

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 126**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 14/715** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2012 PCT/US2012/029500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12141844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012 E 12771826 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2686689**

54 Título: **Procedimientos de predicción del riesgo de un resultado clínico adverso**

30 Prioridad:

**17.03.2011 US 201161453782 P**

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

**25.03.2020**

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 2 750 126 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

Procedimientos de predicción del riesgo de un resultado clínico adverso

**Campo técnico**

5 En la presente memoria se describen procedimientos para determinar el riesgo de un resultado clínico adverso en un sujeto, seleccionar un tratamiento terapéutico para un sujeto y seleccionar pacