo de reactivos tales como anticuerpos, ligandos, agonistas y/o antagonistas específicos para ST2L. Shimpo y col. ("Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction", Circulation, vol. 109, n.º 18, 11-05-2004, páginas 2186-2190) desvela la medición de los niveles de ST2 en suero de pacientes con infarto agudo de miocardio e informa de que los niveles basales de ST2 eran significativamente mayores en aquellos pacientes que morían o desarrollaban nuevo fallo cardiaco congestivo en 30 días. La descripción de R&D Systems de "Human ST2/IL-1 R4 - DuoSet ELISA Development Kit" (número de catálogo DY523, páginas 1-6) desvela un anticuerpo monoclonal anti-ST2 humana. La descripción de R&D Systems de "Human ST2/IL-1 R4 Antibody Monoclonal Mouse IgG1 Clone # 97203" (número de catálogo MAB523, páginas 1-2) desvela la detección de ST2/IL-1 R4 en monocitos PBMC humanos por citometría de flujo. Yoshida y col. ("Studies on natural ST2 gene products in the human leukemic cell line UT-7 using monoclonal anti-human ST2 antibodies", Hybridoma, vol. 14, n.º 5, 1995-10-01, páginas 419-427) describe la producción de ocho especies de anticuerpos monoclonales murinos contra la proteína ST2 humana. El documento US 7.087.396 B2 describe un procedimiento para determinar ST2 humana soluble usando un anticuerpo monoclonal anti-ST2 humana producido por hibridomas.

### Sumario

45 La presente invención se refiere a anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno como se expone en las reivindicaciones. La presente invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de nuevos anticuerpos específicos para la proteína ST2 soluble humana. Estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles, por ejemplo, para la cuantificación de proteínas ST2 solubles humanas en muestras biológicas (por ejemplo, muestras clínicas), para predecir el riesgo de muerte en un año en un sujeto, para determinar si dar el alta o iniciar o continuar el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento hospitalario) de un sujeto, o para seleccionar un sujeto para participación en un estudio clínico. Se proporcionan en el presente documento estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, kits que contiene estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, y diversos procedimientos de uso de estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

55 Se proporcionan en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los mismos que son, o se unen de forma competitiva con, un anticuerpo producido a partir de los hibridomas depositados en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATTC) y denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y PTA 10432. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo no se une de forma competitiva con anticuerpo D066-3 o D067-3 o ambos (MBL International) (descrito en la patente de Estados Unidos n.º 7.087.396), o tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana igual a o menor de  $1,51 \times 10^{-9}$  M. En algunas realizaciones, el

anticuerpo o fragmento del mismo tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana igual a o menor de  $8,59 \times 10^{-10}$  M. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es quimérico o está humanizado. En algunas realizaciones, el fragmento se selecciona del grupo de: un fragmento Fab, un fragmento  $F(ab')_2$ , y un fragmento scFv. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo está glucosilado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo contiene una o más regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera o pesada del anticuerpo producido por el hibridoma depositado en el ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

También se proporcionan anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a ST2 soluble humana, en el que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se produjeron por un procedimiento que incluye inmunizar un mamífero no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra, vaca, cerdo, mono, o caballo) con una ST2 soluble humana recombinante aislada de una célula humana (por ejemplo, un fibroblasto humano, célula neuronal, epitelial, o endotelial, una célula embrionaria o adulta, especialmente una célula renal embrionaria humana). En algunas realizaciones, la ST2 soluble humana recombinante aislada está completamente glucosilada, es decir, tiene sustancialmente la misma glucosilación que una ST2 soluble humana endógena nativa presente en suero humano. En algunas realizaciones de todos los anticuerpos y fragmentos descritos en el presente documento, el anticuerpo o fragmento del mismo está marcado.

También se proporcionan células del hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y células del hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432.

También se proporcionan procedimientos para cuantificar un nivel de ST2 soluble humana en una muestra de un sujeto. Los procedimientos incluyen poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento, y detectar la unión del anticuerpo o fragmento del mismo a ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye el uso de al menos dos anticuerpos diferentes o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento.

También se proporcionan procedimientos para predecir el riesgo de muerte en un año en un sujeto. Los procedimientos incluyen obtener una muestra de un sujeto y determinar el nivel de ST2 soluble humana usando al menos un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento, donde un nivel elevado de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el sujeto tiene un riesgo aumentado de muerte en un año (por ejemplo, riesgo aumentado de muerte en un año respecto a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene la misma enfermedad) que tiene nivel disminuido o sustancialmente el mismo nivel de ST2 soluble humana respecto al mismo control), y un nivel disminuido o sustancialmente el mismo nivel de ST2 soluble humana indica que el sujeto tiene un riesgo disminuido de muerte en un año (por ejemplo, un riesgo disminuido de muerte en un año respecto a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene la misma enfermedad) que tiene un nivel aumentado o sustancialmente el mismo nivel de ST2 soluble humana respecto al mismo control).

También se proporcionan procedimientos para determinar si dar el alta a un paciente hospitalizado o iniciar o continuar el tratamiento de un sujeto sobre una base hospitalaria que incluyen obtener una muestra de un sujeto y determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento, donde un nivel elevado de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el tratamiento hospitalario debe iniciarse o continuarse, y un nivel disminuido o un nivel igual de ST2 soluble humana indica que el sujeto debe considerarse para el alta. En algunas realizaciones, el sujeto tiene al menos uno o más de los siguientes síntomas: dolor o malestar pectoral, dificultad para respirar, náuseas, vómitos, eructación, sudoración, palpitaciones, mareo, fatiga, y desfallecimiento.

También se proporcionan procedimientos para seleccionar a un sujeto para que participe en un estudio clínico que incluye obtener una muestra de un sujeto, determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento, y seleccionar el sujeto para su participación en un estudio clínico si el nivel de ST2 soluble humana del sujeto respecto a un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el sujeto debe seleccionarse para su participación en un estudio clínico. En algunas realizaciones, la presencia de un nivel elevado de ST2 soluble humana indica que el sujeto debe seleccionarse para su participación en un estudio clínico.

También se proporcionan procedimientos para seleccionar un tratamiento terapéutico para un sujeto, que incluye determinar un nivel de ST2 soluble humana en una muestra biológica del sujeto usando al menos un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento, en el que el nivel de ST2 soluble humana del sujeto respecto a un nivel de referencia de ST2 soluble humana se usa para seleccionar un tratamiento terapéutico para el sujeto. En algunas realizaciones, la presencia de un nivel elevado de ST2 soluble humana se usa para seleccionar el tratamiento terapéutico para el sujeto.

5 En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el sujeto está sin diagnosticar o no está presentando dos o más (por ejemplo, al menos tres, cuatro, o cinco) síntomas de una patología; el sujeto se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, fallo cardiaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento); o el sujeto tiene uno o más de: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, y un índice de masa corporal de  $\geq 30$ . En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la determinación se realiza usando al menos dos anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento.

10 En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el nivel de referencia de ST2 soluble humana es un nivel umbral de ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, el nivel umbral es un nivel promedio de ST2 soluble humana en una población de pacientes sanos (por ejemplo, población de pacientes hombres sanos o una población de pacientes mujeres sanas). En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el nivel de referencia es un nivel de ST2 soluble humana presente en una muestra de un sujeto que no presenta dos o más síntomas de enfermedad, un sujeto no diagnosticado como que tiene una enfermedad, o un sujeto no identificado como que está en riesgo de desarrollar una enfermedad.

15 En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el sujeto no se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, fallo cardiaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, arteriopatía coronaria aguda, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal o apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la muestra contiene sangre, suero, o plasma. Cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden usarse en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

20 También se proporcionan procedimientos para diagnosticar una enfermedad en un sujeto que incluye obtener una muestra de un sujeto, determinar un nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento, y un nivel de al menos un marcador adicional, en el que un nivel elevado de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2 soluble humana y un nivel alterado del al menos un marcador adicional respecto a un nivel de referencia del al menos un marcador adicional, indica que el sujeto tiene la enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, una enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, o una enfermedad asociada con Th2, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento).

25 También se proporcionan procedimientos para determinar si un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana (y por tanto tiene probabilidad de estar libre de enfermedad grave, por ejemplo, enfermedad cardiovascular, y un riesgo normal de muerte u hospitalización, por ejemplo, en un año) que incluye obtener una muestra de un sujeto y determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra, en el que se determina que el sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana cae en un intervalo específico (por ejemplo, entre aproximadamente 14,5 a aproximadamente 25,3 ng/ml, o entre aproximadamente 18,1 a aproximadamente 19,9 ng/ml). En algunas realizaciones, se determina que un sujeto hombre tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana está entre cualquier intervalo enumerado en la Tabla 9. En algunas realizaciones, se determina que un sujeto mujer tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana está entre cualquier intervalo enumerado en la Tabla 9.

30 También se proporcionan kits que contienen al menos uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. Algunas realizaciones de estos kits contienen dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones de estos kits, al menos uno de los anticuerpos o fragmentos de los mismos tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana (por ejemplo, ST2 soluble humana recombinante) igual a o menor de  $8,59 \times 10^{-10}$  M. En algunas realizaciones, el kit se proporciona como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En algunas realizaciones, el kit contiene adicionalmente una ST2 soluble humana recombinante aislada de una célula humana (por ejemplo, una célula renal embrionaria humana). En algunas realizaciones, la ST2 soluble humana recombinante está completamente glucosilada.

35 Por la expresión "ST2 soluble" se entiende una proteína soluble que contiene una secuencia al menos un 90 % idéntica (por ejemplo, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica) con el n.º de referencia del NCBI NP\_003847.2 (SEQ ID NO: 1) o un ácido nucleico que contiene una secuencia al menos un 90 % idéntica (por ejemplo, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica) al n.º de referencia del NCBI NM\_003856.2 (SEQ ID NO: 2).

40 Por el término "elevado" o "elevación" se entiende una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa (por ejemplo, un aumento) en un nivel determinado o medido (por ejemplo, un nivel de proteína ST2 soluble humana) en comparación con un nivel de referencia (por ejemplo, un nivel de ST2 soluble humana en un sujeto que no tiene una enfermedad, en un sujeto que no presenta dos o más síntomas de una enfermedad, o en un sujeto no identificado como que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, o un nivel umbral de ST2 soluble humana). En algunas realizaciones, la referencia es un nivel umbral, y cualquier nivel por encima de este se

considera "elevado". Se describen en el presente documento niveles de referencia adicionales de ST2 soluble humana.

5 Por la expresión "centro de atención sanitaria" se entiende una localización donde un sujeto puede recibir cuidados médicos de los profesionales sanitarios (por ejemplo, una enfermera, un médico, o un auxiliar médico). Ejemplos no limitantes de centros de atención sanitaria incluyen hospitales, clínicas, y centros de ayuda asistencial (por ejemplo, una residencia de ancianos).

Por la expresión "paciente hospitalizado" se entiende un sujeto que está admitido en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital o un centro de ayuda asistencial).

10 Por la expresión "tratamiento hospitalario" se entiende el control y/o tratamiento médico de un sujeto que está admitido en un centro de atención sanitaria (por ejemplo, un hospital o un centro de ayuda asistencial). Por ejemplo, a un sujeto que recibe tratamiento hospitalario se le puede administrar uno o más agentes terapéuticos por un profesional sanitario o puede experimentar un procedimiento quirúrgico (por ejemplo, cirugía (por ejemplo, trasplante de órganos, cirugía de revascularización coronaria), angioplastia, imágenes (por ejemplo, imágenes de resonancia magnética, imágenes de ultrasonidos, y exploración por tomografía computarizada)). En otros ejemplos, pueden medirse periódicamente uno o más marcadores de una enfermedad o la gravedad de la afección por un profesional sanitario para evaluar la gravedad o progresión de la enfermedad o la afección del sujeto.

20 Por la expresión "nivel de referencia" se entiende un nivel umbral o un nivel en un sujeto de control o población de pacientes de control. Un nivel de referencia dependerá del ensayo realizado y puede determinarse por un experto en la materia. Un nivel de referencia puede ser un nivel basal o un nivel en el mismo paciente medido en un punto previo o posterior en el tiempo. Algunos ejemplos no limitantes de niveles de referencia de ST2 soluble humana incluyen el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto que: no se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad; no presenta al menos dos o más síntomas de una enfermedad; no tiene alto riesgo de CVD; no tiene fallo renal; no tiene hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, y/o un índice de masa corporal de < 30 (por ejemplo, un IMC por debajo de 25); no está en riesgo de desarrollar una enfermedad; y/o no padece una enfermedad asociada con niveles aumentados de ST2 (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, una enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, o una enfermedad asociada con Th2, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento). Se describen en el presente documento poblaciones adicionales de pacientes de control. Ejemplos adicionales de niveles de referencia de ST2 soluble humana son niveles umbral de ST2 soluble humana. Los niveles de referencia de ST2 soluble humana pueden determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica; algunos niveles ejemplares se describen en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, se calcula una relación de dos niveles de ST2 soluble humana en un sujeto. La relación de referencia puede compararse con una relación de referencia de niveles de ST2 soluble humana medidos en un sujeto (por ejemplo, cualquiera de los sujetos de control descritos en el presente documento o el mismo sujeto), por ejemplo, una relación de referencia puede ser una relación de los niveles de ST2 soluble humana antes y después de la aparición de los síntomas de una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, y angina), insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las otras enfermedades asociadas con niveles aumentados de ST2 soluble humana como se describe en el presente documento); una relación de los niveles de ST2 soluble humana antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, y angina), insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento); una relación de los niveles de ST2 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, y angina), insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento); una relación de los niveles de ST2 soluble humana en dos puntos temporales diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento hospitalario o externo) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, y angina), insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento); o una relación de los niveles de ST2 soluble humana antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

50 En algunas realizaciones, la relación de los niveles de ST2 soluble humana medidos en un sujeto puede compararse con una relación de referencia umbral. Las relaciones de referencia de ST2 soluble humana pueden determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica; las relaciones de referencia de ST2 soluble humana pueden calcularse usando los datos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la relación de referencia de ST2 soluble humana puede ser entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,1, o aproximadamente 1.

55 Por la expresión "tratamiento terapéutico" o "tratamiento" se entiende la administración de uno o más agentes farmacéuticos a un sujeto o la realización de un procedimiento médico sobre el cuerpo de un sujeto (por ejemplo, cirugía, tal como trasplante de órganos o cirugía cardíaca). Ejemplos no limitantes de agentes farmacéuticos que pueden administrarse a un sujeto incluyen nitratos, bloqueantes de canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitalis, agentes moduladores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (por ejemplo, agentes bloqueantes beta adrenérgicos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de

aldosterona, inhibidores de renina, y bloqueantes del receptor de angiotensina II), y agentes que disminuyen el colesterol (por ejemplo, una estatina). La expresión tratamiento terapéutico también incluye un ajuste (por ejemplo, aumento o disminución en la dosis o frecuencia de uno o más agentes farmacéuticos que un sujeto puede estar tomando, la administración de uno o más agentes farmacéuticos nuevos al sujeto, o la retirada de uno o más agentes farmacéuticos del plan de tratamiento del sujeto.

Como se usa en el presente documento un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

Como se usa en el presente documento una "muestra biológica" se incluye uno o más de sangre, suero, plasma, orina, y tejido corporal. En líneas generales, una muestra biológica es una muestra que contiene suero, sangre, plasma.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que generalmente contiene polipéptidos de cadena pesada y polipéptidos de cadena ligera. El reconocimiento y unión a antígenos sucede dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. También se conocen anticuerpos de un único dominio que tienen una cadena pesada y una cadena ligera, y anticuerpos de cadena pesada, desprovistos de cadenas ligeras. Un anticuerpo dado comprende uno de cinco tipos diferentes de cadenas pesadas llamadas alfa, delta, épsilon, gamma y mu, cuya clasificación se basa en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada. Estos diferentes tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4) e IgM, respectivamente. Un anticuerpo dado también comprende uno de dos tipos de cadenas ligeras llamadas kappa o lambda, cuya clasificación se basa en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de cadena ligera. Los anticuerpos IgG, IgD e IgE generalmente contienen dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas y dos dominios de combinación a antígeno, cada uno compuesto de una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL). Generalmente, los anticuerpos IgA están compuestos por dos monómeros, cada monómero compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (como para anticuerpos IgG, IgD e IgE). De este modo la molécula IgA tiene cuatro dominios de unión a antígeno, cada uno de nuevo compuesta por una VH y una VL. Ciertos anticuerpos IgA son monoméricos porque están compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los anticuerpos IgM secretados generalmente están compuestos por cinco monómeros, cada monómero compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (como para anticuerpos IgG e IgE). De este modo, la molécula IgM secretada tiene diez dominios de unión a antígeno, cada uno compuesto de nuevo de una VH y una VL. También existe una forma de superficie celular de IgM y esta tiene una estructura de dos cadenas pesadas/dos cadenas ligeras similar a los anticuerpos IgG, IgD, e IgE.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que se ha modificado por ingeniería para que comprenda al menos una región constante humana. Por ejemplo, una o todas (por ejemplo, una, dos, o tres) regiones variables de la cadena o cadenas ligeras y/o una o todas (por ejemplo, una, dos, o tres) regiones variables de la cadena o cadenas pesadas de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón) puede cada una estar unida a una región constante humana, tal como, sin limitación, una región constante humana de IgG1. Los anticuerpos quiméricos típicamente son menos inmunogénicos para los seres humanos, respecto a anticuerpos no quiméricos, y por tanto ofrecen beneficios terapéuticos en ciertas situaciones. Los expertos en la materia serán conscientes de anticuerpos quiméricos, y también serán conscientes de técnicas adecuadas para su generación. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.816.567; 4.978.775; 4.975.369; y la patente de Estados Unidos n.º 4.816.397.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpos completamente humanos" son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que contienen solamente secuencias de aminoácidos derivadas de seres humanos. Por ejemplo, un anticuerpo completamente humano puede producirse a partir de una célula B humana o una célula de hibridoma humana. En realizaciones adicionales, el anticuerpo puede producirse a partir de un animal transgénico que contiene el locus para una inmunoglobulina de cadena pesada humana y una inmunoglobulina de cadena ligera humana, o contiene un ácido nucleico que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano específico.

"Región determinante de complementariedad" o "CDR" según se usan las expresiones en el presente documento se refieren a cortas secuencias polipeptídicas dentro de la región variable de polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera que son principalmente responsables de mediar el reconocimiento de antígeno específico. Las CDR se han descrito por Kabat, y col., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616, 1977; Chothia y col., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; y MacCallum y col., J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996. Existen tres CDR (llamadas CDR1, CDR2, y CDR3) dentro de cada VL y cada VH.

"Fragmento" o "fragmento de anticuerpo" según se usan las expresiones en el presente documento se refieren a un polipéptido derivado de una molécula polipeptídica de anticuerpo (por ejemplo, un polipéptido de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo) que no comprende un polipéptido de anticuerpo de longitud completa, pero que aún comprende al menos una parte de un polipéptido de anticuerpo de longitud completa que es capaz de unirse a un antígeno. Los fragmentos de anticuerpo pueden comprender una parte escindida de un polipéptido de anticuerpo de longitud completa, aunque la expresión no se limita a dichos fragmentos escindidos. Los fragmentos de anticuerpo pueden incluir, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos scFv (Fv de cadena sencilla), anticuerpos lineales, fragmentos de anticuerpo monoespecífico o multiespecífico tales como anticuerpos biespecíficos,

triespecíficos, y multiespecíficos (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), minicuerpos, anticuerpos recombinantes quelantes, tricuerpos o bicuerpos, intracuerpos, nanocuerpos, agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, anticuerpos camelizados, y anticuerpos que contienen VHH. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno.

"Región flanqueante" como se usa la expresión en el presente documento se refiere a secuencias de aminoácidos dentro de la región variable de polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera que no son secuencias CDR, y son principalmente responsables de mantener el correcto posicionamiento de las secuencias CDR para permitir la unión al antígeno. Aunque las regiones flanqueantes en sí mismas típicamente no participan directamente en la unión al antígeno, como se sabe en la técnica, ciertos restos dentro de las regiones flanqueantes de ciertos anticuerpos pueden participar directamente en la unión al antígeno o pueden afectar a la capacidad de uno o más aminoácidos en las CDR de interaccionar con el antígeno.

"Anticuerpo humanizado" como se usa la expresión en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se ha modificado por ingeniería para que comprenda una o más regiones flanqueantes humanas en la región variable junto con regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas (por ejemplo, ratón, rata, o hámster) de la cadena pesada y/o ligera. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende secuencias que son completamente humanas excepto por las regiones CDR. Los anticuerpos humanizados típicamente son menos inmunogénicos para los seres humanos, respecto a anticuerpos no humanizados, y por tanto ofrecen beneficios terapéuticos en ciertas situaciones. Los anticuerpos humanizados son conocidos en la técnica, y también se conocen técnicas adecuadas para generar anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Hwang y col., *Methods* 36:35, 2005; Queen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033, 1989; Jones y col., *Nature* 321:522-25, 1986; Riechmann y col., *Nature* 332:323-27, 1988; Verhoeyen y col., *Science* 239:1534-36, 1988; Orlandi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833-3837, 1989; patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370; y documento WO 90/07861.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad asociada a Th2" se refiere a una enfermedad asociada con una respuesta anormal de células auxiliares T tipo 2 (Th2).

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad cardiovascular" se refiere a un trastorno del corazón y los vasos sanguíneos, e incluye trastornos de las arterias, venas, arteriolas, vénulas, y capilares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad pulmonar" se refiere a un trastorno de los pulmones.

Por la expresión "marcador adicional" se entiende una proteína, ácido nucleico, lípido o carbohidrato, o una combinación (por ejemplo, dos o más) de los mismos, que es diagnóstico de la presencia de una enfermedad particular. Los procedimientos descritos en el presente documento para diagnosticar a un sujeto como que tiene una enfermedad pueden incluir la detección de un nivel de ST2 humana soluble y al menos un marcador adicional en una muestra del sujeto. Se conocen en la técnica varios marcadores adicionales útiles para el diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP, BNP, troponina, CRP, creatinina, nitrógeno de urea en sangre (BUN), enzimas de función hepática, albúmina, y endotoxina bacteriana; y los marcadores descritos en las solicitudes de patente de Estados Unidos n.º: 2007/0248981; 2011/0053170; 2010/0009356; 2010/0055683; 2009/0264779).

Por la expresión "hipertrigliceridemia" se entiende un nivel de triglicéridos que es mayor de o igual a 180 mg/dl (por ejemplo, mayor de o igual a 200 mg/dl).

Por el término "hipercolesterolemia" se entiende un nivel aumentado de al menos una forma de colesterol o colesterol total en un sujeto. Por ejemplo, un sujeto con hipercolesterolemia puede tener un nivel de lipoproteína de alta densidad (HDL) de  $\geq 40$  mg/dl (por ejemplo,  $\geq 50$  mg/dl o  $\geq 60$  mg/dl), un nivel de lipoproteína de baja densidad (LDL) de  $\geq 130$  mg/dl (por ejemplo,  $\geq 160$  mg/dl o  $\geq 200$  mg/dl), y/o un nivel de colesterol total  $\geq 200$  mg/dl (por ejemplo, 240 mg/dl).

Por el término "hipertensión" se entiende un nivel aumentado de presión sanguínea sistólica y/o diastólica. Por ejemplo, un sujeto con hipertensión sanguínea sistólica que es  $\geq 120$  mmHg (por ejemplo,  $\geq 140$  mmHg o  $\geq 160$  mmHg) y/o una presión sanguínea diastólica que es  $\geq 80$  mmHg (por ejemplo,  $\geq 90$  mmHg o 100 mmHg).

Por la expresión "sujeto sano" se entiende un sujeto que no tiene una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, o enfermedad pulmonar). Por ejemplo, un sujeto sano no se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad y no está presentando uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) síntomas de una patología.

Por "riesgo de muerte" se entiende el riesgo de muerte en un sujeto por una enfermedad o complicaciones asociadas con una enfermedad en comparación con una población de referencia (por ejemplo, una población de control sana). La expresión riesgo de muerte como se usa en el presente documento excluye muerte intencionada o accidental, por ejemplo, muerte por traumatismo contundente o por aplastamiento, tal como un accidente de coche.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la cual pertenece la presente

invención. Se describen en este documento procedimientos y materiales para su uso en la presente invención. También pueden usarse otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

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

### **Descripción de los dibujos**

10 La FIG. 1 es una imagen que muestra los resultados de análisis de gel SDS-PAGE de fracciones de la purificación de la proteína ST2 soluble humana recombinante. Los carriles (10 µl por carril de muestra) son los siguientes: 1 - MWM (5 µl); 2 - escala His (3 µl); 3 - control negativo sin transfectar; 4 - sobrenadante antes de purificación; 5 - flujo continuo de columna; 6 - lavado con tampón de unión 1; 7 - lavado 5 mM 2; 8 - lavado 5 mM 3; 9 - fracción de eluato 200 mM 2; 10 - fracción de eluato 200 mM 3; 11 - fracción de eluato 200 mM 4; 12 - fracción de eluato 200 mM 5; 13 - fracción de eluato 200 mM 6; 14 - fracción de eluato 200 mM 7; y 15 - 0,3 µg de ST2 soluble.

15 La FIG. 2 muestra una transferencia de Western de fracciones de purificación que detecta la marca histidina en la proteína ST2 soluble humana recombinante. Los carriles (10 µl por carril) son los siguientes: 1 - MWM (5 µl); 2 - escala His (3 µl); 3 - sobrenadante antes de purificación; 4 - flujo continuo de columna; 5 - lavado con tampón de unión 1; 6 - lavado con tampón de unión 2; 7 - lavado 5 mM 2; 8 - lavado 5 mM 3; 9 - fracción de eluato 200 mM 2; 10 - fracción de eluato 200 mM 3; 11 - fracción de eluato 200 mM 4; 12 - fracción de eluato 200 mM 5; 13 - fracción de eluato 200 mM 6; 14 - fracción de eluato 200 mM 7; y 15 - 0,3 µg de ST2 soluble.

20 Las FIG. 3A-3C muestran un gel de Coomassie (FIG. 3A) y dos transferencias de Western de ST2 soluble recombinante purificada que compara el anticuerpo comercial anti-ST2 D066 (MBL International) (FIG. 3B) con el anticuerpo contra hexa-histidina (FIG. 3C). Los carriles (10 µl/carril de muestra) con los siguientes: 1 - MWM; 2 - escala His; 3 - ST2-His en suero 1000 ng; 4 - ST2-His en suero 500 ng; 5 - ST2-His en suero 200 ng; 6 - ST2-His en suero 100 ng; 7 - ST2-His en suero 50 ng; 8 - ST2-His libre de suero 1000 ng; 9 - ST2-His libre de suero 500 ng; 10 - ST2-His libre de suero 200 ng; 11 - ST2-His libre de suero 100 ng; y 12 - ST2-His libre de suero 50 ng.

25 La FIG. 4 es un gráfico lineal que muestra los resultados de una evaluación de sensibilidad a antígeno de los anticuerpos 7E4 y 9F8.

30 La FIG. 5 es un gráfico lineal que muestra los resultados de una evaluación de sensibilidad a antígeno de los anticuerpos 7E4 y 9F8. Los anticuerpos 7E4 y 9F8 se recubrieron sobre pocillos individuales de una placa de 96 pocillos a concentraciones que variaban de 5 µg/ml a 0 y se ensayaron frente a una única concentración de ST2 soluble recombinante conjugada con biotina.

35 La FIG. 6 es un gráfico lineal que muestra los resultados de ensayo para su capacidad de usarse juntos en una configuración de inmunoensayo enzimático (EIA) tipo sándwich de anticuerpo monoclonal, en el que se biotiniló el anticuerpo 7E4 o el 9F8.

40 Las FIG. 7A-7F son seis gráficos que muestran los resultados del análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la formación de complejo anticuerpo-antígeno. La FIG. 7A muestra el análisis SPR del anticuerpo 9F8 (L1). La FIG. 7B muestra el análisis SPR del anticuerpo 7E4 (L2). La FIG. 7C muestra el análisis SPR de anticuerpo 11A7 (L3). La FIG. 7D muestra el análisis SPR del anticuerpo D066 (L4). La FIG. 7E muestra el análisis SPR del anticuerpo D067 (L5). La FIG. 7F muestra el análisis SPR de un anticuerpo irrelevante (L6).

45 Las FIG. 8A-8F son seis gráficos que muestran los resultados de análisis SPR de la formación del complejo anticuerpo-antígeno. La FIG. 8A muestra el análisis SPR del anticuerpo 9F8 (L1). La FIG. 8B muestra el análisis SPR del anticuerpo 7E4 (L2). La FIG. 8C muestra el análisis SPR de anticuerpo 11A7 (L3). La FIG. 8D muestra el análisis SPR del anticuerpo 15D6 (L4). La FIG. 8E muestra el análisis SPR del anticuerpo D066 (L5). La FIG. 8F muestra el análisis SPR del anticuerpo D067 (L6).

La FIG. 9 es un diagrama de cajas y bigotes que muestra las concentraciones de ST2 soluble humana por tipo de tubo de anticoagulante.

La FIG. 10 es un histograma que muestra la distribución de concentración de ST2 soluble humana de donantes sanos normales.

50 La FIG. 11 es un diagrama de cajas y bigotes que muestra las concentraciones de ST2 soluble humana como una función del género y edad en donantes sanos normales.

### **Descripción detallada**

En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a ST2 soluble humana, kits que contienen estos anticuerpos y fragmentos y procedimientos de uso de estos anticuerpos y fragmentos.

### **55 ST2**

60 El gen ST2 es un miembro de la familia del receptor de interleuquina 1 cuyo producto proteico existe tanto como una forma transmembrana así como un receptor soluble que es detectable en suero Kieser y col., FEBS Lett. 372(2-3):189-193, 1995; Kumar y col., J. Biol. Chem. 270(46):27905-27913, 1995; Yanagisawa y col., FEBS Lett. 302(1):51-53, 1992; Kuroiwa y col., Hybridoma 19(2): 151-159, 2000). ST2 soluble se describió como marcadamente regulado positivamente en un modelo experimental de fallo cardíaco (Weinberg y col., Circulation 106(23):2961-



2966, 2002), y los datos sugieren que las concentraciones de ST2 soluble humana también están elevadas en aquellos con fallo cardiaco grave crónico (Weinberg y col., *Circulation* 107(5):721-726, 2003), así como en aquellos con infarto de miocardio agudo (Shimpo y col., *Circulation* 109(18):2186-2190, 2004).

5 Sin el desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la forma transmembrana de ST2 desempeña un papel en la modulación de respuestas de células T auxiliares tipo 2 (Lohning y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(12):6930-6935, 1998; Schmitz y col., *Immunity* 23(5):479-490, 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):373-379, 2004), mientras que la forma soluble de ST2 está regulada positivamente en fibroblastos estimulados por el crecimiento (Yanagisawa y col., 1992, *supra*). Los datos experimentales sugieren que el gen ST2 está marcadamente regulado positivamente en  
10 estados de estiramiento de los cardiomiocitos (Weinberg y col., 2002, *supra*) de un modo análogo a la inducción del gen BNP (Bruneau y col., *Cardiovasc. Res.* 28(10):1519-1525, 1994).

15 Tominaga y col., (*FEBS Lett.* 258:301-304, 1989) aislaron genes murinos que se expresaban específicamente por estimulación del crecimiento en células BALB/c-3T3. Haga y col. (*Eur. J. Biochem.* 270:163-170, 2003) describe que el gen ST2 se nombró en base a su inducción por estimulación del crecimiento. El gen ST2 codifica dos productos proteicos: ST2 o sST2 que es una forma secretada soluble, y ST2L, una forma de receptor transmembrana que es muy similar a los receptores de interleuquina 1. El Comité de Nomenclatura HUGO denominó el homólogo humano de ST2, cuya clonación se describió en Tominaga y col., *Biochim. Biophys. Acta.* 1171:215-218, 1992, como receptor de interleuquina 1 tipo 1 (IL1RL1). Los dos términos se usan de forma intercambiable en el presente documento.

20 La secuencia de ARNm de la isoforma soluble más corta de ST2 humano puede encontrarse en el n.º de referencia de GenBank NM\_003856.2 (SEQ ID NO: 2), y la secuencia polipeptídica está en el n.º de referencia de GenBank NP\_003847.2 (SEQ ID NO: 1). La secuencia de ARNm para la forma más larga de ST2 humana está en el n.º de referencia de GenBank NM\_016232.4 (SEQ ID NO: 4), y la secuencia polipeptídica está en el n.º de referencia de GenBank NP\_057316.3 (SEQ ID NO: 3). Está disponible información adicional en las bases de datos públicas en  
25 GenID: 9173, MIM ID n.º 601203, y UniGene n.º Hs.66. En general, en los procedimientos descritos en el presente documento, se mide la forma soluble humana del polipéptido ST2.

#### Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno

30 Se proporcionan en el presente documento anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a ST2 soluble humana. Los anticuerpos proporcionados y fragmentos de los mismos pueden unirse de forma competitiva con un anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432 (correspondiente a los anticuerpos 7E4 y 9F8, respectivamente). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento no se une de forma competitiva con el anticuerpo D066-3 y D067-3 (MBL International) (descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7.087.396), y tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana igual a o menor de  $1,51 \times 10^{-9}$  M. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana igual a o menor de  $8,59 \times 10^{-10}$  M. Los procedimientos para determinar la afinidad ( $K_D$ ) de un anticuerpo o fragmento para la unión a ST2 soluble humana se describen en el presente documento (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial) y procedimientos adicionales que son conocidos en la técnica. También se proporcionan anticuerpos monoclonales 7E4 y 9F8, producidos por los procedimientos descritos en el presente documento, y fragmentos de unión a antígeno de los  
40 mismos.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "se une de forma competitiva" se refiere a la situación por la cual la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un antígeno dado disminuye la unión de un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo a ese mismo antígeno. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento se une de forma competitiva con otro anticuerpo o fragmento cuando los dos anticuerpos o fragmentos se unen sustancialmente al mismo epítipo presente en un antígeno dado (por ejemplo, ST2 soluble humana). Como se muestra en más detalle en los siguientes ejemplos, cada uno de los anticuerpos producido por los hibridomas denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y PTA-10432 reconoce un epítipo que es diferente de otros diversos anticuerpos que se ensayaron (por ejemplo, anticuerpos D066-3 y D067-3 de MBL International), y por tanto no se une de forma competitiva con esos anticuerpos de ensayo. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento se une a un epítipo en ST2 soluble humana que se reconoce por un anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. Se describen en el presente documento procedimientos para determinar si dos anticuerpos o fragmentos diferentes se unen de forma competitiva y son conocidos en la técnica (por ejemplo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas competitivos).

55 En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos se unen o muestran unión mejorada a un epítipo presente en la proteína ST2 soluble humana recombinante que se produce a partir de una célula humana (por ejemplo, un fibroblasto humano, célula epitelial, endotelial, o neuronal, una célula embrionaria o adulta, o una célula renal embrionaria humana, por ejemplo, HEK293) que no está presente en una ST2 soluble humana recombinante producida en un tipo celular no humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos se unen o muestran  
60 unión mejorada a un epítipo presente en una proteína ST2 soluble humana completamente glucosilada (por

ejemplo, una proteína ST2 soluble humana aislada de células humanas) que no está presente en una proteína ST2 soluble humana recombinante que no está glucosilada o está mal glucosilada o infragucosilada (por ejemplo, no está completamente glucosilada o está glucosilada en un patrón (por ejemplo, número, posición, y/o tipo de azúcar o azúcares) que no está presente en la ST2 soluble humana nativa presente en un ser humano, por ejemplo, en suero humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se unen a ST2 soluble humana nativa mejor (por ejemplo, con afinidad aumentada) respecto a otros anticuerpos disponibles en el mercado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 (el anticuerpo 7E4), o es un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 (fragmentos del anticuerpo 7E4). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432 (el anticuerpo 9F8), o es un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432 (fragmentos del anticuerpo 9F8). Son útiles combinaciones de dos o más de los anticuerpos o fragmentos descritos en el presente documento (por ejemplo, dos o más de un anticuerpo 7E4, fragmentos de anticuerpo 7E4, anticuerpo 9F8, y fragmentos de anticuerpo 9F8) en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los anticuerpos monoclonales de unión a ST2 soluble humana producidos por los hibridomas denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y Designación de Depósito de Patente PTA-10432 se generaron cada uno inmunizando un mamífero no humano con una ST2 soluble humana recombinante aislada de células renales embrionarias humanas (HEK)-293. ST2 soluble humana tiene una cantidad/número significativo de modificaciones post-traduccionales. En base a su secuencia de aminoácidos, ST2 soluble humana tiene un peso molecular predicho de aproximadamente 36 kDa. Sin embargo, la proteína nativa tiene un peso molecular de aproximadamente 58 kDa, debido a la presencia de modificaciones post-traduccionales. Como se sabe en la técnica, dichas modificaciones post-traduccionales pueden tener un efecto sobre la capacidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unirse a una proteína dada. Por tanto, como se describe en mayor detalle en la siguiente sección de Ejemplos, los anticuerpos monoclonales de unión a ST2 soluble humana producidos por los hibridomas denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 tienen mayor afinidad por ST2 soluble humana nativa que otros anticuerpos, y por lo tanto son útiles como reactivos de diagnóstico y otros reactivos.

En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento comprende la cadena pesada y/o ligera (o un fragmento de la misma) del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y/o PTA-10432. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera (o un fragmento de la misma) del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y/o PTA-10432.

Como se sabe en la técnica, una especificidad de anticuerpo hacia un antígeno dado está mediada por las regiones variables de cadena pesada y ligera. En particular, la especificidad de un anticuerpo hacia un antígeno dado está principalmente determinada por cortas secuencias dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera llamadas regiones determinantes de complementariedad, o CDR. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento contiene una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) CDR de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y/o PTA-10432. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento comprende cada una de las CDR de la cadena pesada del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento comprende cada una de las CDR de la cadena ligera del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento comprende cada una de las CDR del anticuerpo (todas las CDR de cadena pesada y ligera) producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432.

También se proporcionan anticuerpos aislados y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno que se unen específicamente a ST2 soluble humana que se producen por un procedimiento que incluye inmunizar un mamífero no humano con una ST2 soluble humana recombinante aislada de una célula renal (por ejemplo, una célula renal humana, una célula renal embrionaria, y una célula renal embrionaria humana). En algunas realizaciones, la ST2 soluble humana recombinante está completamente glucosilada o contiene todas las modificaciones post-traduccionales presentes en la proteína ST2 soluble nativa.

En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento es quimérico porque comprende al menos una región constante humana. Por ejemplo, las regiones constantes de los anticuerpos producidos por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432 pueden reemplazarse con una región constante humana. Los anticuerpos quiméricos típicamente son menos inmunogénicos para los seres humanos, respecto a anticuerpos no quiméricos, y por tanto ofrecen beneficios terapéuticos en ciertas situaciones. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico descrito en el presente

documento comprende una región constante de IgG1. Los expertos en la materia serán conscientes de una diversidad de regiones constantes humanas. Los procedimientos para preparar anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica.

5 En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento está humanizado porque comprende al menos una región flanqueante humana. Por ejemplo, una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones flanqueantes de los anticuerpos producidos por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432, pueden reemplazarse con una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones flanqueantes humanas. Los anticuerpos humanizados típicamente son menos inmunogénicos para los seres humanos, respecto a anticuerpos no humanizados, y por tanto ofrecen beneficios terapéuticos en ciertas situaciones. Los expertos en la materia serán conscientes de una diversidad de regiones flanqueantes humanas. Los procedimientos para preparar anticuerpos humanizados son conocidos en la técnica.

10 Por ejemplo, pueden usarse procedimientos basados en homología de CDR para la humanización (véase, por ejemplo, Hwang y col., *Methods* 36:35, 2005). Estos procedimientos generalmente implican la sustitución de CDR no humanas en una región flanqueante de dominio variable humano basada en CDR no humanas y humanas estructuradas de forma similar, en lugar de regiones flanqueantes no humanas y humanas estructuradas de forma similar. La similitud de las CDR no humanas y humanas se determina generalmente identificando genes humanos del mismo tipo de cadena (ligera o pesada) que tienen la misma combinación de estructuras CDR canónicas que las moléculas de unión no humanas (por ejemplo, de ratón) y por tanto retienen la conformación tridimensional de las estructuras peptídicas de CDR. En segundo lugar, para cada uno de los genes variables candidatos con estructuras canónicas coincidentes, se evalúa la homología resto a resto entre las CDR no humanas y humanas candidatas. Finalmente, para generar una molécula de unión humanizada, los restos CDR de la CDR candidata humana elegida que ya no son idénticos a la CDR no humana se convierten en la secuencia no humana (por ejemplo, de ratón). En algunas realizaciones, no se introducen mutaciones de la región flanqueante humana en la molécula de unión humanizada.

25 En algunas realizaciones, la sustitución de CDR no humanas en una región flanqueante de dominio variable humano se basa en la retención de la orientación espacial correcta de la región flanqueante de dominio variable no humano identificando regiones flanqueantes de dominio variable humano que retendrán la misma conformación que las regiones flanqueantes de dominio variable no humano de las cuales se obtuvieron las CDR. En algunas realizaciones, esto se consigue obteniendo los dominios variables humanos de moléculas de unión humanas cuyas secuencias flanqueantes muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios flanqueantes variables no humanos de los cuales se obtuvieron las CDR. Véase, por ejemplo, Kettleborough y col., *Protein Engineering* 4:773, 1991; Kolbinger y col., *Protein Engineering* 6:971, 1993; y el documento WO 92/22653.

35 En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento es monoespecífico porque reconoce solamente un único epítipo. Los anticuerpos monoespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO/9639858). En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento es biespecífico porque reconoce más de un epítipo (por ejemplo, dos epítipos). Los anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0162360). En algunas realizaciones, los anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos o fragmentos descritos en el presente documento se unen al epítipo reconocido por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico o fragmento se une a ST2 soluble humana, así como a un polipéptido no ST2 diferente. En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico o fragmento se une a dos epítipos diferentes de ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento es divalente (véase, por ejemplo, el documento WO/1999/064460). Para una descripción adicional de otros tipos de anticuerpos y fragmentos que pueden incluir una o más de las CDR de los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432, véanse la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20070105199 y el documento WO/2007/059782.

50 En algunas realizaciones, se obtiene un fragmento (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) de una molécula de anticuerpo completo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede escindirse, por ejemplo, en el lado carboxi terminal de su región bisagra (por ejemplo, con pepsina) para generar un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o en el lado amino terminal de su región bisagra (por ejemplo, con papaína) para generar fragmentos Fab. En algunas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento scFv, un anticuerpo lineal, un fragmento de anticuerpo multiespecífico tal como un anticuerpo biespecífico, trispecífico, o multiespecífico (por ejemplo, un diacuerpo, un triacuerpo, o un tetracuerpo), un minicuerpo, un anticuerpo recombinante quelante, un intracuerpo, un nanocuerpo, un agente inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, un anticuerpo camélido, o un anticuerpo que contiene V<sub>HH</sub>. Los procedimientos para producir estos fragmentos son conocidos en la técnica.

60 En algunas realizaciones, un anticuerpo de unión a ST2 soluble humana o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno descrito en el presente documento contiene un polipéptido que tiene una o más sustituciones, deleciones, o inserciones de aminoácido en comparación con la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo producido por el

5 hibridoma denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. Las sustituciones, delecciones, o inserciones pueden introducirse por técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR, de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA- 10431 o PTA-10432 (por ejemplo, o un ácido nucleico que codifica una o más (por ejemplo, una, dos, o tres) de las regiones CDR de la cadena pesada o ligera). En algunas realizaciones, se hacen sustituciones conservativas de aminoácido en una o más posiciones. Una "sustitución conservativa de aminoácido" es una en que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación-beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano; histidina). Por tanto, un resto de aminoácido en un polipéptido de un anticuerpo anti-ST2 soluble humana o un fragmento de anticuerpo de unión a ST2 soluble humana puede reemplazarse con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

10 En algunas realizaciones, un anticuerpo de unión a ST2 soluble humana o un fragmento de anticuerpo de unión a ST2 soluble humana descrito en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica a la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432 (por ejemplo, o al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica a al menos una (por ejemplo, una, dos, o tres) CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432). Por ejemplo, un anticuerpo de unión a ST2 soluble humana o un fragmento de anticuerpo de unión a ST2 soluble humana descrito en el presente documento puede comprender una o más CDR que contienen una o más sustituciones, delecciones, o inserciones de aminoácido en la secuencia CDR correspondiente encontrada en una cadena pesada o ligera del anticuerpo producido por el hibridoma denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432.

15 En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento contienen dos o más anticuerpos diferentes de unión a ST2 soluble humana o fragmentos de anticuerpo de unión a ST2 soluble humana descritos en el presente documento. Por ejemplo, una composición descrita en el presente documento puede contener anticuerpos producidos por cada uno de los hibridomas denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 y PTA-10432. Como se describe en más detalle en la siguiente sección de Ejemplos, dicha combinación de anticuerpos muestra afinidad aumentada por el antígeno ST2 en comparación con cualquier anticuerpo individualmente, y en comparación con otros anticuerpos disponibles en el mercado. Dichas composiciones que contienen los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento serán útiles en una diversidad de procedimientos, por ejemplo, procedimientos de diagnóstico. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento contienen dos o más diferentes fragmentos de unión a ST2 (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab)<sub>2</sub>, o fragmentos scFv), tales como fragmentos derivados de anticuerpos producidos por los hibridomas denominados por la Designación de Depósito de Patente PTA- 10431 o PTA-10432.

20 En cualquiera de los procedimientos anteriores, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede glucosilarse o marcarse. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden marcarse con una sustancia detectable incluyendo, aunque sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, 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, diclorotriacilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, puntos cuánticos, o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, o <sup>3</sup>H.

## 50 **Hibridomas**

También se proporcionan en el presente documento nuevos hibridomas que producen anticuerpos que se unen a ST2 soluble humana. Como se sabe en la técnica, el término "hibridoma" se refiere a una célula que se produce por la fusión de un linfocito productor de anticuerpos y una célula cancerosa no productora de anticuerpos, habitualmente un mieloma o linfoma. Después de la fusión, los hibridomas proliferan y producen el anticuerpo monoclonal específico que se produjo originalmente por el linfocito fusionado. En algunas realizaciones, el hibridoma proporcionado es un hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432. En algunas realizaciones, también se proporcionan células individuales, células recogidas, y cultivos que contienen células que se obtuvieron del hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-10432

### Procedimientos de uso de los anticuerpos y fragmentos proporcionados

5 Puede usarse uno o más de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento en procedimientos para cuantificar un nivel de ST2 soluble humana en una muestra, por ejemplo, una muestra de un sujeto, especialmente para predecir el riesgo de muerte en un año, determinar si dar el alta o iniciar o continuar el tratamiento de un sujeto en una base hospitalaria, seleccionar un sujeto para su participación en un estudio clínico, diagnosticar a un sujeto como que tiene una enfermedad, o identificar un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad.

### Procedimientos de cuantificación de un nivel de ST2 soluble humana

10 Se proporcionan en el presente documento procedimientos para determinar un nivel de ST2 soluble humana en una muestra de un sujeto que incluye poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento; y detectar la unión del anticuerpo o fragmento a ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, se usan al menos dos (por ejemplo, dos, tres, o cuatro) anticuerpos o fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento para determinar un nivel de ST2 soluble humana en una muestra de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto está sin diagnosticar o no está presentando uno o más (por ejemplo, 15 dos, tres o cuatro) síntomas de una enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad asociada con niveles elevados de ST2 (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, apoplejía, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto tiene una o más (por ejemplo, dos, tres, o cuatro) de: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, insuficiencia renal, y un índice de masa corporal de  $\geq 30$ . En algunas realizaciones, la muestra contiene sangre, suero o plasma.

20 En algunas realizaciones, la muestra puede recogerse del sujeto por un profesional sanitario (por ejemplo, un flebotomista, un médico, una enfermera, un auxiliar médico, o un técnico de laboratorio). La muestra puede almacenarse (por ejemplo,  $\leq 4$  °C,  $\leq 0$  °C, o a  $-80$  °C) durante un periodo de tiempo antes de que la muestra se ponga en contacto con al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento, y se detecta la unión del anticuerpo o fragmento. Los procedimientos para poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y detectar la unión del anticuerpo o fragmento se describen en el presente documento y se conocen procedimientos adicionales en la técnica. La cuantificación también puede incluir experimentos de control para detectar la unión del al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento a una ST2 soluble humana purificada recombinante (por ejemplo, una ST2 soluble humana recombinante aislada de 25 células renales embrionarias humanas).

30 En algunas realizaciones, se cuantifica el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto normal o sano. Un sujeto normal o sano es un sujeto que no padece una afección asociada con ST2 (por ejemplo, una afección asociada con ST2 como se describe en el presente documento), no está diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento), y no presenta dos o más (por ejemplo, dos, 35 tres, o cuatro) síntomas de una enfermedad. Los sujetos normales o sanos pueden confirmarse por cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo sin limitación, detección de biomarcadores o examen físico (por ejemplo, por manifestación externa de la ausencia de dos o más síntomas asociados con una afección asociada con ST2 o cualquier otra enfermedad descrita en el presente documento). Por ejemplo, los sujetos normales o sanos pueden explorarse para la ausencia de CVD oculta o enfermedad inflamatoria detectando niveles 40 bajos de uno o más marcadores incluyendo, aunque sin limitación, péptido natriurético cerebral (BNP), procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (CRP), e interleuquina-6 (IL-6). Los expertos en la materia serán conscientes de otros marcadores adecuados para determinar que un sujeto normal o sano no muestra CDV oculta o enfermedad inflamatoria, o cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento.

45 La cuantificación de los niveles de ST2 soluble humana en una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto normal o sano) es útil en una diversidad de circunstancias. En algunas realizaciones, pueden cuantificarse los niveles de ST2 soluble humana de sujetos (por ejemplo, sujetos normales o sanos, sujetos que tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad, sujetos diagnosticados con enfermedad, o sujetos que presentan dos o más síntomas de una enfermedad) a intervalos periódicos, por ejemplo, diariamente, semanalmente, bimensualmente, mensualmente, bimensualmente, anualmente, etc., o en un examen físico periódico. Cualquiera de una diversidad 50 de técnicas conocidas para los expertos en la materia, incluyendo aquellas descritas en el presente documento, puede usarse para cuantificar los niveles de ST2 soluble humana en un sujeto usando los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos descritos en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, se cuantifica el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto normal o sano) para llegar a un nivel de referencia para su uso en la determinación de que un sujeto no tiene una afección asociada con ST2, está en riesgo de desarrollar una enfermedad, o está en riesgo de muerte en un año. Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de ST2 soluble humana en un sujeto que no padece una enfermedad, tal como, sin limitación, una enfermedad cardiovascular, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, apoplejía, una enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, o una enfermedad asociada con Th2, o cualquier otra enfermedad descrita en el presente documento, para llegar a un 60 nivel de referencia de ST2 soluble humana.

En algunas realizaciones, al menos uno de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno desvelados en el presente documento puede usarse en la cuantificación de los niveles de ST2 soluble humana en un sujeto (por ejemplo, un sujeto normal o sano). Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de ST2 soluble humana en un sujeto (por ejemplo, un sujeto normal o sano) en inmunoensayos usando al menos uno de cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento que se une de forma competitiva con un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la ATCC y que está denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-104312, o ambos).

En algunas realizaciones, se cuantifica el nivel de ST2 soluble humana en una muestra para asegurar la reproducibilidad de la realización rutinaria, intervalos de referencia, puntos de corte clínicos, y similares. Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de ST2 soluble humana en dos o más muestras, por ejemplo, muestras de referencia, y puede evaluarse el coeficiente de variación ("CV") entre los niveles de ST2 soluble humana de las dos o más muestras. Adicionalmente o como alternativa, puede cuantificarse el nivel de ST2 soluble humana en la muestra (o sujeto) dos o más veces diferentes (por ejemplo, usando diferentes lotes de una muestra de referencia, o diferentes muestras tomadas del mismo sujeto), y puede determinarse el CV entre los niveles de ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, el CV entre los niveles de ST2 soluble humana es de menos del 20 %, por ejemplo, menos del 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para determinar si un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana. La determinación de si un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana es útil en una diversidad de circunstancias. En algunas realizaciones, los procedimientos para determinar si un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana comprenden ensayar el nivel de ST2 soluble humana en una muestra del sujeto (por ejemplo, cualquiera de las muestras descritas anteriormente tales como, sin limitación, muestras que contienen sangre, suero, o plasma), en los que se determina que el sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en la muestra se encuentra que es sustancialmente similar al nivel normal o medio conocido de ST2 soluble humana, o si el nivel de ST2 soluble humana en la muestra cae dentro de un cierto intervalo, por ejemplo, alrededor de un nivel normal o medio conocido de ST2 soluble humana (por ejemplo, el intervalo de confianza del 95 % o el rango intercuartil, o cualquiera de los intervalos enumerados en la tabla 9). Por ejemplo, puede determinarse que un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si se ensaya una muestra del sujeto, y el nivel de ST2 soluble humana en la muestra se encuentra que está dentro del intervalo de confianza del 95 % alrededor de un nivel normal o medio conocido de ST2 soluble humana, por ejemplo, un nivel medio en un sujeto normal o sano. Adicionalmente o como alternativa, puede determinarse que un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si se ensaya una muestra del sujeto, y el nivel de ST2 soluble humana en la muestra se encuentra que está dentro del rango intercuartil alrededor de un nivel normal o medio conocido de ST2 soluble humana.

En algunas realizaciones, se determina que un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra del sujeto es de aproximadamente 18,8 ng/ml. En algunas realizaciones, se determina que un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra está dentro de un intervalo de aproximadamente 14,5 a aproximadamente 25,3 ng/ml. En algunas realizaciones, se determina que un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra está dentro de un intervalo de aproximadamente 18,1 a aproximadamente 19,9 ng/ml.

En algunas realizaciones, se determina que un sujeto mujer tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra del sujeto es de aproximadamente 16,2 ng/ml. En algunas realizaciones, se determina que una mujer tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra está dentro de cualquiera de los intervalos enumerados en la tabla 9.

En algunas realizaciones, se determina que un sujeto hombre tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra del sujeto es de aproximadamente 23,6 ng/ml. En algunas realizaciones, se determina que un hombre tiene un nivel normal de ST2 soluble humana si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra está dentro de cualquiera de los intervalos enumerados en la tabla 9.

En algunas realizaciones, se determina que el sujeto (por ejemplo, sujeto hombre o mujer) tiene un nivel normal de ST2 soluble si el nivel de ST2 soluble humana en una muestra del sujeto está por debajo de un umbral (por ejemplo, 25,3 ng/ml o 19,9 ng/ml (para mujeres) o 30,6 ng/ml (para hombres)).

La expresión "aproximadamente" o "sustancialmente igual" como se usa en referencia a un valor o intervalo de niveles de ST2 soluble humana (por ejemplo, un intervalo de niveles normales de ST2 soluble humana) en un sujeto se refiere a un intervalo alrededor del valor de referencia o intervalo, por ejemplo, un valor o intervalo que un experto en la materia consideraría equivalente al valor o intervalo de referencia (por ejemplo, cualquiera de los intervalos enumerados en la tabla 9) con el fin de evaluar los niveles de ST2 soluble humana (por ejemplo, niveles normales de ST2 soluble humana o niveles de ST2 soluble humana en un grupo de pacientes que tienen una enfermedad o presentan dos o más síntomas de la enfermedad). Como se usa en el presente documento, un valor o intervalo de niveles de ST2 soluble humana (por ejemplo, niveles normales de ST2 soluble humana) es "aproximadamente" un valor de referencia o intervalo cuando está dentro de +/- el 25 % del valor de referencia o intervalo, por ejemplo, +/-

20 %, +/-15 %, +/- 10 %, +/-9 %, +/-8 %, +/-7 %, +/-6 %, +/-5 %, +/-4 %, +/-3 %, +/-2 %, o +/-1 % del valor o intervalo.

En algunas realizaciones, puede usarse al menos uno o dos de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento en la determinación de si un sujeto tiene un nivel normal de ST2 soluble humana, un nivel de ST2 soluble humana que está correlacionado con una enfermedad, o un nivel de ST2 soluble humana que está correlacionado con un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad o un riesgo aumentado de muerte en un año.

#### **Procedimientos de predicción del riesgo de mortalidad en un año**

También se proporcionan procedimientos de predicción del riesgo de mortalidad en un sujeto en un año que incluyen obtener una muestra de un sujeto y determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento. Un nivel elevado o sustancialmente el mismo nivel de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el sujeto tiene un riesgo aumentado de muerte en un año (por ejemplo, un riesgo aumentado de muerte en un año en comparación con sujetos (por ejemplo, sujetos que tienen o están diagnosticados con la misma enfermedad) que tienen un nivel disminuido de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con el mismo nivel de referencia de ST2). Un nivel disminuido de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el sujeto tiene un riesgo inferior de muerte en un año (por ejemplo, un riesgo inferior de muerte en comparación con sujetos (por ejemplo, sujetos que tienen o están diagnosticados con la misma enfermedad) que tienen un nivel elevado o sustancialmente el mismo nivel de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con el mismo nivel de referencia de ST2 soluble humana). El nivel de riesgo de muerte en un año determinado por los procedimientos descritos en el presente documento dependerá de la patología.

En algunas realizaciones, el sujeto no está diagnosticado o no está presentando uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de una enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto tiene uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro) de: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión y un índice de masa corporal de  $\geq 30$ . En algunas realizaciones, la determinación se realiza usando al menos uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpos o fragmentos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia de ST2 soluble humana es un nivel umbral de ST2 soluble humana (por ejemplo, un nivel medio de ST2 soluble humana o un percentil (por ejemplo, percentil 75, 80, 85, 90, o 95, o cualquiera de los intervalos o concentraciones enumerados en la tabla 9) del nivel medio de ST2 soluble humana en una población de pacientes sanos, por ejemplo, una población de pacientes hombres sanos o una población de pacientes mujeres sanos). En algunas realizaciones, el nivel de referencia puede ser un nivel de ST2 soluble humana presente en una muestra de un sujeto que no presenta uno o más síntomas de una enfermedad asociada con niveles aumentados de ST2. En algunas realizaciones, el nivel de referencia puede ser un nivel de ST2 soluble humana presente en una muestra de un sujeto no diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento) o un sujeto identificado como que no está en riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). Pueden determinarse niveles adicionales de referencia por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia de ST2 soluble humana está entre aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 35 ng/ml. En algunas realizaciones, cuando el sujeto tiene fallo cardíaco, el nivel de referencia de ST2 soluble humana es entre aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 35 ng/ml. En algunas realizaciones, el nivel de referencia de ST2 soluble humana es de aproximadamente 35 ng/ml o de aproximadamente 60 ng/ml.

En algunas realizaciones, la muestra contiene sangre, suero, o plasma. La muestra puede obtenerse y la determinación del nivel de ST2 soluble humana usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento puede realizarse como se describe en el presente documento.

#### **Procedimientos de determinación de si dar el alta o iniciar o continuar el tratamiento de un sujeto en una base hospitalaria**

También se proporcionan procedimientos para determinar si dar el alta o iniciar o continuar el tratamiento de un sujeto en una base hospitalaria que incluye obtener una muestra de un sujeto y determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos uno (por ejemplo, dos) anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, donde un nivel elevado de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el tratamiento hospitalario (por ejemplo, hospitalización o admisión en una centro de ayuda asistencial) del sujeto debe iniciarse o continuarse, y un nivel disminuido o igual de ST2 soluble humana en la muestra en comparación con el nivel de referencia de ST2 soluble humana en la muestra indica que el sujeto debe darse de alta. El procedimiento puede realizarse varias veces para el mismo sujeto para determinar si el tratamiento hospitalario debe continuarse (por ejemplo, realizarse una vez cada semana, dos veces a la semana,

tres veces a la semana, una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, y cuatro veces al mes).

En algunas realizaciones, el sujeto está sin diagnosticar, no está presentando dos o más síntomas de una patología, o no se ha identificado como que está en riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto no se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento), presenta uno o más síntomas de una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento), o se ha identificado como que está en riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto tiene uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro) de: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, y un índice de masa corporal de  $\geq 30$ . En algunas realizaciones, el sujeto no se ha diagnosticado como que tiene fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la determinación del nivel de ST2 soluble humana se realiza usando al menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los niveles de referencia de ST2 soluble humana pueden ser cualquiera de los niveles de referencia descritos en el presente documento. Pueden determinarse niveles adicionales de referencia de ST2 soluble humana por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la muestra contiene sangre, suero o plasma. La muestra puede obtenerse y la determinación del nivel de ST2 soluble humana usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento puede realizarse como se describe en el presente documento.

#### **Procedimientos de selección de un sujeto para participación en un estudio clínico**

También se proporcionan procedimientos para seleccionar un sujeto para su participación en un estudio clínico. Estos procedimientos incluyen obtener una muestra de un sujeto, determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento, y seleccionar el sujeto para su participación en un estudio clínico si el nivel del sujeto de ST2 soluble humana respecto a un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que el sujeto debe seleccionarse para su participación en un estudio clínico. En algunas realizaciones, la presencia de un nivel elevado de ST2 soluble humana indica que el sujeto debe seleccionarse para su participación en un estudio clínico. En algunas realizaciones, la presencia de un nivel elevado de ST2 soluble humana indica que el sujeto debe excluirse de su participación en un estudio clínico.

En algunas realizaciones, el sujeto no está diagnosticado, no está presentando uno o más síntomas de una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento), o no se ha identificado como que está en riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado como que tiene una enfermedad (por ejemplo, fallo cardíaco, arteriopatía coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, insuficiencia renal, o apoplejía, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento), presenta uno o más síntomas de una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento), o se ha identificado como que está en bajo riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto tiene uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro) de: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, y un índice de masa corporal de  $\geq 30$ . En algunas realizaciones, la determinación se realiza usando al menos dos anticuerpos o fragmentos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los niveles de referencia de ST2 soluble humana pueden ser cualquiera de los niveles de referencia descritos en el presente documento. Pueden determinarse niveles adicionales de referencia de ST2 soluble humana por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la muestra contiene sangre, suero o plasma. La muestra puede obtenerse y la determinación del nivel de ST2 soluble humana usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

#### **Procedimientos de selección de un tratamiento**

También se proporcionan procedimientos de selección de un tratamiento terapéutico para un sujeto, que incluye obtener una muestra de un sujeto y determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos uno de los anticuerpos y fragmentos descritos en el presente documento, en los que un nivel elevado de ST2 soluble humana en la muestra respecto a un nivel de referencia de ST2 soluble humana indica que al sujeto se le debe proporcionar un tratamiento terapéutico específico. Por ejemplo, el tratamiento específico puede seleccionarse del grupo de: nitratos, bloqueantes de canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitalis, agentes moduladores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (por ejemplo, agentes bloqueantes beta adrenérgicos (por ejemplo, alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol, cebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, y nebivolol), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (por ejemplo, benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, y trandolapril), antagonistas de aldosterona (por ejemplo, espironolactona, eplerenona, canrenona



(canrenoato potásico), prorenona (prorenoato potásico), y mexrenona (mexrenoato potásico)), inhibidores de renina (por ejemplo, aliskireno, remikireno, y enalkireno), y bloqueantes del receptor de angiotensina II (por ejemplo, valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, y olmesartán)), y agentes que disminuyen el colesterol (por ejemplo, una estatina). También se conocen en la técnica procedimientos adicionales para el tratamiento, por ejemplo, Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, único volumen 9ª edición. El tratamiento específico también puede ser la administración de al menos uno o más agentes terapéuticos nuevos al sujeto, una alteración (por ejemplo, aumento o disminución) en la frecuencia, dosificación, o longitud de administración de uno o más agentes terapéuticos al sujeto, o la eliminación de al menos uno o más agentes terapéuticos del régimen de tratamiento del paciente. El tratamiento también puede, ser cuidados hospitalarios del sujeto (por ejemplo, admisión o readmisión del sujeto en un hospital (por ejemplo, una unidad de cuidados intensivos o cuidados críticos) o un centro de ayuda asistencial). En algunas realizaciones, el tratamiento es cirugía (por ejemplo, trasplante de órganos o tejidos o angioplastia).

En algunas realizaciones, los niveles de referencia de ST2 soluble humana pueden ser cualquiera de los niveles de referencia descritos en el presente documento. Pueden determinarse niveles adicionales de referencia de ST2 soluble humana por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la muestra contiene sangre, suero, o plasma. La muestra puede obtenerse y la determinación del nivel de ST2 soluble humana usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

### Procedimientos de diagnóstico de un sujeto

Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en una amplia diversidad de contextos clínicos. Por ejemplo, dichos procedimientos pueden usarse para exploración general en la población, incluyendo exploración por médicos, por ejemplo, en hospitales y consultas externas, así como la sala de urgencias.

En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en este documento son útiles para determinar la probabilidad de la presencia de una enfermedad en un sujeto. Niveles aumentados de ST2 soluble humana a menudo están asociados con la presencia de ciertas enfermedades tales como, sin limitación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, sepsis, enfermedad de Kawasaki, y enfermedades asociadas con Th2, y cualquiera de las otras enfermedades descritas en el presente documento.

Una enfermedad asociada con Th2 es una enfermedad asociada con una respuesta anormal de células T auxiliares tipo-2 (Th2). Una enfermedad asociada con Th2 se caracteriza por varios factores, incluyendo sin limitación, la presencia de TNF-alfa, IL-4, -5, -6, -10 y -13, pero no IFN-gamma (Robinson, J. Allergy Clin. Immunol. 92:313, 1993). Las células T CD4+ se clasifican de acuerdo con las citoquinas que secretan. Las células Th2 secretan grandes cantidades de interleuquina-4 (IL-4), IL-5, e IL-13, que promueven la producción de anticuerpos por células-B y la síntesis de colágeno por fibroblastos, mientras que las células Th1 secretan grandes cantidades de interferón- $\gamma$  y citoquinas proinflamatorias asociadas. Las citoquinas de tipo Th1 y tipo Th2 pueden regular de forma cruzada cada una de las otras respuestas. Se cree que un desequilibrio de respuestas Th1/Th2 contribuye a la patogénesis de diversas infecciones, respuestas alérgicas, y enfermedades autoinmunitarias. Ciertas enfermedades ejemplares asociadas con Th2 incluyen, sin limitación, lupus sistémico eritematoso y asma, así como afecciones inflamatorias que son principalmente independientes de una respuesta Th2, tal como choque séptico o traumatismo (Trajkovic y col., Cytokine Growth Factor Rev. 15:87-95, 2004; Brunner y col., Intensive Care Med. 30:1468-1473, 2004). Otras enfermedades ejemplares asociadas con Th2 incluyen preeclamsia y esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, una enfermedad asociada con Th2 es una enfermedad autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria típicamente se produce cuando el sistema inmunológico del sujeto se activa contra uno o más componentes (células, tejidos, o moléculas libres de células/tejido) del sujeto y ataca los órganos, tejidos, o células normales del propio sujeto. Enfermedades autoinmunitarias ejemplares incluyen, aunque sin limitación, resistencia a fármacos adrenérgicos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, encefalomielitis alérgica, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampollar, cardiomiopatía, síndrome de cardiotomía, dermatitis por esprue celíaco, hepatitis activa crónica, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatrizal, síndrome de CREST, enfermedad por aglutininas frías, enfermedad de Crohn, enfermedad de depósitos densos, enfermedades asociadas con efectos del trasplante de órganos, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), enteropatía sensible a gluten, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), enfermedad de Grave (incluyendo, por ejemplo, tiroiditis de Grave y oftalmopatía de Grave), Guillain-Barre, hipertiroidismo (es decir, tiroiditis de Hashimoto), fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de Addison idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, síndrome de resistencia a insulina, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, síndrome metabólico, enfermedad de tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, diabetes (por ejemplo, diabetes de Tipo I o diabetes de Tipo II), neuritis, otro fallo de glándulas endocrinas, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, poliendocrinopatías, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, infarto de miocardio, agamaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud,

policondritis recidivante, síndrome de Reiter, cardiopatía reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjorgren, síndrome del hombre rígido, lupus sistémico eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, colitis ulcerosa, urticaria, uveítis, uveítis oftálmica, vasculitis, tales como vasculitis por dermatitis herpetiforme, vitíligo, y granulomatosis de Wegener.

5 Una enfermedad cardiovascular es un trastorno del corazón y los vasos sanguíneos, e incluye trastornos de las arterias, venas, arteriolas, vénulas, y capilares. Las enfermedades cardiovasculares diagnosticadas por un procedimiento descrito en el presente documento pueden incluir, sin limitación, fallo cardíaco congestivo (HF), arteriopatía coronaria aguda (CAD), arritmia, hipertrofia asimétrica de los septos (por ejemplo, hipertrofia del ventrículo izquierdo con disfunción diastólica resultante), cardiomiopatía, disfunción valvular, pericarditis, aterosclerosis, e infarto de miocardio agudo (MI).

10 Una enfermedad pulmonar es un trastorno de los pulmones. Las enfermedades pulmonares diagnosticadas por procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir, sin limitación, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonía, neumotórax, embolia pulmonar, síndrome de distrés respiratorio avanzado (SDRA), efusión pleural, enfermedad metastásica, edema pulmonar, enfermedad de reflujo gastroesofágico con aspiración, fibrosis intersticial, neumoconiosis, enfermedad granulomatosa, enfermedad vascular de colágeno, y enfermedad pulmonar restrictiva.

15 Si el sujeto tiene un nivel elevado de ST2 soluble humana, por ejemplo, en comparación con un nivel de referencia, puede tomarse una decisión de tratar al sujeto de forma agresiva, y el sujeto puede admitirse, por ejemplo, en un hospital para su tratamiento como un paciente hospitalizado, por ejemplo, en un hospital (por ejemplo, un departamento de cuidados agudos o críticos) o en un centro de ayuda asistencial. La determinación de si un sujeto tiene una enfermedad tal como enfermedad cardiovascular, o enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, o una enfermedad asociada con Th2, o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, es deseable en una diversidad de situaciones. Por ejemplo, kits de ensayo portátiles podrían permitir al personal médico de urgencias evaluar a un sujeto en el terreno, para determinar si deberían transportarlo al departamento de urgencias. Además, las decisiones de clasificación, por ejemplo, en un departamento de urgencias u otro entorno clínico, también pueden tomarse en base a información proporcionada por un procedimiento descrito en el presente documento. Aquellos pacientes que muestran niveles aumentados de ST2 soluble humana pueden priorizarse sobre aquellos con niveles más bajos.

20 En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana se determina una vez, por ejemplo, en el momento en que el sujeto es sospechoso de tener una enfermedad (por ejemplo, tras su presentación a un profesional médico o en un centro de atención sanitaria). En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana se determina en una o más de 2, 4, 6, 8, 12, 18, y/o 24 horas, y/o 1-7 días o más después del momento en que el sujeto es sospechoso de tener una enfermedad (por ejemplo, tras su presentación a un profesional médico o en un centro de atención sanitaria).

25 En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana se determina más de una vez. En algunas realizaciones donde el nivel de ST2 soluble humana se determina más de una vez, puede usarse el nivel más alto, o puede determinarse y usarse el cambio en los niveles. Los niveles de ST2 soluble humana también pueden determinarse múltiples veces para evaluar la respuesta de un sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, puede compararse un nivel de ST2 soluble humana tomado después de la administración de un tratamiento, por ejemplo, una o más dosis o rondas de un tratamiento, con niveles de ST2 soluble humana antes de que se iniciara el tratamiento, por ejemplo, un nivel basal. El cambio en los niveles de ST2 soluble humana indicaría si el tratamiento era eficaz; por ejemplo, una reducción en los niveles de ST2 soluble humana indicaría que el tratamiento era eficaz.

30 En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto se ensaya y compara con un nivel de referencia de ST2 soluble humana. Puede usarse cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas para los expertos en la materia para ensayar los niveles de ST2 soluble humana en un sujeto. Procedimientos de ensayo ejemplares incluyen, sin limitación, procedimientos conocidos en la técnica tales como PCR cuantitativa o análisis de transferencia de Northern. En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto se ensaya usando inmunoensayos tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pone en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento con una muestra del sujeto. Una muestra puede comprender u obtenerse de cualquiera de una diversidad de células o tejidos de un sujeto. Por ejemplo, una muestra puede incluir uno o más de sangre, suero o plasma. La unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo entonces se detecta y opcionalmente se cuantifica, y se determinan los niveles de la proteína en base a los niveles de unión de anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, una muestra contiene sustancialmente nada de la forma ST2L de la proteína ST2, de modo que todo o la mayoría de ST2 en la muestra detectada de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento es ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, una muestra no contiene ST2L detectable, de modo que la única ST2 detectable en una muestra es ST2 soluble humana. En algunas realizaciones, una muestra que contiene sustancialmente nada de ST2L, o ST2L no detectable, es una muestra de suero o sangre. En algunas realizaciones, los niveles de ST2 soluble humana en un sujeto se ensayan en inmunoensayos usando al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

Como se describe en más detalle en la siguiente sección de Ejemplos, las composiciones de anticuerpo que comprenden anticuerpos producidos por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 muestra afinidad aumentada por el antígeno ST2 soluble humano en comparación con otros anticuerpos disponibles en el mercado. Dichos anticuerpos pueden usarse de acuerdo con procedimientos descritos en este documento.

Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en la determinación de que un sujeto no tiene una afección asociada con ST2. Una afección asociada con ST2 es una afección que está asociada con niveles elevados de ST2. Ciertas afecciones asociadas con ST2 ejemplares incluyen, sin limitación, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, y enfermedades asociadas con Th2. Las afecciones asociadas con ST2 generalmente son graves y el tratamiento indicado es a menudo agresivo. Los sujetos que muestran ciertos síntomas no específicos pueden tener o no una afección asociada con ST2 (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, o una enfermedad asociada con Th2). Los síntomas no específicos incluyen, aunque sin limitación, dolor o malestar torácico, dificultad para respirar, náuseas, vómitos, eructación, sudoración, palpitaciones, mareo, fatiga, y desfallecimiento. Cada síntoma puede tener etiología variada.

En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en la estratificación del riesgo, por ejemplo, determinando que un sujeto tiene una forma de baja gravedad o bajo riesgo de una afección asociada con ST2. Por ejemplo, ciertos sujetos que tienen una enfermedad cardiovascular (por ejemplo, infarto de miocardio o fallo cardíaco) están en bajo riesgo de resultado adverso, tal como muerte o un evento cardíaco recurrente, y también muestran una concentración menor de ST2 soluble humana que la observada en otros sujetos que tienen una enfermedad cardiovascular con un riesgo mayor de resultado adverso. Puede considerarse que dichos sujetos tienen una forma de "baja gravedad" o "bajo riesgo" de una afección cardiovascular relacionada con ST2. En ambas poblaciones de alto riesgo y bajo riesgo, sin embargo, se observan concentraciones mayores de ST2 soluble humana que las observadas en sujetos que no tienen una afección asociada con ST2. Sujetos que tienen una forma de baja gravedad de una afección relacionada con ST2 típicamente tienen concentraciones de ST2 soluble humana mayores que un nivel de ST2 soluble humana de referencia (por ejemplo, la concentración media de ST2 soluble humana de individuos sanos o normales), mientras que sujetos que tienen una forma de alta gravedad de una afección relacionada con ST2 típicamente tienen concentraciones de ST2 soluble humana mayores del percentil 80 de un nivel de referencia de ST2 soluble humana (por ejemplo, concentraciones de ST2 soluble humana observadas en individuos sanos o normales). La determinación de que un sujeto que muestra ciertos síntomas no específicos no tiene, o tiene una forma de baja gravedad de, una afección asociada con ST2, puede provocar un diagnóstico mejorado y/o decisiones de tratamiento más eficaces, por ejemplo, dicho individuo puede no requerir tratamiento agresivo. Por ejemplo, pacientes con elevadas concentraciones de ST2 soluble humana después de infarto de miocardio agudo mostraban mayor remodelado cardíaco (fibrosis aumentada) que pacientes con bajas concentraciones de ST2 soluble humana, y la eplerenona atenuaba de forma diferencial el remodelado cardíaco en sujetos que mostraban altas concentraciones de ST2 soluble humana (Weir y col., J. Am. Coll. Cardiol. 55:243-250, 2010). Por tanto, pueden usarse las concentraciones de ST2 soluble humana para identificar pacientes que deben recibir tratamiento diferente, posiblemente no convencional, hospitalario, o más agresivo.

#### *Dolor torácico*

El dolor torácico es el malestar principal en aproximadamente del 1 al 2 por ciento de las visitas externas, y aunque la causa a menudo no es cardíaca, la enfermedad cardíaca sigue siendo la causa principal de muerte en los Estados Unidos. Por lo tanto, distinguir entre causas graves y benignas del dolor torácico es crucial. Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en tomar esta determinación.

Un sujeto que se presenta en el departamento de urgencias con dolor torácico puede tener dolor esofágico, una úlcera, problemas pulmonares agudos tales como embolia pulmonar (PE) (potencialmente mortal), rotura o disección de aneurisma (muy letal), ataque de vesícula biliar, pericarditis (inflamación del saco alrededor del corazón), angina de pecho (dolor cardíaco sin daño), o un infarto de miocardio (potencialmente mortal). Puede ser difícil hacer inmediatamente un diagnóstico preciso, pero la decisión de si admitir al sujeto o tratar al sujeto de forma agresiva generalmente debe tomarse inmediatamente. Si los procedimientos descritos en el presente documento indican que el sujeto tiene un nivel elevado de ST2 soluble, por ejemplo, padece una afección asociada con ST2, puede tomarse la decisión de tratar al sujeto de forma agresiva, por ejemplo, para prevenir un resultado potencialmente adverso que resultaría de una ausencia de tratamiento. Puede encontrarse información adicional acerca del tratamiento y diagnóstico del dolor torácico, por ejemplo, en Cayley (Am. Fam. Phys. 72(10):2012-2028, 2005).

#### *Disnea*

La disnea, o dificultad para respirar (también definido como respiración anormal o molesta), es un síntoma común de sujetos que se presentan en el departamento de urgencias. El diagnóstico diferencial de disnea incluye cuatro categorías generales: (1) cardíaca, (2) pulmonar, (3) cardíaca o pulmonar mixta, y (4) no cardíaca o no pulmonar.

Las causas cardíacas de disnea incluyen fallo cardíaco congestivo derecho, izquierdo, o biventricular con disfunción sistólica resultante, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio reciente o remoto, cardiomiopatía, disfunción valvular,

hipertrofia ventricular izquierda con disfunción diastólica resultante, hipertrofia asimétrica de los septos, pericarditis, y arritmias.

Las causas pulmonares incluyen obstructivas (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma) y procesos restrictivos (por ejemplo, causas extrapulmonares tales como obesidad, deformidades de la columna o paredes torácicas, y patología pulmonar intrínseca, tal como fibrosis intersticial, neumoconiosis, enfermedad granulomatosa, o enfermedad vascular del colágeno). Los trastornos cardíacos y pulmonares mixtos incluyen EPOC con hipertensión pulmonar y corazón pulmonar, desacondicionamiento, embolia pulmonar, SDRA, y traumatismo. Los trastornos no cardíacos y no pulmonares incluyen afecciones metabólicas tales como anemia, cetoacidosis diabéticas, y otras causas menos comunes de acidosis metabólica, dolor en la pared torácica o en otra parte del cuerpo, y trastornos neuromusculares tales como esclerosis múltiple y distrofia muscular. Los problemas rinolaríngeos obstructivos incluyen obstrucción nasal debido a pólipos o desviación de los septos, amígdalas agrandadas, y restricción supraglótica o subglótica de las vías aéreas.

La disnea también puede estar presente como una manifestación somática de trastornos psiquiátricos, por ejemplo, un trastorno de ansiedad, con hiperventilación resultante. Puede encontrarse información adicional respecto a la evaluación y tratamiento de disnea, por ejemplo, en Morgan y Hodge, Am. Fam. Phys. 57(4):711-718, 1998.

Cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno desvelados en el presente documento puede usarse en la determinación de que un sujeto no tiene una afección asociada con ST2. En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto se ensaya (por ejemplo, por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente) y se compara con un nivel de referencia de ST2 soluble humana. Si el nivel de ST2 soluble humana en un sujeto es similar al nivel de referencia de ST2 soluble humana, puede determinarse que el sujeto tiene una probabilidad muy baja de tener una afección asociada con ST2. Un nivel de ST2 soluble humana en un sujeto es "similar a" un nivel de referencia de ST2 soluble humana cuando los dos niveles están suficientemente cercanos en el intervalo de modo que el sujeto probablemente no tenga una afección asociada con ST2. Generalmente, un nivel de ST2 soluble humana en un sujeto es "similar a" un nivel de referencia de ST2 soluble humana cuando los dos niveles están en aproximadamente el 25 % entre sí, por ejemplo, en aproximadamente el 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, o inferior. Los expertos en la materia serán capaces de determinar niveles de referencia de ST2 soluble humana adecuados para la afección asociada con ST2 en cuestión. Los expertos en la materia también serán conscientes de variaciones normales en dichos niveles de ST2 soluble humana, y tras la lectura de la presente invención, serán capaces de determinar si un nivel determinado de ST2 soluble humana es similar a un nivel de referencia de ST2 soluble humana.

En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana se determina una vez, por ejemplo, en el momento en que el sujeto es sospechoso de tener una afección asociada con ST2. 2 el nivel de ST2 soluble humana se determina en uno o más de 2, 4, 6, 8, 12, 18 y/o 24 horas, y/o 1-7 días después del momento en que el sujeto es sospechoso de tener una afección asociada con ST2. En algunas realizaciones, el nivel de ST2 soluble humana se determina más de una vez, por ejemplo, para confirmar o comprobar el nivel de ST2 soluble humana determinado en el primer ensayo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de unión a ST2 soluble humana y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento pueden usarse en uno o más procedimientos descritos en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2007/0248981, US 2009/0264779, US 2009/0305265, y US 2010/0009356, y la publicación de solicitud PCT n.º WO2007/131031.

En algunas realizaciones, los procedimientos de diagnóstico de una enfermedad en un sujeto incluyen obtener una muestra de un sujeto, determinar el nivel de ST2 soluble humana en la muestra usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento y un nivel de al menos un (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco) marcador adicional, en los que un nivel elevado de ST2 soluble humana en la muestra comparado un nivel de referencia de ST2 soluble humana y un nivel alterado (por ejemplo, aumentado o disminuido) del al menos un marcador adicional respecto a un nivel de referencia del al menos un (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o cinco), marcador adicional, indica que el sujeto tiene la enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, una enfermedad pulmonar, sepsis, enfermedad de Kawasaki, o una enfermedad asociada con Th2, o cualquier otra enfermedad descrita en el presente documento). Un nivel de referencia del al menos un marcador adicional puede ser el nivel del marcador en un sujeto no diagnosticado como que tiene la enfermedad, el nivel marcador en un sujeto que no presenta dos o más síntomas de la enfermedad, un sujeto no en riesgo de desarrollar la enfermedad, o nivel en el mismo sujeto en un punto temporal previo. Se conocen marcadores adicionales en la técnica y los procedimientos para determinar niveles de referencia de marcadores adicionales pueden determinarse por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, los niveles de referencia de ST2 soluble humana pueden ser cualquiera de los niveles de referencia descritos en el presente documento. Pueden determinarse niveles adicionales de referencia de ST2 soluble humana por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la muestra contiene sangre, suero, o plasma. La muestra puede obtenerse y la determinación del nivel de ST2 soluble humana usando al menos un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

### Procedimientos terapéuticos

En algunas realizaciones, se administró un anticuerpo de unión a ST2 o fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto para tratar cualquiera de una diversidad de enfermedades o afecciones (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). Por ejemplo, los niveles de ST2 soluble humana están elevados en sujetos que tienen enfermedades tales como, sin limitación, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, asepsis, enfermedad de Kawasaki, y/o enfermedades asociadas con Th2. Cualquiera de los anticuerpos de unión a ST2 soluble humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como anticuerpos modificados o fragmentos de unión a antígeno basados en dichos anticuerpos o fragmentos (por ejemplo, anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados o fragmentos), puede usarse para tratar dichas enfermedades o afecciones.

En algunas realizaciones, se administra a un sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma competitiva con un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-104312, o ambas. En algunas realizaciones, se administra a un sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento que es humano, quimérico, o humanizado. Como se sabe en la técnica, dichos anticuerpos humanos, quiméricos, o humanizados y fragmentos típicamente son menos inmunogénicos respecto a anticuerpos no humanos, no quiméricos o no humanizados. Por tanto, dichos anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados y fragmentos ofrecen beneficios terapéuticos tales como, sin limitación, incidencia disminuida de efectos secundarios, tolerancia a dosis aumentadas, y propiedades mejoradas farmacocinéticas y/o farmacodinámicas. En algunas realizaciones, se obtiene un anticuerpo humano, quimérico o humanizado o fragmento a administrarse a un sujeto de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-104312, o ambas. Por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de dichos anticuerpos pueden unirse a una región constante humana o fragmento de la misma para crear un anticuerpo quimérico o fragmento. Como alternativa, una o más CDR (por ejemplo, cada una de las CDR) de dichos anticuerpos pueden insertarse en una o más regiones flanqueantes humanas para crear un anticuerpo humanizado o fragmento.

En algunas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento de anticuerpo de unión a ST2 soluble humana a un sujeto directamente. Puede administrarse un anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento en una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de anticuerpo o fragmento puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo o fragmento de provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Los expertos en la materia serán conscientes de dosificaciones y regímenes de dosificación adecuados para la administración de un anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento a un sujeto. Véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference, 63<sup>a</sup> edición, Thomson Reuters, 30 de noviembre de 2008.

Pueden formularse anticuerpos anti-ST2 soluble humana o fragmentos de anticuerpo de unión a ST2 soluble humana descritos en el presente documento para su suministro por cualquier vía disponible incluyendo, aunque sin limitación vía parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Los anticuerpos o fragmentos pueden incluir un agente de suministro (por ejemplo, un polímero catiónico, transportador molecular peptídico, tensioactivo, etc.) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en formulaciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento.

### Kits

También se proporcionan en el presente documento kits que incluyen un reactivo que comprende al menos un (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento. Los kits están generalmente compuestos por los siguientes elementos principales: embalaje, reactivos que comprenden composiciones de unión como se ha descrito anteriormente, opcionalmente un control, e instrucciones. El embalaje puede ser una estructura tipo caja para alojar un vial (o varios viales) que contiene dichas composiciones de unión, un vial (o varios viales) que contiene un control e instrucciones para su uso en un procedimiento descrito en el presente documento. Los expertos en la materia pueden modificar fácilmente el embalaje para adecuarse a las necesidades individuales.

En algunas realizaciones, un kit proporcionado en el presente documento puede contener al menos uno (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Por ejemplo, un kit puede contener al menos un (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma competitiva con un

anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o PTA-104312, o ambas.

En algunas realizaciones, un kit proporcionado en el presente documento contiene al menos uno (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpos anti-ST2 soluble humana o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento, y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a ST2 soluble humana. Por ejemplo, el kit puede estar diseñado para su uso en un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA), tal como los ensayos ARCHITECT de Abbot Diagnostics (Abbott Park, IL), y por tanto puede contener micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-BNP, y micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-ST2 soluble humana. Estas micropartículas se ponen en contacto con una muestra, y la ST2 soluble humana presente en la muestra puede unirse a las micropartículas recubiertas. Opcionalmente, la muestra puede dividirse en al menos dos alícuotas, y cada tipo de micropartícula puede ponerse en contacto con una alícuota diferente. Después del lavado, puede añadirse conjugado marcado con acridinio anti-ST2 soluble humana para crear una mezcla de reacción en la segunda etapa. Después de otro ciclo de lavado se añaden soluciones preactivadoras y activadoras a la mezcla de reacción. Se mide la reacción quimioluminiscente resultante, por ejemplo, usando la óptica ARCHITECT i System optics (Abbot Diagnostics, Abbott Park, Illinois). Existe una relación directa entre la cantidad de ST2 soluble humana en la muestra y la quimioluminiscencia detectada.

En algunas realizaciones, el kit proporcionado en el presente documento contiene al menos uno (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento, y uno o más componentes de inmunoensayo en fase sólida para detectar ST2 soluble humana mediante análisis en fase sólida. Los inmunoensayos en fase sólida emplean un soporte sólido al cual se une un miembro de un par ligando/receptor, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Ejemplos no limitantes de soportes sólidos incluyen placas, tubos, perlas de poliestireno, y diversos materiales porosos tales como, por ejemplo, nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, y fibras de vidrio. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.703.017; 4.743.560; y 5.073.484. En algunas realizaciones, un kit comprende componentes para un inmunoensayo en fase sólida, en que un anticuerpo unido a fase sólida o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento de unión a antígeno del mismo) se pone en contacto con una muestra que contiene un analito de interés (por ejemplo, ST2 soluble humana), después de lo cual se lava la fase sólida para retirar el material no unido.

En algunas realizaciones, un kit contiene componentes para un inmunoensayo en fase sólida de flujo continuo. Los inmunoensayos en fase sólida de flujo continuo obvian la necesidad de etapas de incubación y lavado asociadas con otros tipos de inmunoensayos en fase sólida. Se conoce en la técnica una diversidad de inmunoensayos en fase sólida de flujo continuo. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.632.901, desvela un dispositivo de inmunoensayo de flujo continuo en el que un anticuerpo (específico para un analito de antígeno diana) se une a una membrana porosa o filtro a la cual se añade una muestra líquida. Según fluye el líquido a través de la membrana, el analito diana se une al anticuerpo. La adición de muestra va seguida por la adición de anticuerpo marcado. La detección visual de anticuerpo marcado proporciona una indicación de la presencia de analito de antígeno diana en la muestra. Además, la patente de Estados Unidos n.º 5.229.073, describe un procedimiento de flujo lateral de inmunoensayo competitivo semicuantitativo que emplea una pluralidad de zonas o líneas de captura que contienen anticuerpos inmovilizados para medir los niveles plasmáticos de lipoproteína. Ejemplos adicionales de ensayos de flujo lateral para detectar analitos se desvelan en las patentes de Estados Unidos n.º 4.168.146; 4.366.241; 4.703.017; 4.855.240; 4.861.711; y 5.120.643; la patente europea n.º 0296724; el documento WO 97/06439; y el documento WO 98/36278. Los expertos en la materia serán conscientes de otros procedimientos y dispositivos de inmunoensayo en fase sólida adecuados, y serán capaces de emplear uno o más de los anticuerpos anti-ST2 soluble humana y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento en dichos procedimientos y dispositivos.

En algunas realizaciones, pueden usarse otros procedimientos de detección, por ejemplo, ensayos colorimétricos, radioinmunoensayos, o ensayos quimioluminiscentes. Pueden usarse ensayos tipo sándwich también, por ejemplo, usando dos anticuerpos monoclonales, uno marcado con yodo 125 y el otro adsorbido en perlas, por ejemplo, como se usa en el kit IRMA-BNP2 de CISBIO International (Francia) y los kits ShionRIA BNP o ANP SHIONOGI USA Inc.).

Los kits proporcionados en el presente documento pueden usarse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos (por ejemplo, procedimientos de diagnóstico) descritos anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse kits que contienen al menos un (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento para determinar el nivel de ST2 soluble humana en una muestra. Además, pueden usarse kits, que contienen al menos un (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpo anti-ST2 soluble humana o fragmento de unión a antígeno del mismo para determinar un nivel de referencia de ST2 soluble humana. Los expertos en la materia serán conscientes de otros usos adecuados para kits proporcionados en el presente documento, y serán capaces de emplear los kits para dichos usos.

En algunas realizaciones de los kits, al menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro) de los anticuerpos o fragmentos tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana igual a o menor de  $8,59 \times 10^{-10}$  M. En algunas

realizaciones de los kits, el kit se proporciona como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Algunas realizaciones de los kits contienen adicionalmente una ST2 soluble humana recombinante aislada de una célula humana (por ejemplo, una célula renal embrionaria humana). Algunas realizaciones de los kits contienen adicionalmente una ST2 soluble humana completamente glucosilada (por ejemplo, presente en un extracto celular, o proporcionada como una proteína aislada).

### Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1: Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-ST2

Se produjeron anticuerpos monoclonales contra la proteína ST2 soluble humana (sST2) inmunizando ratones con proteína recombinante producida a partir de la secuencia de ADNc humana para sST2.

Producción y confirmación de antígeno: Se adquirió un clon de ADNc de sST2 humana, número de referencia de GenBank NM\_003856.2, de Origene Technologies, Inc. de Rockville, MD. Usando técnicas convencionales de PCR, se usó este clon como secuencia fuente para crear un vector de expresión que incluía la secuencia completa de ST2 soluble humana con una marca de purificación de hexa-histidina incorporada en la región amino terminal de la proteína. La integridad del clon de expresión se confirmó por secuenciación de ADN. Se produjo la proteína recombinante por transfección transitoria y expresión en células renales embrionarias humana (HEK293). Se purificó la proteína ST2 soluble humana recombinante pasando el lisado celular sobre una columna de quelato metálico que se unía específicamente a la marca de purificación de histidina incorporada en la proteína expresada. La purificación de ST2 soluble humana recombinante se confirmó por gel de poliacrilamida teñido con Coomassie y por análisis de transferencia de Western usando anticuerpos anti-ST2 disponibles en el mercado (anticuerpo monoclonal D067 obtenido de MBL International) así como anticuerpos antimarca HIS. Véanse las FIG. 1, 2, y 3A-3C. La propia proteína tiene un peso molecular de 36 kD, basado en la secuencia de aminoácidos, y se mostró por Kuroiwa y col. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 284:1104-1108, 2001), que la proteína nativa en suero humano tiene un peso molecular de ~58 kD. La proteína recombinante purificada producida a partir de este sistema de expresión tenía el peso molecular apropiado de ~58 kD para una proteína completamente glucosilada y se reconocía apropiadamente por los anticuerpos anti-ST2 disponibles en el mercado. Se realizó la cuantificación por ensayo de proteína total de Bradford.

Producción de hibridoma y anticuerpo monoclonal: Se produjeron anticuerpos monoclonales inmunizando ratones con proteína recombinante producida como sea descrito anteriormente. Se inmunizaron tres ratones Balb/c del siguiente modo:

T1	20 µg/animal con CFA (adyuvante completo de Freund)
T1 + 3 días	20 µg/animal con IFA (adyuvante incompleto de Freund)
T1 + 6 días	20 µg/animal en solución salina
T1 + 9 días	20 µg/animal en solución salina

Después de la inmunización final se determinó el título de anticuerpo a partir de una exanguinación de la cola de cada animal. El animal con el mayor título de anticuerpos se usó para fusión esplénica y establecimiento de hibridoma. Después de establecer los hibridomas como cultivos celulares estables en placas de 96 pocillos, se exploraron para la unión a la proteína ST2 soluble humana recombinante y a una proteína genérica que contenía una marca de purificación hexa-his para eliminar hibridomas específicos para esta marca. Se seleccionaron dos hibridomas para caracterización adicional y desarrollo del producto: 7E4 y 9F8. Ambos anticuerpos monoclonales se ensayaron para su sensibilidad al antígeno ST2 soluble humano recombinante recubriendo pocillos individuales de placas de microtitulación de 96 pocillos con cantidades constantes de cada anticuerpo, 9F8 y 7E4, después se ensayaron frente a diluciones en serie de factor 3 de ST2 soluble humana recombinante conjugada con biotina, intervalo de concentración de 300 a 0,41 ng/ml (véase la FIG. 4).

Los dos anticuerpos ilustran sensibilidad comparable de analito con un valor de absorbancia muy fuerte, ~1,0, observado a la concentración más baja de analito ensayada, 0,41 ng/ml. Adicionalmente, ambos anticuerpos se recubrieron en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos a concentraciones que variaban de 5 µg/ml a 0 y se ensayaron frente a una única concentración de ST2 soluble humana recombinante conjugada con biotina (véase la FIG. 5). Ambos anticuerpos muestran sensibilidad significativa a una concentración de  $\geq 1,25$  µg/ml con anticuerpo 9F8, lo que ilustra sensibilidad ligeramente mayor.

Los anticuerpos 9F8 y 7E4 también se ensayaron para su capacidad de usarse juntos en una configuración de inmunoensayo enzimático (EIA) de tipo sándwich con anticuerpo monoclonal. Cada anticuerpo monoclonal se recubrió en pocillos individuales de una placa de microtitulación de 96 pocillos a una concentración constante y se ensayó frente a un intervalo de dilución en serie de factor 3 de concentraciones de sST2 soluble humana, de 10 ng/ml a 0,01 ng/ml, usando el otro anticuerpo monoclonal conjugado con biotina para la detección del complejo.

Como se muestra en la FIG. 6, ambas combinaciones de anticuerpo provocan sensibilidad comparable y detectan fácilmente tan poco como 0,01 ng/ml de ST2 soluble humana.

5 Análisis adicional usando resonancia de plasmón superficial (SPR) confirmó que los anticuerpos 9F8 y 7E4 reconocen cada uno epítomos únicos y epítomos que son diferentes a los reconocidos por los anticuerpos disponibles en el mercado D066 y D067, los anticuerpos monoclonales usados por MBL International Corporation (MBL) en su ELISA. La FIG. 7 ilustra los resultados de un análisis SPR de los anticuerpos 9F8, 7E4, un tercer anticuerpo anti-ST2 soluble humana novedoso incluido para referencia (11A7), ambos anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado en MBL (D066 y D067), más un anticuerpo irrelevante para la determinación inicial. Se preparó un chip SPR individual con un recubrimiento para cada anticuerpo monoclonal. Se hizo fluir ST2 soluble humana recombinante a través del chip y se dejó que se uniera. Después, se hicieron fluir los anticuerpos monoclonales de ensayo a través del complejo de primer anticuerpo-ST2 soluble humana para evaluar si el segundo anticuerpo también podía unirse al complejo a través de la proteína ST2 soluble humana. Solamente los anticuerpos secundarios que reconocen un epítomo diferente que el anticuerpo primario se unirán al complejo.

Los resultados del análisis SPR se muestran en las FIG. 7A-F.

15 Gráfico A1 (FIG. 7A): Cuando se usaba el anticuerpo 9F8 (A1) como anticuerpo de captura primario, cada anticuerpo de ensayo demostraba al menos una señal medible mínima. El anticuerpo de ensayo 7E4 (L2) tenía la señal más elevada, el anticuerpo irrelevante (L6) tenía la señal más baja. La conclusión a partir de este gráfico es que el anticuerpo 9F8 reconocía un epítomo diferente que cualquiera de los anticuerpos de ensayo y que el par 9F8-7E4 proporcionaba la unión global más fuerte.

20 Gráfico A2 (FIG. 7B): Cuando se usaba el anticuerpo 7E4 (A2) como anticuerpo de captura primario, el anticuerpo de ensayo, 9F8 (L1) mostraba muy buena unión, el anticuerpo irrelevante no mostraba señal medible y los anticuerpos de ensayo restantes mostraban una baja señal, pero medible. La conclusión a partir de este gráfico es que el anticuerpo 7E4 reconoce un epítomo diferente que cualquiera de los anticuerpos de ensayo y que el par 9F8-7E4 proporcionaba la unión global más fuerte.

25 Gráfico A3 (FIG. 7C): Cuando se usaba un anticuerpo 11A7 novedoso (A3) como anticuerpo de captura primario, el anticuerpo de ensayo, 9F8 (L1) mostraba muy buena unión, el anticuerpo irrelevante no mostraba señal medible y los anticuerpos de ensayo restantes mostraban una señal baja, pero medible. Estos resultados fueron casi idénticos a los resultados generados usando el anticuerpo 7E4 como anticuerpo de captura.

30 Gráfico A4 (FIG. 7D): Cuando se usó el anticuerpo MBL D066 (A4) como anticuerpo de captura primario, el anticuerpo de ensayo, 9F8 (L1) mostró muy buena unión, seguido en fuerza de unión por el anticuerpo 7E4 (L2). El anticuerpo irrelevante no mostró señal medible y los anticuerpos de ensayo restantes mostraron una señal baja pero medible. La conclusión a partir de este gráfico es que el anticuerpo D066 reconocía un epítomo diferente que cualquiera de los anticuerpos de ensayo, y que formaba un par de unión con el segundo anticuerpo MBL, D067, pero con afinidad de unión muy inferior que el par 9F8-7E4.

35 Gráfico A5 (FIG. 7E): Cuando se usaba el anticuerpo MBL D067 (A5) como anticuerpo de captura primario, el anticuerpo de ensayo 9F8 (L1) mostraba muy buena unión, seguido en fuerza de unión por los anticuerpos 7E4 (L2) y D066 (L4). El anticuerpo irrelevante no mostraba señal medible y el anticuerpo 11A7 mostraba señal muy baja. La conclusión a partir de este gráfico es que el anticuerpo D067 reconocía un epítomo diferente que cualquiera de los anticuerpos de ensayo, y que formaba un par de unión con el segundo anticuerpo MBL D066, pero con afinidad de unión muy inferior que el par 9F8-7E4.

Gráfico A6 (FIG. 7F): Cuando se usaba el anticuerpo irrelevante como anticuerpo de ensayo primario no hubo señal medible generada a partir de ninguno de los anticuerpos de ensayo, lo que confirma la especificidad de los anticuerpos ensayados para la afinidad a ST2 soluble humana.

45 Este análisis confirmó que los novedosos anticuerpos monoclonales anti-ST2 soluble humana 9F8 y 7E4 reconocían diferentes epítomos que cualquiera de los anticuerpos monoclonales de MBL D066 y D067. Además, este análisis también confirmó que el par 9F8-7E4 tenía una afinidad de unión mayor que el par D066-D067.

50 Esta afinidad de unión aumentada observada para el par 9F8-7E4 se confirmó en una comparación paralela de los dos pares de anticuerpos monoclonales en el ensayo de muestras de plasma humano. En el experimento resumido en la tabla 1, el ELISA MBL compuesto del par de anticuerpo D066-D067 se comparó con el novedoso par de anticuerpos 9F8-7E4. Se ensayaron cuatro (4) muestras de plasma en una serie de dilución de factor 2, un par coincidente de plasma EDTA y plasma con heparina de un donante de baja concentración de ST2 soluble humana, y se usaron ambas muestras de plasma EDTA y plasma con heparina de un donante con concentración elevada de ST2 soluble humana.



**Tabla 1: Comparación de sensibilidad de D066-D067 y 9F8-7E4 con muestras de plasma humano**

factor de dilución	LS EDTA		LS heparina		HS EDTA		HS heparina	
	D066-D067	9F8-7E4	D066-D067	9F8-7E4	D066-D067	9F8-7E4	D066-D067	9F8-7E4
2	0,27	EUL	ND	EUL	0,86	EUL	0,29	EUL
4	0,45	19,7	ND	22,7	1,20	EUL	0,53	EUL
8	ND	20,4	ND	22,3	1,65	EUL	1,14	EUL
16	ND	21,6	ND	23,6	2,40	EUL	1,95	EUL
32	ND	23,5	ND	26,6	3,89	158,1	ND	134,0
64	ND	23,5	ND	26,6	ND	154,9	ND	136,3
128	ND	24,3	ND	27,3	ND	172,1	ND	152,4
256	ND	23,9	ND	30,4	ND	189,3	ND	160,8
Media	0,36	22,4		25,6	2,00	168,6	0,98	145,9
CV	37%	8,1%		11,4%	60%	9,3%	76%	8,8%

LS = muestra de baja concentración de sST2, HS = muestra de alta concentración de sST2, ND = no detectado, EUL = excede el límite superior de detección

Los resultados en la Tabla 1 se generaron usando cada ensayo optimizado para su realización individual con resultados presentados en ng/ml basados en el calibrador optimizado para cada par de anticuerpos. Las cantidades de masa presentadas aquí no coinciden ya que las proteínas calibradoras no estaban normalizadas entre sí pero se cuantificaron independientemente. Como se muestra en la Tabla 1, el límite de detección para el par de D066-D067 fue la dilución 1:4 de la muestra LS EDTA, y con mala precisión, mientras que el par 9F8-7E4 era capaz de medir de forma precisa hasta una dilución 1:256 con buena precisión, CV <10 %. Esta diferencia de sensibilidad es coherente cuando se ensayaba la muestra de plasma HS EDTA. También es de observar que el par D066-D067 no era capaz de detectar incluso la mínima dilución de muestra de plasma LS heparina, y con las muestras HS la muestra de plasma con heparina tenía una señal muy inferior que la muestra de plasma EDTA con el par D066-D067, lo que indica una sensibilidad o inhibición de este par de anticuerpos por la heparina. El par 9F8-7E4 no mostró esta sensibilidad a heparina y mantuvo su buena precisión, su baja CV, en ambas muestras de plasma de ensayo de concentración baja y alta de ST2 soluble humana.

**Ejemplo 2: Caracterización por EIA para el par de anticuerpos monoclonales 9F8-7E4**

Se analizaron las características del par de anticuerpos monoclonales 9F8-7E4 en un inmunoensayo enzimático (EIA).

Sensibilidad funcional (límite de cuantificación): Se determinó el límite de sensibilidad funcional ensayando diversas concentraciones de calibrador diluido en réplicas de 20. Además del blanco de tampón, las concentraciones de calibrador ensayadas incluían 0,0625, 0,125, y 0,25 ng/ml. La sensibilidad funcional se define como la concentración más baja que provoca una CV ≤20 %. Como se muestra en la siguiente Tabla 2, todas las concentraciones ensayadas cumplían estos criterios siendo la concentración más baja ensayada 0,0625 ng/ml.

**Tabla 2: Resumen del análisis de sensibilidad funcional**

ST2(ng/ml)	A <sub>450</sub> media	Des. típ.	CV %
0,0	0,137	0,020	14 %
0,065	0,222	0,038	17 %
0,125	0,297	0,011	3,7 %
0,25	0,471	0,026	5,5 %

También se usó SPR para determinar la afinidad de cuatro anticuerpos producidos por los procedimientos descritos en el presente documento (9F8, 7E4, 11A7, y 15D06), y dos anticuerpos producidos por MBL International (D066-3 y D067-3). Cada experimento se realizó detectando la unión de las siguientes concentraciones de la proteína ST2 soluble humana recombinante usada para preparar los anticuerpos 9F8 y 7E4 descritos en el presente documento: 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,25 nM, y 0 nM. Los datos de estos experimentos se muestran en las Figuras 8A-8F. La K<sub>D</sub> calculada de cada anticuerpo para la unión a ST2 soluble humana recombinante aislada de células renales embrionarias humanas se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3. La  $K_D$  de unión de cada anticuerpo para ST2 soluble humana.**

mAb	$K_D$ (M)
9F8	8,59E-10
7E4	1,51E-09
11A7	2,72E-09
15D6	1,32E-09
D066	4,58E-09
D067	1,24E-09

5 Precisión: Se realizó la evaluación de la precisión del ensayo de acuerdo con la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved  
 10 Guideline-Second Edition. (InVitro Diagnostics) EP5-A2. Se formaron alícuotas de muestras combinadas de plasma de tres pacientes en veinte tubos de 1,5 ml de plástico para cada nivel de concentración y se congelaron a -80 °C. Estas muestras se analizaron por duplicado en una ejecución por día durante 20 días en 2 meses de recogida de sangre. Se calculó la imprecisión analítica total ( $CV_A$ ) y dentro de la ejecución con el ensayo de evaluación de precisión de única ejecución CLSI. El ensayo tubo una  $CV_A$  dentro de la ejecución del 2,4 % y una  $CV_A$  total del 4,0 % a una concentración media de 11 ng/ml (combinación 1, baja), una  $CV_A$  dentro de la ejecución del 2,0 % y una  $CV_A$  total del 3,9 % a una concentración media de 87 ng/ml (combinación 2, media), y una  $CV_A$  dentro de la ejecución del 2,0 % y una  $CV_A$  total del 3,9 % a una concentración media de 140 ng/ml (combinación 3, alta). Véase la Tabla 4.

**Tabla 4: Resumen del análisis de precisión**

Combinación	Media (ng/ml)	CV dentro de la ejecución	CV total
Baja	10,56	2,42 %	3,96 %
Media	87,00	2,31 %	3,87 %
Alta	140,05	2,24 %	3,86 %

15 El ensayo no muestra ninguna desviación de precisión en todo el intervalo de concentración ensayado.

Evaluación de sustancias de interferencia (sensibilidad a anticoagulante): En treinta voluntarios aparentemente sanos, se extrajeron muestras de plasma en los tipos de tubo más comunes: suero, plasma EDTA, plasma con citrato, y plasma con heparina. Se realizó análisis inmediatamente después de centrifugación y procesamiento  
 20 normal de las muestras en un único kit de análisis de ST2 soluble humana. Los voluntarios consistían en 9 hombres y 21 mujeres con edades de 22-66 años. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 5. Como se indica en la Tabla 9, el valor medio para el tubo con citrato era ligeramente inferior que para los otros tipos de tubo, que no se esperaba ya que los tubos con citrato tienen un volumen pequeño de anticoagulante líquido en el tubo que introduce una dilución moderada de la muestra recogida respecto a los otros tipos de tubos que no influyen en el  
 25 volumen de muestra. Para ensayar la consistencia de las mediciones, se comparó cada tipo de tubo de plasma con el tubo de suero. Cada comparación produjo un valor  $R^2$  altamente significativo, que variaba de 0,849 a 0,964. Por tanto, con la excepción de la dilución moderada en los tubos con citrato que puede influir en las mediciones normales de concentración, no hubo desviación medible por el tipo de tubo.

**Tabla 5: Resumen de los resultados de ensayo de anticoagulante**

ID de paciente	Edad	Género	sST2 (ng/ml)			
			Suero	Plasma con citrato	Plasma EDTA	Plasma con heparina
1	24	F	7,4	13,7	6,3	3,9
2	26	F	5,7	7,3	7,2	8,8
3	62	M	7,9	6,6	8,0	4,3
4	45	F	6,8	5,2	6,3	6,7

30

ES 2 571 994 T3

(continuación)

ID de paciente	Edad	Género	sST2 (ng/ml)			
			Suero	Plasma con citrato	Plasma EDTA	Plasma con heparina
5	41	F	5,3	4,3	5,5	5,3
6	53	M	6,3	5,3	7,3	7,9
7	56	F	2,5	2,4	3,3	3,2
8	50	F	6,4	4,8	5,8	6,5
9	44	F	7,7	5,1	5,6	N/A
10	63	F	4,9	3,7	5,1	4,9
11	66	M	7,4	5,1	6,8	7,4
12	57	F	9,1	6,9	7,9	8,8
13	59	F	5,0	4,3	4,2	4,2
14	52	F	6,0	4,5	5,8	6,4
15	58	M	20,6	17,7	19,5	17,1
16	22	F	6,0	2,8	5,3	6,6
17	49	F	13,7	12,4	12,7	11,9
18	29	F	5,2	4,8	5,2	7,9
19	35	F	3,9	3,2	3,5	3,4
20	24	F	8,2	6,5	7,3	7,1
21	50	F	13,1	11,2	11,6	11,7
22	54	F	10,9	7,5	9,7	9,7
23	49	M	18,9	14,0	17,9	18,6
24	53	M	15,4	12,5	16,7	13,0
25	64	M	7,3	N/A	5,1	6,0
26	51	M	15,1	11,4	14,0	14,5
27	27	M	19,4	18,4	18,3	21,7
28	22	F	9,0	7,6	7,4	8,2
29	56	F	2,7	2,5	3,3	2,8
30	52	F	4,8	3,8	5,5	5,5
sST2 (ng/ml) por tipo de tubo: media			7,3	5,3	6,5	7,1
correlación con el valor de suero: Rsq				0,849	0,964	0,891

Determinación del intervalo de referencia de concentración normal: Se reclutó una cohorte compuesta por 490 donantes, autodescritos como sanos sin enfermedad grave conocida ni tratados en ese momento para ninguna enfermedad grave, distribuidos equitativamente entre los géneros y con representación de edades de 18 a 84 años, para este análisis.

La Tabla 6 proporciona un resumen de la cantidad de individuos en cada grupo de edad y por género para esta cohorte de intervalo de referencia sana, y la FIG. 10 es un histograma de la distribución de concentración de ST2 soluble humana. En la FIG. 10, las barras representan los datos reales y las líneas verticales dentro de las barras representan una distribución normal teórica. La distribución de concentraciones en estos individuos sanos fue no

normal. La Tabla 7 compara las concentraciones de ST2 soluble humana como una función del género. En esta población sana y normal, la concentración media en hombres era significativamente mayor que en mujeres (ensayo de Kruskal-Wallis;  $p < 0,0001$ ).

**Tabla 6: Cohorte de intervalo de referencia sana**

	Cantidad de individuos por decena de edad						total
	<30	30-39	40-49	50-59	60-69	>70	
Mujer	61	35	53	39	38	19	245
Hombre	65	47	40	41	31	21	245
Total	126	82	93	80	69	40	490

5

**Tabla 7: Comparación de grupos de referencia por valores medios por género**

	Media (ng/ml)	95 % CI	IQR
Hombre	23,6	21,3-25,1	17,6-30,6
Mujer	16,2	15,3-17,4	12,4-19,9

10

La estratificación de las concentraciones de ST2 soluble humana por edad reveló que no había diferencias significativas entre estos grupos, FIG. 11 (ensayo de Kruskal-Wallis; hombres  $p=0,501$ , mujeres  $p=0,056$ ). Por tanto, se calcularon los valores de referencia específicos de género, así como los valores de grupo completo usando un procedimiento de percentil no paramétrico (unilateral del 90 %). Estos resultados se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8: Resumen del grupo de referencia sano CCD**

Parámetro/Grupo	Grupo completo	Hombre	Mujer
N	490	245	245
sST2 media (ng/m)	20,9	24,9	16,9
sST2 mediana (ng/ml)	18,8	23,6	16,2
95 % intervalo de confianza de la mediana	18,1 - 19,9	21,3-25,1	15,3-17,4
Rango intercuartil	14,5 - 25,3	17,6-30,6	12,4-19,9
Límite superior: 90 % (95 % CI)	34,4 (32,4-35,8)	37,4 (35,5-41,1)	23,7 (22,2-25,9)

La Tabla 9 enumera la concentración de ST2 soluble humana a varios umbrales específicos.

15

**Tabla 9: Concentraciones de sST2 a umbrales específicos de la cohorte sana auto-presentada de EE.UU.**

Percentiles	Cohorte completa		Hombre		Mujer	
	ST2 (ng/ml)	95 % CI	ST2 (ng/ml)	95 % CI	ST2 (ng/ml)	95 % CI
2,5	8,0	7,1 a 8,6	8,6	7,7 a 11,8	7,3	5,5 a 8,4
5	9,3	8,4 a 10,2	11,8	8,6 a 12,7	8,5	7,3 a 9,4
10	11,5	10,3 a 11,9	13,7	12,2 a 14,8	10,2	9,0 a 11,2
25	14,5	13,7 a 15,2	17,6	16,8 a 18,7	12,4	11,9 a 13,5
media	18,8	18,2 a 19,9	23,6	21,3 a 25,1	16,2	15,4 a 17,4
75	25,3	23,8 a 26,9	30,6	28,7 a 33,3	19,9	18,8 a 20,8

(continuación)

Percentiles	Cohorte completa		Hombre		Mujer	
	ST2 (ng/ml)	95 % CI	ST2 (ng/ml)	95 % CI	ST2 (ng/ml)	95 % CI
90	34,3	32,4 a 35,6	37,2	35,5 a 40,9	23,7	22,2 a 25,8
95	37,9	35,9 a 41,3	45,4	39,4 a 48,6	29,0	24,6 a 33,2
97,5	45,6	40,1 a 48,7	48,5	45,8 a 58,5	33,1	29,6 a 39,9

Concentraciones de ST2 soluble humana en estado en ayunas frente a no en ayunas: Se extrajo una muestra de plasma de veinticinco pacientes (19 hombres y 6 mujeres) con diversas patologías (8 de ellos con diabetes mellitus de tipo 2) después de un periodo de ayuno de una noche a las 7:00 a.m. Los pacientes después de ello tuvieron un desayuno normalizada (730 kcal para pacientes sin diabetes y 522 kcal para aquellos con diabetes). Hubo una segunda extracción de sangre para la determinación de ST2 soluble humana a las 11:00 a.m. Después de ello, todos los pacientes tuvieron una comida normalizada (800 kcal para pacientes sin diabetes, y 716 kcal para aquellos con diabetes). La extracción tercera y final fueron a las 2:00 p.m. Se calcularon las concentraciones medias de ST2 soluble humana de los 25 individuos para los tres puntos temporales. Se usaron ensayos-t para muestras relacionadas para determinar si había una diferencia entre las concentraciones en plasma de ST2 soluble humana no en ayunas (es decir, sangre extraída a las 11:00 a.m. y 2:00 p.m.) en comparación con los valores respectivos en ayunas (es decir, extracción de sangre a las 7:00 a.m.). El cambio relativo de las concentraciones de ST2 soluble humana en el curso del tiempo se comparó con el RCV para estimar el efecto de la comida sobre la concentración de analito.

La concentración media de ST2 soluble humana en ayunas fue de 18 U/ml (media, 17 U/ml; intervalo 9-26 U/ml) a las 7:00 a.m., la concentración media de ST2 soluble humana después del desayuno fue de 19 U/ml (media, 18 U/ml; intervalo, 11-28 U/ml;  $p=0,025$  para comparación con ST2 en ayunas) a las 11:00 a.m., y la concentración media de ST2 soluble humana después de la comida fue de 18 U/ml (media, 18 U/ml; intervalo, 10-28 U/ml;  $p=0,014$  para comparación con ST2 soluble humana en ayunas) a las 2:00 p.m. Las concentraciones medias de ST2 soluble humana a las 11:00 a.m. y 2:00 p.m. fueron por tanto  $<5\%$  mayores que el valor medio en ayunas obtenido a las 7:00 a.m.

Comparación de concentraciones normales de ST2 soluble humana y concentraciones patológicas: Las concentraciones de ST2 soluble humana fueron marcadamente mayores en pacientes con fallo cardíaco que en individuos sanos normales. En el siguiente análisis, se comparó la concentración normal determinada a partir de los 490 donantes sanos con diversas poblaciones distintas; 528 voluntarios sanos confirmados por detección de biomarcadores como ausentes de enfermedad cardiovascular oculta (CVD) o enfermedad inflamatoria (detectada por BNP, PCT, CRP, y IL-6), 709 pacientes diagnosticados con fallo cardíaco agudo, 1159 pacientes diagnosticados con fallo cardíaco estable crónico, 190 pacientes diagnosticados con hipertensión arterial pulmonar (PHA), 48 pacientes diagnosticados con asma, 223 diagnosticados con asma o EPOC, 58 diagnosticados con embolia pulmonar (PE), 119 diagnosticados con neumonía (PNA), 109 diagnosticados con síndrome de enfermedad respiratoria avanzada (SDRA), 50 jóvenes diagnosticados con enfermedad de Kawasaki (KD), y 15 diagnosticados con sepsis. La Tabla 10 enumera los valores medios, el intervalo de confianza del 95 %, y el rango intercuartil (IQR) para concentraciones de ST2 soluble humana en cada grupo.

**Tabla 10: Concentraciones de sST2 por patología**

Patología	N	sST2 media (ng/ml)	95% CI	IQR
Normal	490	18,8	18,1 - 19,9	14,5 - 25,3
Sano confirmado por biomarcadores	528	11,1	10,4 - 11,7	7,5 - 16,6
Fallo cardíaco crónico	1159	27,4	26,3 - 29,0	19,3 - 43,0
Fallo cardíaco agudo	709	59,8	55,5 - 63,4	36,1 - 97,2
Hipertensión arterial pulmonar (PAH)	190	31,7		22,1 - 51,7
Enfermedad de Kawasaki	50	34,2	25,2 - 51,6	19,7 - 72,5

(continuación)

<b>Patología</b>	<b>N</b>	<b>sST2 media (ng/ml)</b>	<b>95% CI</b>	<b>IQR</b>
SDRA	109	662,0	481,5 - 1031,7	290,8 - 1846
Asma	48	46,4	33,1 - 81,5	29,4 - 97,8
Embolia pulmonar	58	43,5	34,9 - 70,2	27,2 - 94,3
EPOC/Asma	223	62,8	55,5 - 73,1	40,2 - 126,2
Neumonía	119	69,4	57,2 - 79,6	39,9 - 118,9
Sepsis	15	745	283 - 3178	325 - 2772

5 Comparación de concentraciones de ST2 soluble humana y riesgo de muerte en 1 año: También se midieron las concentraciones de ST2 soluble humana en muestra de sangre de la cohorte PRIDE (Junuzzi y col., J. Am. Coll. Cardiol. 50:607-613, 2007). De los 599 sujetos en la cohorte PRIDE original, 586 tenían muestras de sangre disponibles para medición de ST2 soluble humana usando los procedimientos descritos anteriormente. Las muestras usadas eran alícuotas de plasma EDTA congeladas a -80 °C. Se analizaron diagramas característicos de funcionamiento del receptor (ROC) con muerte en un año como norma de referencia y se compararon las áreas bajo la curva (AUC) de acuerdo con el procedimiento de Hanley y col. (Radiology 148:839-843, 1983) para determinar la capacidad del ensayo para la predicción de mortalidad por todas las causas en 1 año en la cohorte PRIDE.

10 En estos experimentos, las concentraciones medias para la cohorte completa fueron de 27 ng/ml (intervalo, <2-393 ng/ml) para el ensayo. En esta cohorte, el análisis de correlación no paramétrica reveló un coeficiente de correlación ( $r_s$ ) de 0,955 (95 %CI, 0,947-0,962;  $p < 0,001$ ) para ambos procedimientos. De los 586 pacientes, 92 (16 %) individuos habían muerto en un año y 494 (84 %) sobrevivieron. Los análisis de curva ROC curve demuestran una AUC de 0,803 (95 % CI, 0,768-0,834) por el ensayo para predecir muerte en 1 año.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Critical Care Diagnostics, Inc.

20 <120> ANTICUERPOS CONTRA ST-2 HUMANA SOLUBLE Y ENSAYOS

<130> 20060-0008WO1

<150> US 61/345.837

25 <151> 18-05-2010

<150> US 61/322.578

<151> 09-04-2010

30 <160> 4

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

35 <211> 328

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

40

ES 2 571 994 T3

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr  
1 5 10 15  
Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu  
20 25 30  
Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp  
35 40 45  
Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg  
50 55 60  
Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala  
65 70 75 80  
Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg  
85 90 95  
Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn  
100 105 110  
Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn  
115 120 125  
Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro  
130 135 140  
Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg  
145 150 155 160  
Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala  
165 170 175  
Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr  
180 185 190  
Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe  
195 200 205  
Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu  
210 215 220  
Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly  
225 230 235 240  
Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr  
245 250 255  
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln  
260 265 270  
Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg  
275 280 285  
Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu  
290 295 300  
Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg  
305 310 315 320  
Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe

325

<210> 2  
<211> 2542  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 2

5

```

gaggagggac ctacaaagac tggaaactat tcttagctcc gtcactgact ccaagttcat 60
cccctctgtc tttcagtttg gttgagatat aggctactct tcccaactca gtcttgaaga 120
gtatcaccaa ctgccctcatg tgtggtgacc ttcactgtcg tatgccagtg actcatctgg 180
agtaatctca acaacgagtt accaatactt gctcttgatt gataaacaga atggggtttt 240
ggatccttagc aattctcaca attctcatgt attccacagc agcaaagttt agtaaacaat 300
catggggcct ggaaaatgag gctttaattg taagatgtcc tagacaagga aaacctagtt 360
acaccgtgga ttggtattac tcacaaacaa acaaaagtat tcccactcag gaaagaaatc 420
gtgtgtttgc ctcaggccaa ctctgaagt ttctaccagc tgcagttgct gattctggta 480
tttataacctg tattgtcaga agtcccacat tcaataggac tggatatgcg aatgtcacca 540
tatataaaaa acaatcagat tgcaatgttc cagattatct gatgtattca acagtatctg 600
gatcagaaaa aaattccaaa atttattgtc ctaccattga cctctacaac tggacagcac 660
ctcttgagtg gtttaagaat tgtcaggctc ttcaaggatc aaggtacagg gcgcacagt 720
catttttggc cattgataat gtgatgacty aggacgcagg tgattacacc tgtaaattta 780
tacacaatga aaatggagcc aattatagtg tgacggcgac caggtccttc acggtcagg 840
atgagcaagg cttttctctg tttccagtaa ttcggagccc tgcacaaaat gaaaataaagg 900
aagtggaaa tggaaaaaac gcaaacctaa ctgtctctgc ttgttttggg aaaggcactc 960
agttcttggc tgccgtcctg tggcagctta atggaacaaa aattacagac tttgggtgaa 1020
caagaattca acaagaggaa gggcaaaatc aaagtttcag caatgggctg gcttgtctag 1080
acatggtttt aagaatagct gacgtgaagg aagaggattt attgctgcag tacgactgtc 1140
tggccctgaa tttgcatggc ttgagaaggc acaccgtaag actaagttag aaaaatccaa 1200
gtaaggagtg tttctgagac tttgatcacc tgaactttct ctagcaagtg taagcagaat 1260
ggagtgtggt tccaagagat ccatcaagac aatgggaatg gcctgtgcca taaaatgtgc 1320
ttctcttctt cgggatgttg tttgctgtct gatctttgta gactgttctt gtttgcctgg 1380
agcttctctg ctgcttaaat tgttctgtct cccccactcc ctctatcgt tggtttgtct 1440
agaacactca gctgcttctt tggtcatect tgttttctaa ctttatgaac tccctctgtg 1500
tcactgtatg tgaaaaggaa tgcaccaaca accgtaaac gaacgtgttc ttttgtgctc 1560
ttttataact tgcattacat gttgtaagca tggfccgttc tatacctttt tctggtcata 1620
atgaacactc attttgttag cgaggggtgtt aaagtgaaca aaaaggggaa gtatcaact 1680
actgccattt cagtgaagaa atcctaggtg ctactttata ataagacatt tgttaggcca 1740
ttcttgcaat gatataaaga aatacctgag actgggtgat ttatatgaaa agaggtttaa 1800
ttggctcaca gttctgcagg ctgtatggga agcatggcgg catctgtctc tggggacacc 1860
tcaggagctt tactcatggc agaaggcaaa gcaaaggcag gcacttcaca cagtaaaagc 1920
aggagcgaga gagagggtgc acactgaaac agccagatct catgagaagt cactcactat 1980
tgcaaggaca gcatcaaaga gatggtgcta aaccattcat gatgaactca cccccatgat 2040
ccaatcacct cccaccaggc tccacctcga atactgggga ttaccattca gcatgagatt 2100
tgggcaggaa cacagaccca aaccatacca cacacattat cattgttaaa ctttgtaaag 2160
tatttaaggt acatggaaca cacgggaagt ctggtagctc agcccatttc tttattgcat 2220
ctgttattca ccatgtaatt caggtaccac gtatccagg gatcctttct tggccctcag 2280
tttgagatg acacactttc caagtactct tgtagcatcc tgtttgtatc atagcactgg 2340
tcacattgcc ttacctaaat ctgtttgaca gtctgtcctc cactgactga agctccatga 2400
gggcagggac atcatctctt ccactcttgg gtccttagtg caatacctgg cagctagcca 2460
gtgctcagct aaatatttgt tgactgaata aatgaatgca caacccaaaa aaaaaaaaaa 2520
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2542

```

<210>3  
 <211> 556  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400>3

```

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1           5           10           15
Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
           20           25           30
Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
           35           40           45
Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50           55           60

```

10



ES 2 571 994 T3

Val 65	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln 70	Leu	Leu	Lys	Phe	Leu 75	Pro	Ala	Ala	Val	Ala 80
Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr 85	Thr	Cys	Ile	Val	Arg 90	Ser	Pro	Thr	Phe	Asn 95	Arg
Thr	Gly	Tyr	Ala 100	Asn	Val	Thr	Ile	Tyr 105	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp 110	Cys	Asn
Val	Pro	Asp 115	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ser 120	Thr	Val	Ser	Gly	Ser 125	Glu	Lys	Asn
Ser	Lys 130	Ile	Tyr	Cys	Pro	Thr 135	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asn 140	Trp	Thr	Ala	Pro
Leu 145	Glu	Trp	Phe	Lys	Asn 150	Cys	Gln	Ala	Leu	Gln 155	Gly	Ser	Arg	Tyr	Arg 160
Ala	His	Lys	Ser	Phe 165	Leu	Val	Ile	Asp	Asn 170	Val	Met	Thr	Glu	Asp 175	Ala
Gly	Asp	Tyr	Thr 180	Cys	Lys	Phe	Ile	His 185	Asn	Glu	Asn	Gly	Ala 190	Asn	Tyr
Ser	Val	Thr 195	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe 200	Thr	Val	Lys	Asp	Glu 205	Gln	Gly	Phe
Ser	Leu 210	Phe	Pro	Val	Ile	Gly 215	Ala	Pro	Ala	Gln	Asn 220	Glu	Ile	Lys	Glu
Val	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn 230	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys 235	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly 240
Lys	Gly	Thr	Gln	Phe 245	Leu	Ala	Ala	Val	Leu 250	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly 255	Thr
Lys	Ile	Thr	Asp 260	Phe	Gly	Glu	Pro	Arg 265	Ile	Gln	Gln	Glu	Glu 270	Gly	Gln
Asn	Gln	Ser 275	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu 280	Ala	Cys	Leu	Asp	Met 285	Val	Leu	Arg
Ile	Ala 290	Asp	Val	Lys	Glu	Glu 295	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln 300	Tyr	Asp	Cys	Leu
Ala 305	Leu	Asn	Leu	His	Gly 310	Leu	Arg	Arg	His	Thr 315	Val	Arg	Leu	Ser	Arg 320
Lys	Asn	Pro	Ile	Asp 325	His	His	Ser	Ile	Tyr 330	Cys	Ile	Ile	Ala	Val 335	Cys
Ser	Val	Phe 340	Leu	Met	Leu	Ile	Asn	Val 345	Leu	Val	Ile	Ile	Leu 350	Lys	Met
Phe	Trp	Ile 355	Glu	Ala	Thr	Leu	Leu 360	Trp	Arg	Asp	Ile	Ala 365	Lys	Pro	Tyr
Lys	Thr 370	Arg	Asn	Asp	Gly	Lys 375	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr 380	Val	Val	Tyr	Pro
Arg 385	Asn	Tyr	Lys	Ser	Ser 390	Thr	Asp	Gly	Ala	Ser 395	Arg	Val	Glu	His	Phe 400
Val	His	Gln	Ile	Leu 405	Pro	Asp	Val	Leu	Glu 410	Asn	Lys	Cys	Gly	Tyr 415	Thr
Leu	Cys	Ile	Tyr 420	Gly	Arg	Asp	Met	Leu 425	Pro	Gly	Glu	Asp	Val 430	Val	Thr
Ala	Val	Glu 435	Thr	Asn	Ile	Arg	Lys 440	Ser	Arg	Arg	His	Ile 445	Phe	Ile	Leu
Thr	Pro 450	Gln	Ile	Thr	His	Asn 455	Lys	Glu	Phe	Ala	Tyr 460	Glu	Gln	Glu	Val
Ala 465	Leu	His	Cys	Ala	Leu 470	Ile	Gln	Asn	Asp	Ala 475	Lys	Val	Ile	Leu	Ile 480
Glu	Met	Glu	Ala	Leu 485	Ser	Glu	Leu	Asp	Met 490	Leu	Gln	Ala	Glu	Ala 495	Leu
Gln	Asp	Ser	Leu 500	Gln	His	Leu	Met	Lys 505	Val	Gln	Gly	Thr	Ile 510	Lys	Trp
Arg	Glu	Asp 515	His	Ile	Ala	Asn	Lys 520	Arg	Ser	Leu	Asn	Ser 525	Lys	Phe	Trp
Lys	His 530	Val	Arg	Tyr	Gln	Met 535	Pro	Val	Pro	Ser	Lys 540	Ile	Pro	Arg	Lys
Ala 545	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro 550	Leu	Ala	Ala	Gln	Lys 555	Gln				

<210> 4  
 <211> 2058  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

aaagagaggc tggctgttgt atttagtaaa gctataaagc tgtaagagaa attggctttc 60
tgagttgtga aactgtgggc agaaaagtga ggaagaaaga actcaagtac aaccaatga 120
ggttgagata taggctactc ttcccaactc agtcttgaag agtatcacca actgcctcat 180
gtgtggtgac cttcactgtc gtatgccagt gactcatctg gagtaatctc aacaacgagt 240
taccaatact tgctcttgat tgataaacag aatggggttt tggatcttag caattctcac 300
aattctcatg tattccacag cagcaaagtt tagtaaaca tcatggggcc tggaaaatga 360
ggctttaatt gtaagatgtc ctagacaagg aaaacctagt tacaccgtgg attggtatta 420
ctcacaaca aacaaaagta ttcccactca ggaagaaat cgtgtgtttg cctcaggcca 480
acttctgaag tttctaccag ctgcagttgc tgattctggt atttatacct gtattgtcag 540
aagtcccaca ttcaatagga ctggatatgc gaatgtcacc atatataaaa aacaatcaga 600
ttgcaatggt ccagattatt tgatgtattc aacagtatct ggatcagaaa aaaattccaa 660
aatttattgt cctaccattg acctctacaa ctggacagca cctcttgagt ggtttaagaa 720
ttgtcaggct cttcaaggat caaggtacag ggcgcacaag tcatttttgg tcattgataa 780
tgtgatgact gaggacgcag gtgattacac ctgtaaattt atacacaatg aaaatggagc 840
caattatagt gtgacggcga ccaggtcctt cacggtcaag gatgagcaag gcttttctct 900
gtttccagta atcggagccc ctgcacaaaa tgaaataaag gaagtggaaa ttggaaaaaa 960
cgcaaaccta acttgctctg cttgttttgg aaaaggcact cagttcttgg ctgccgtcct 1020
gtggcagctt aatggaacaa aaattacaga ctttggtgaa ccaagaattc aacaagagga 1080
agggcaaaat caaagtttca gcaatgggct ggcttgtcta gacatggttt taagaatagc 1140
tgacgtgaag gaagaggatt tattgctgca gtacgactgt ctggccctga atttgcattg 1200
cttgagaagg cacaccgtaa gactaagtag gaaaaatcca attgatcctc atagcatcct 1260
ctgcataaatt gcagtatgta gtgtattttt aatgctaatc aatgtcctgg ttatcctcct 1320
aaaaatgttc tggattgagg ccactctgct ctggagagac atagctaaac cttacaagac 1380
taggaatgat ggaaagctct atgatgctta tgttgtctac ccacggaact acaaaccag 1440
tacagatggg gccagtcgtg tagagcactt tgttcaccag attctgcctg atgttcttga 1500
aaataaatgt ggctatacct tatgcattta tgggagagat atgctacctg gagaagatgt 1560
agtactgca gtggaaacca acatacgaag gagcaggcgg cacattttca tcttgacccc 1620
tcagatcact cacaataagg agtttgccta cgagcaggag gttgccctgc actgtgccct 1680
catccagaac gacgccaaag tgatacttat tgagatggag gctctgagcg agctggacat 1740
gctgcaggct gaggcgcttc aggactccct ccagcatctt atgaaagtac aggggacat 1800
caagtggagg gaggaccaca ttgccataa aaggtccttg aattctaat tctggaagca 1860
cgtgaggtac caaatgcctg tgccaagcaa aattcccaga aaggcctcta gtttgactcc 1920
cttggctgcc cagaagcaat agtgcctgct gtgatgtgca aaggcatctg agtttgaagc 1980
tttctgact tctcctagct ggcttatgcc cctgcactga agtgtgagga gcaggaatat 2040
taaagggatt caggcctc

```

5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo unido específicamente al gen 2 expresado por estimulación de crecimiento (ST2) soluble humano, en el que el anticuerpo o fragmento se produce por un hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432.
2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento tiene una  $K_D$  para la unión a ST2 soluble humana igual a, o menor que,  $8,59 \times 10^{-10}$  M determinada usando resonancia de plasmón superficial.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento es quimérico o está humanizado.
- 10 4. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el fragmento se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento Fab, un fragmento  $F(ab')_2$ , y un fragmento scFv.
5. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o fragmento está glucosilado.
- 15 6. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo es el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432.
7. Un hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432.
8. Un kit que comprende:
- 20 (i) un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y  
(ii) un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o fragmento de unión a antígeno del mismo.
9. Un kit para su uso en la cuantificación de un nivel de ST2 soluble humana en una muestra de un sujeto, comprendiendo el kit:
- 25 (i) un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y  
(ii) un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431 o fragmento de unión a antígeno del mismo.
10. El kit de la reivindicación 8 o 9, en el que el fragmento de (ii) se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento Fab, un fragmento  $F(ab')_2$ , y un fragmento scFv.
- 30 11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el anticuerpo o fragmento de (ii) es quimérico o está humanizado.
12. El kit de la reivindicación 8, 9, u 11, en el que el anticuerpo de (ii) es el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC y denominado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10431.
- 35 13. Un procedimiento de cuantificación de un nivel de ST2 soluble humana en una muestra de un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y  
detectar la unión del anticuerpo o fragmento a ST2 soluble humana.
- 40 14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que el kit se proporciona como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
15. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12 y 14, que comprende adicionalmente una ST2 soluble humana recombinante aislada de una célula humana, tal como una célula renal embrionaria humana.

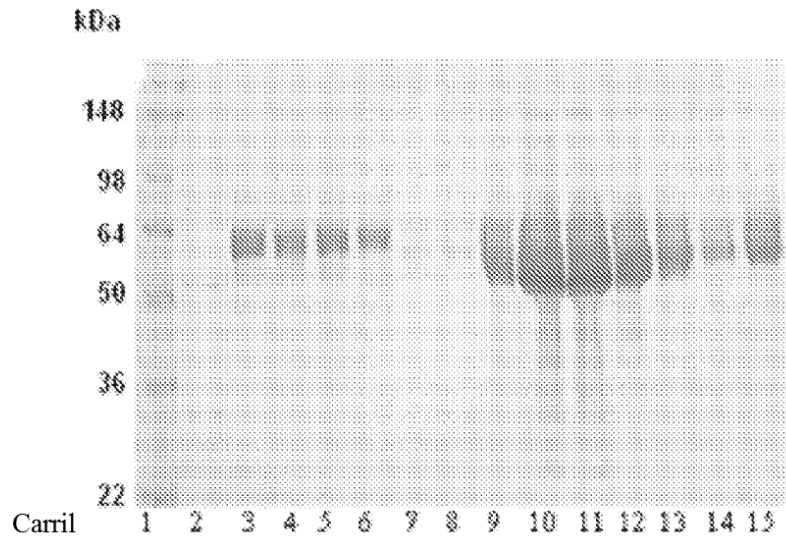


Figura 1

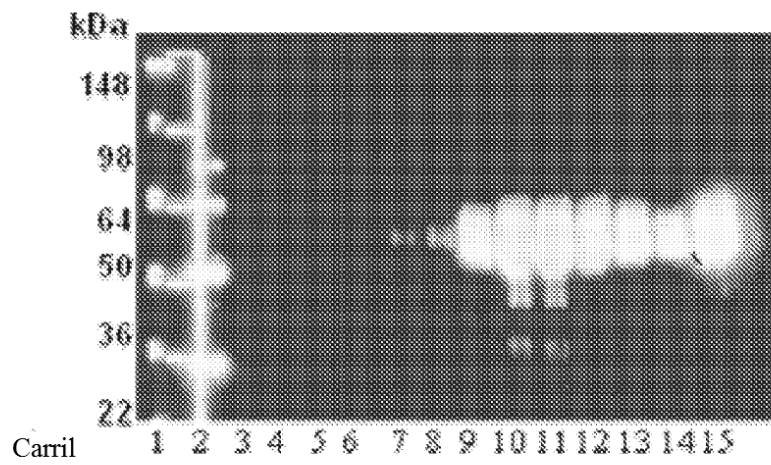
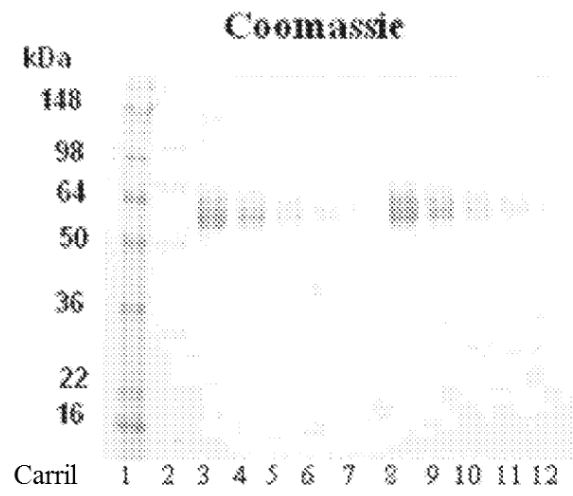
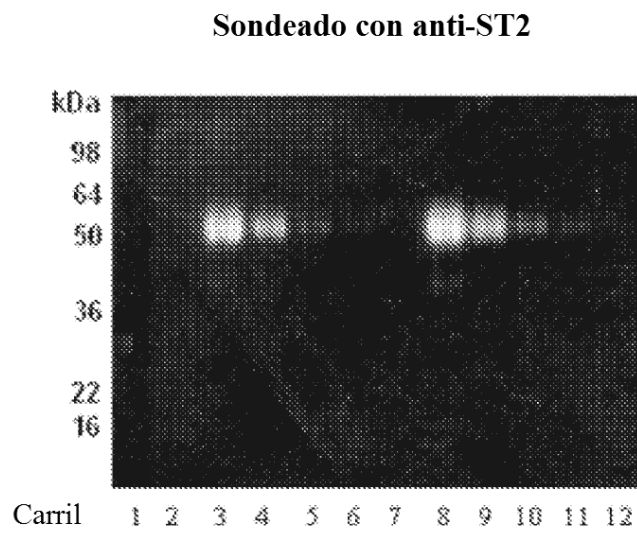


Figura 2



**Figura 3A**



**Figura 3B**

Sondeado con anti-His

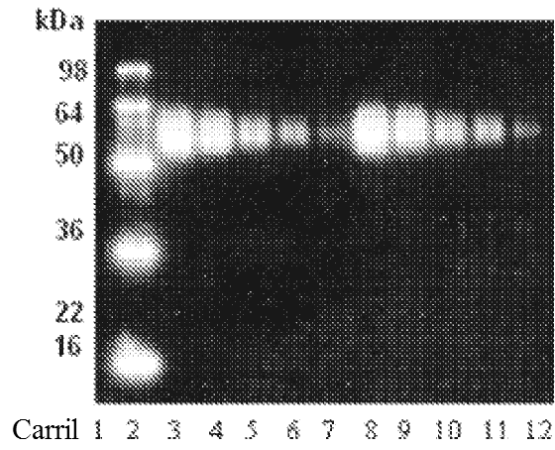


Figura 3C

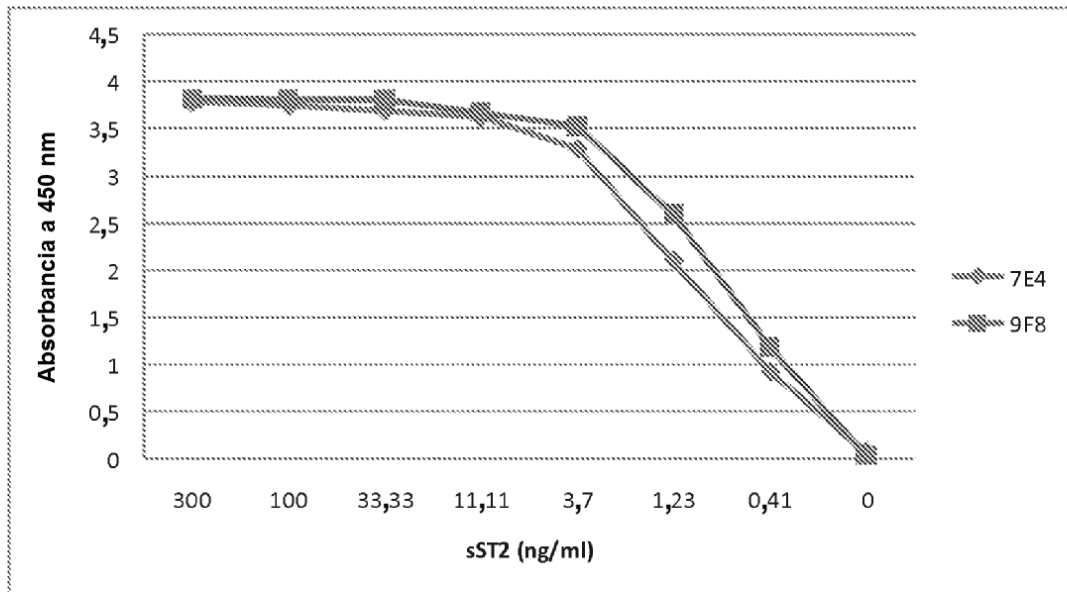


Figura 4

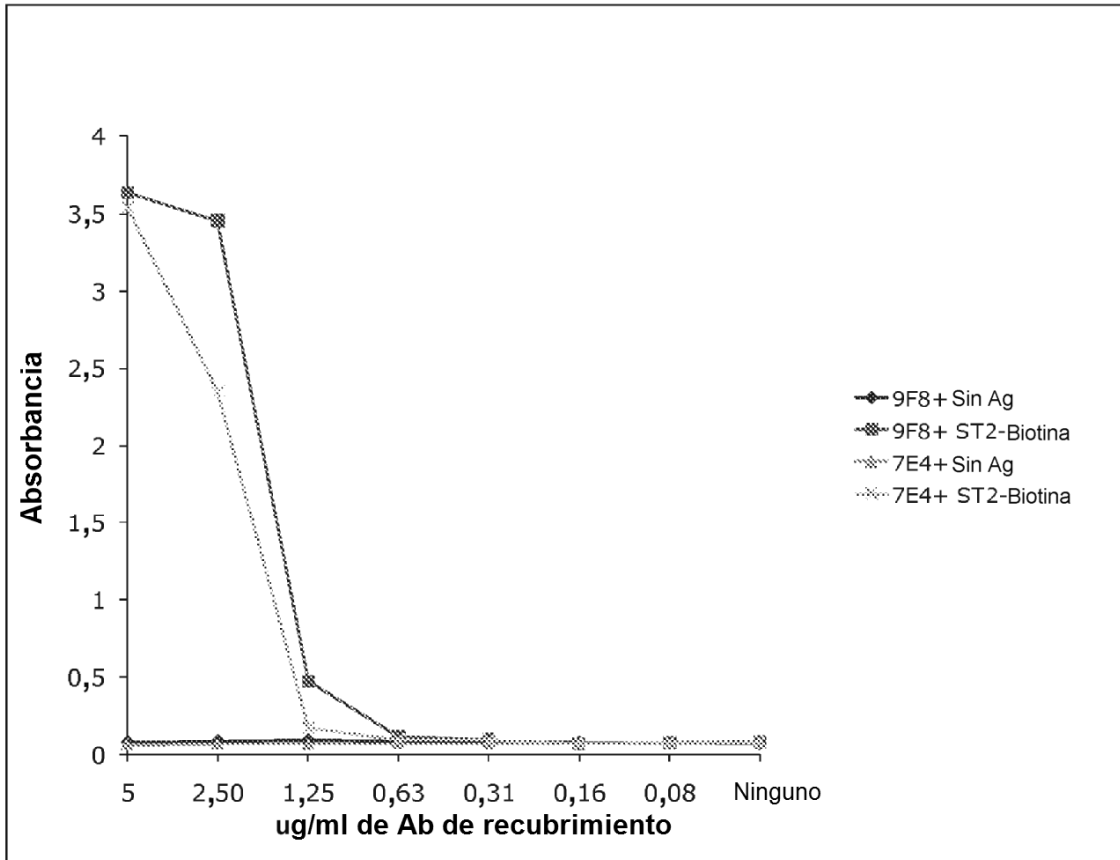


Figura 5

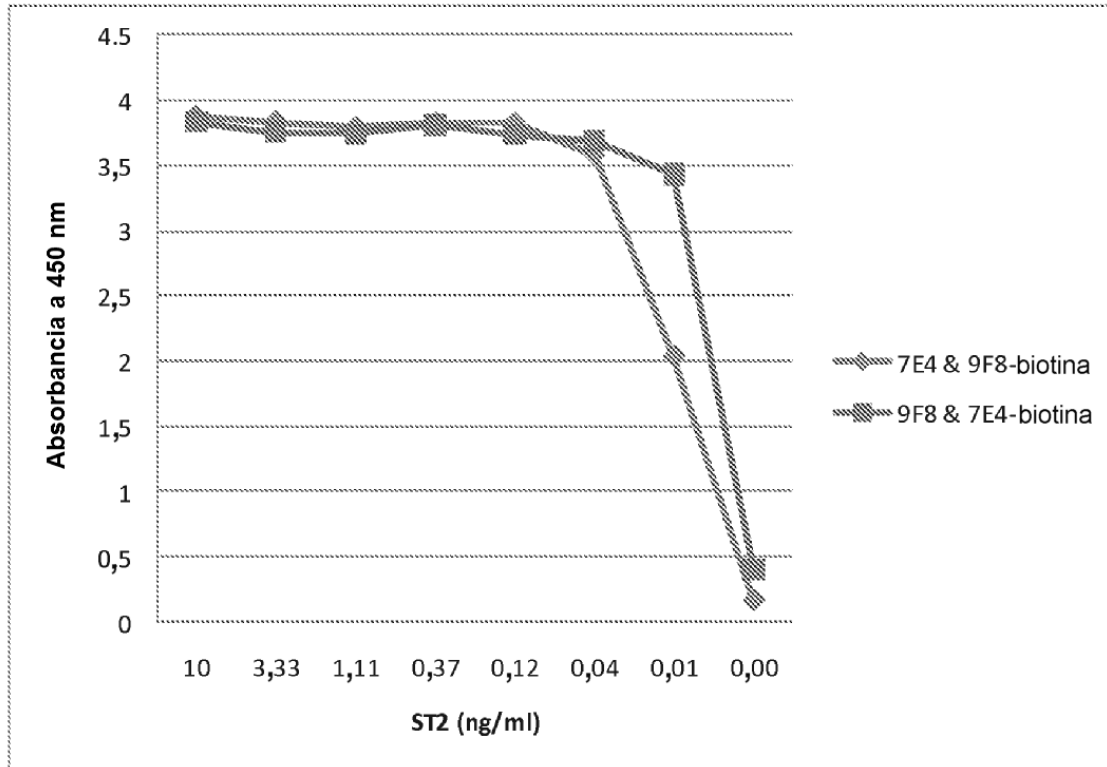


Figura 6

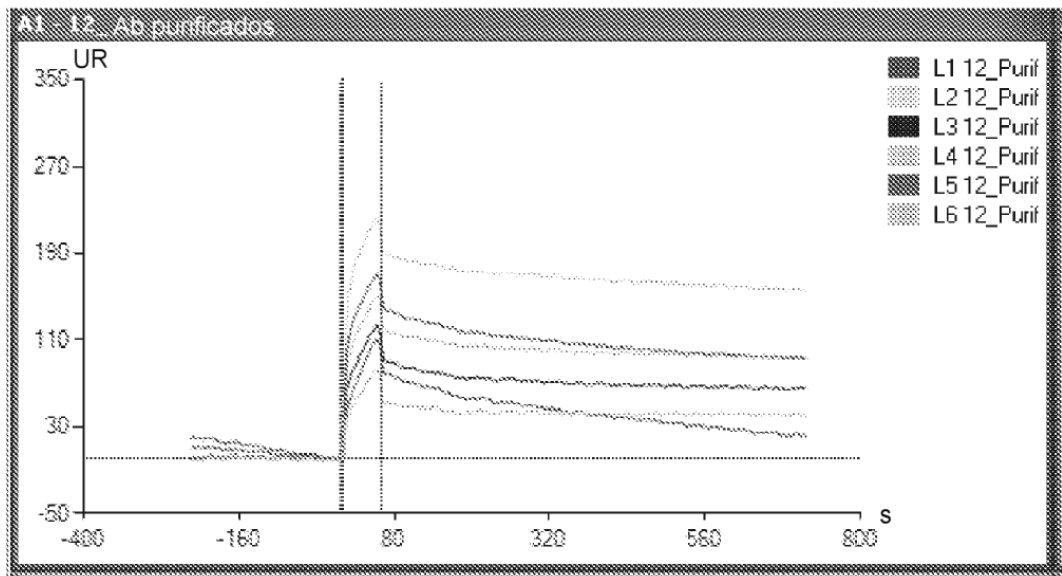


Figura 7A



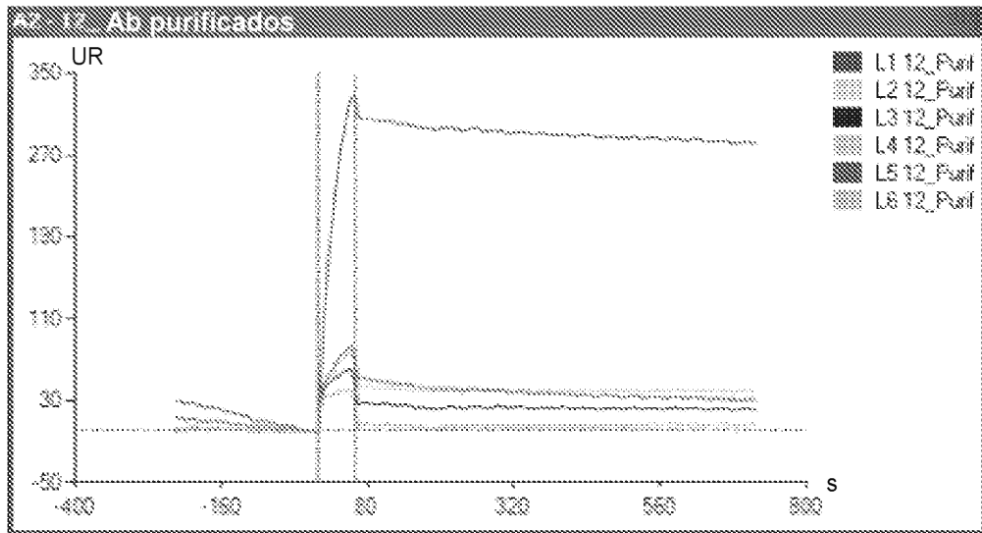


Figura 7B

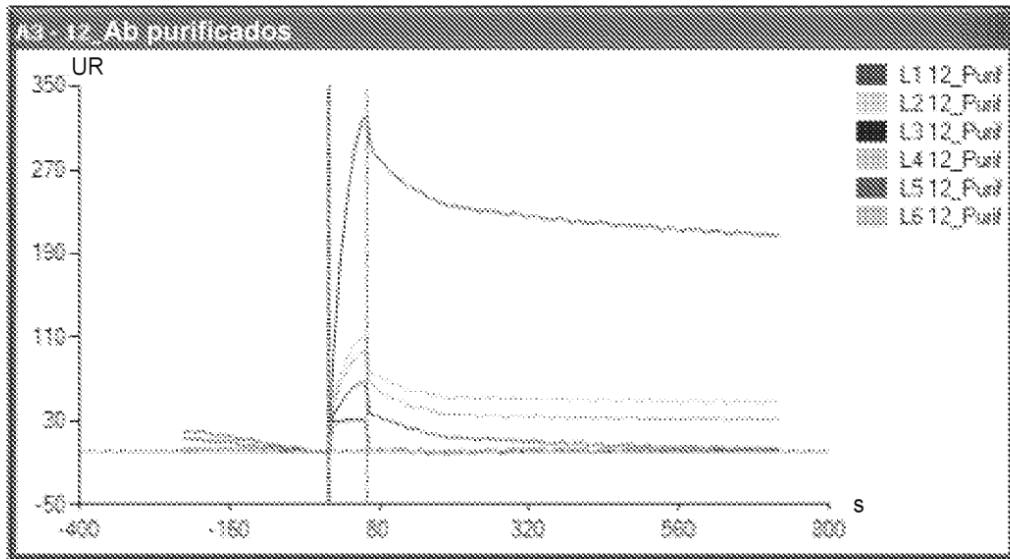


Figura 7C

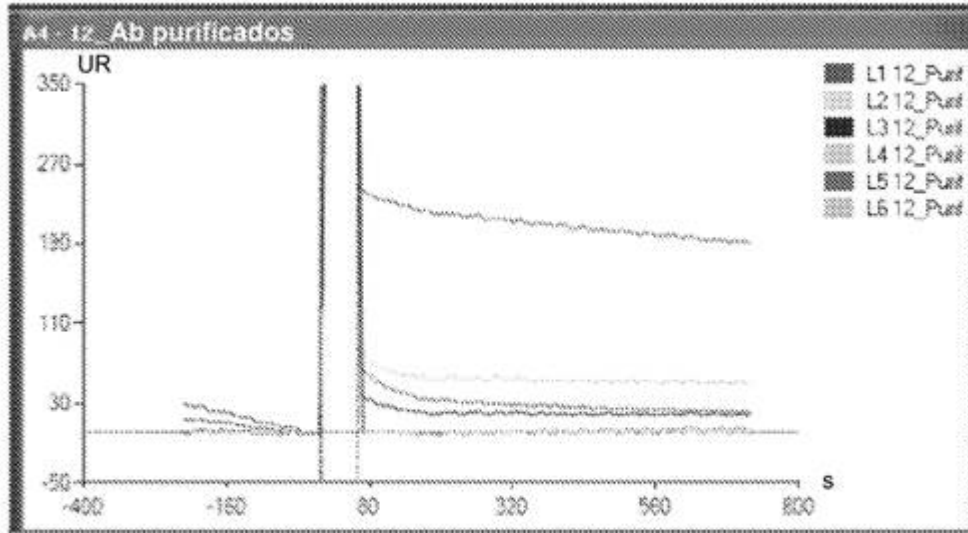


Figura 7D

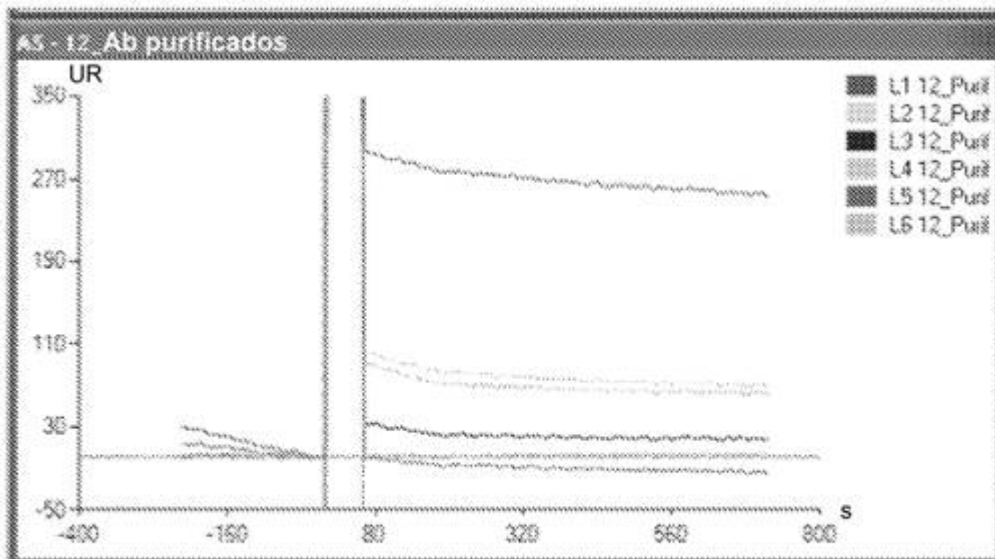


Figura 7E

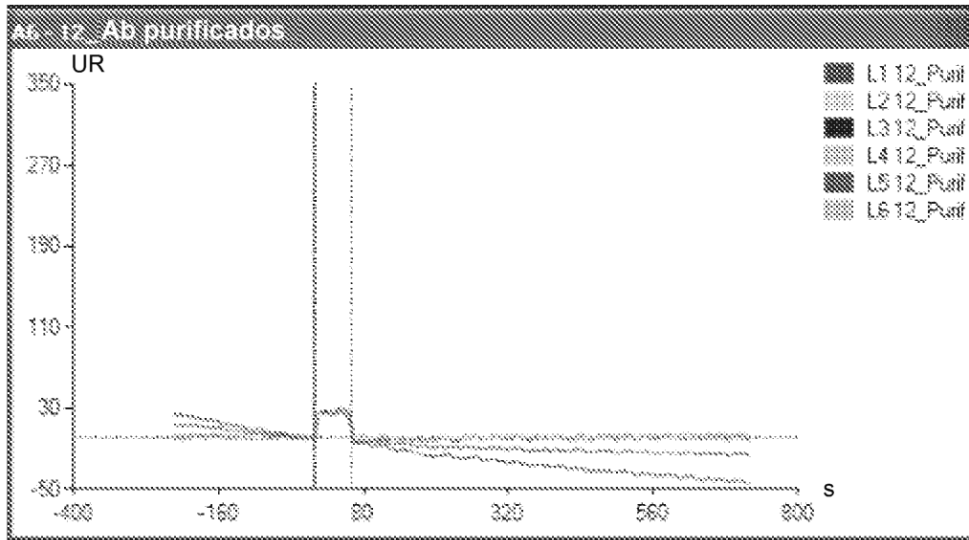


Figura 7F

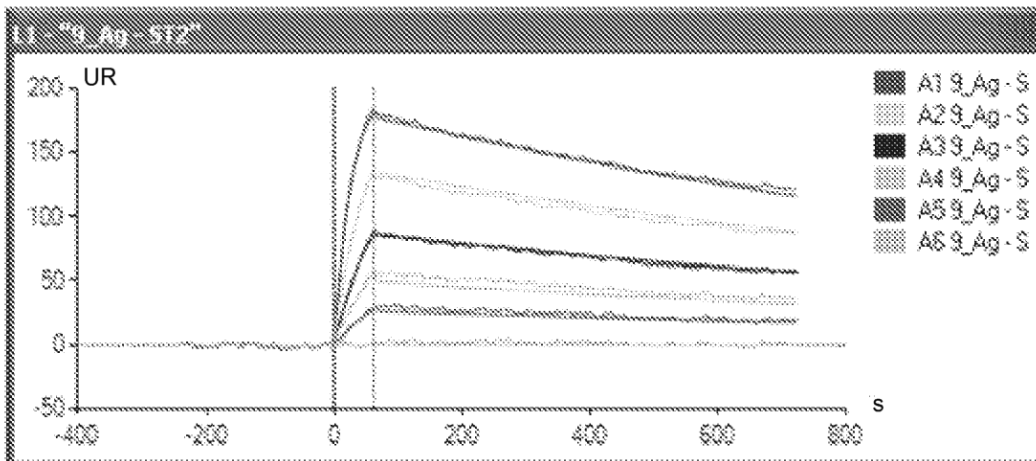


Figura 8A

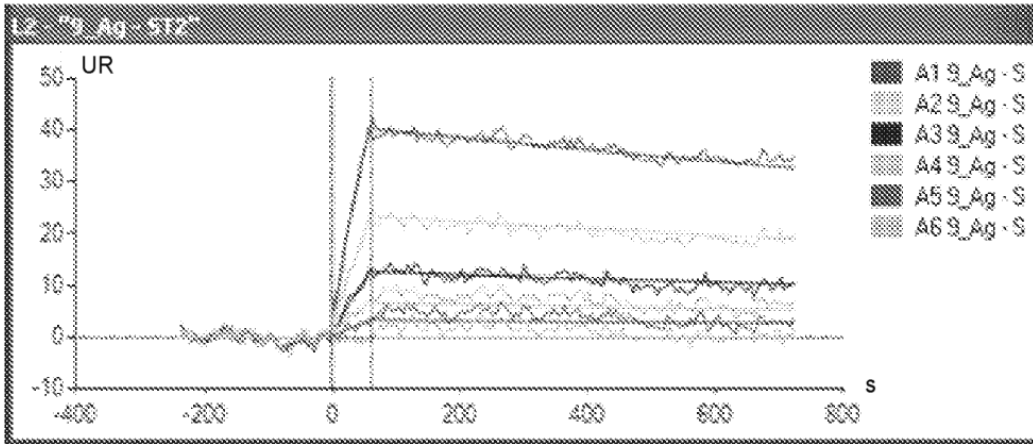


Figura 8B

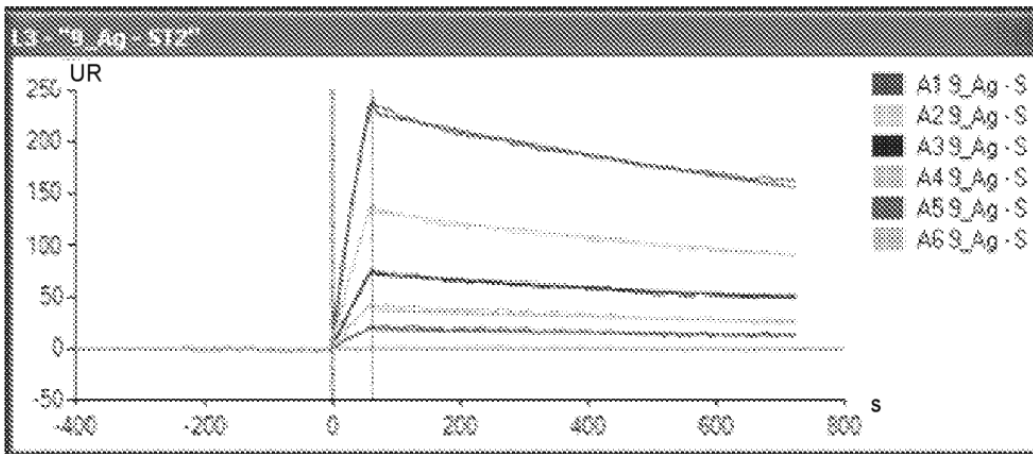


Figura 8C

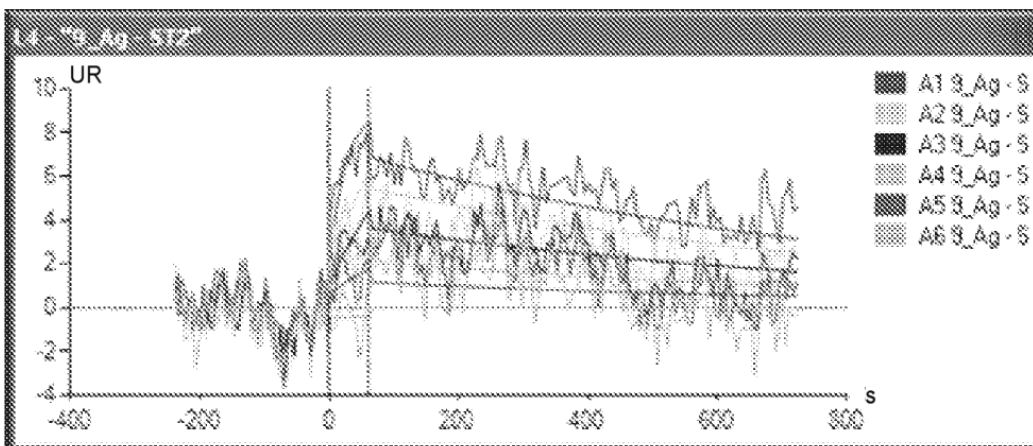


Figura 8D

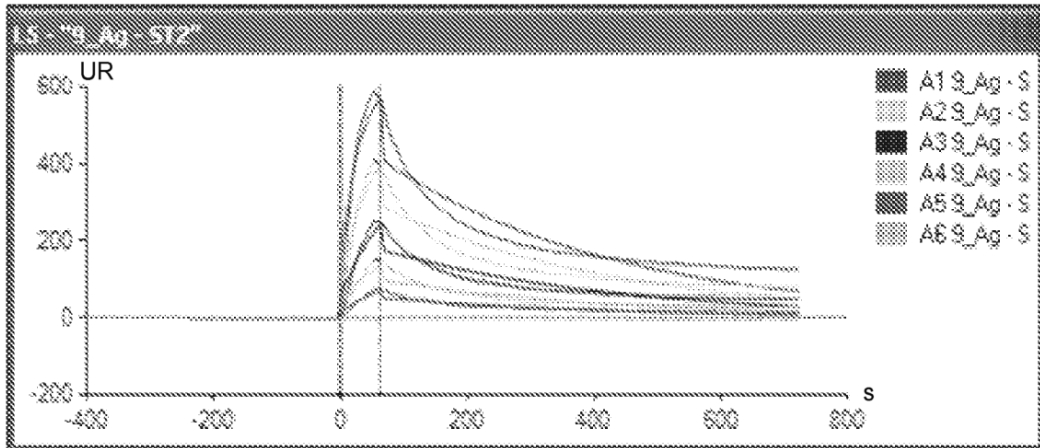


Figura 8E

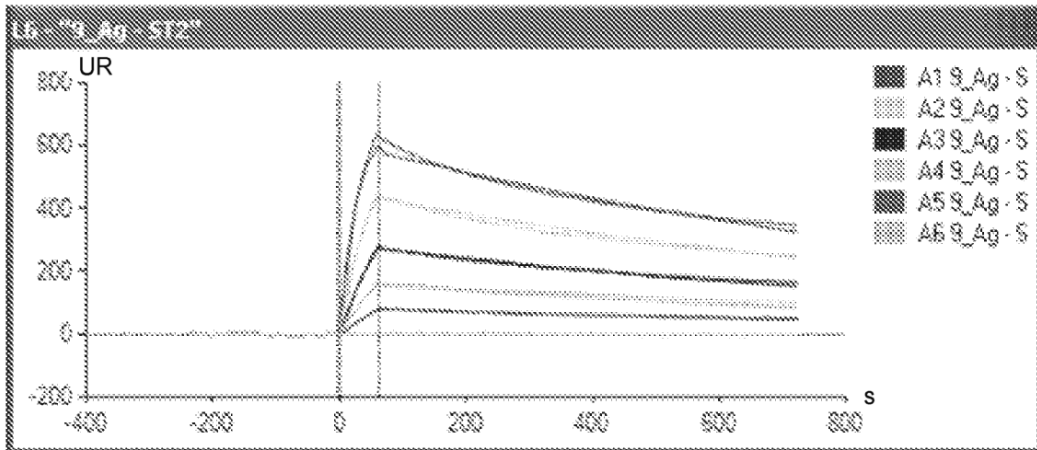


Figura 8F

Concentraciones de sST2 por tipo de tubo

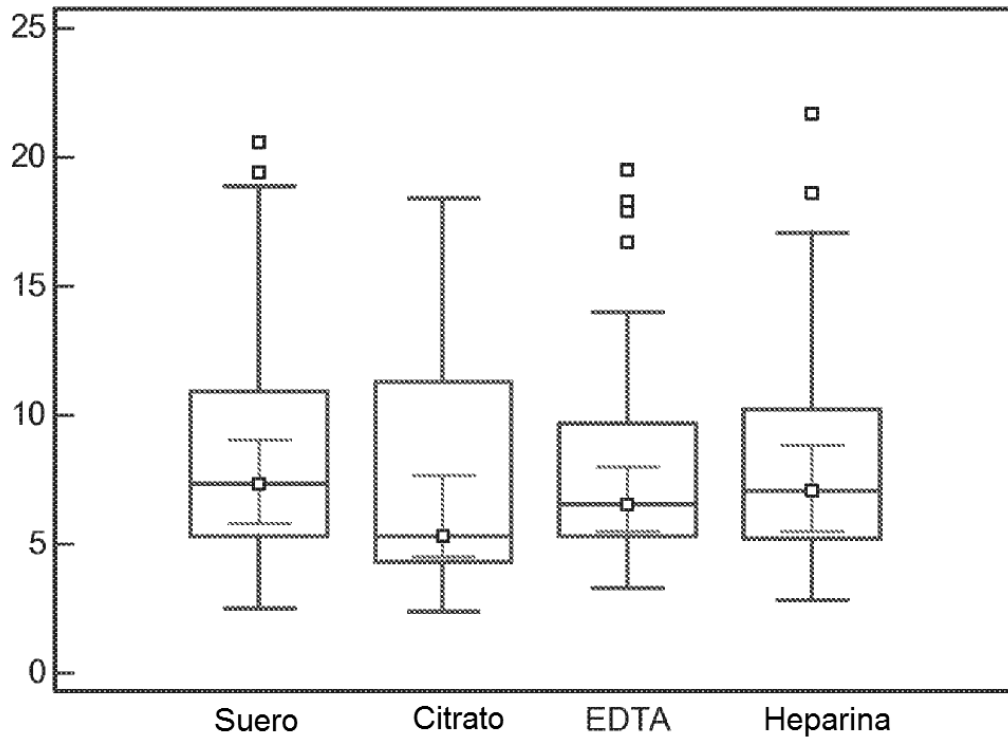


Figura 9

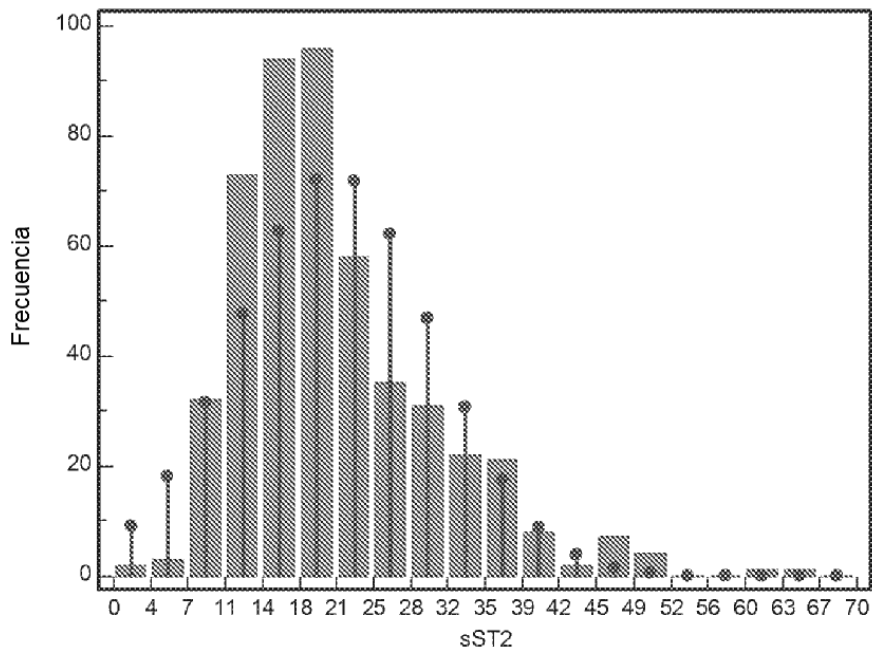


Figura 10

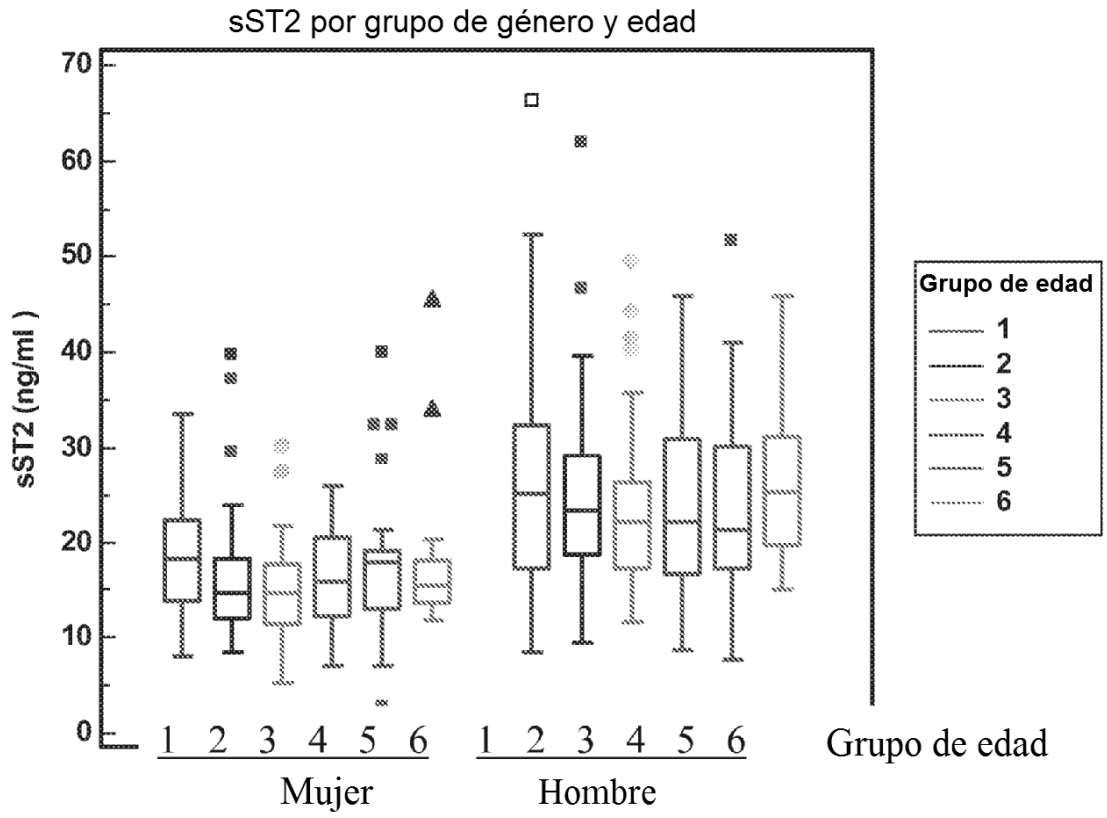


Figura 11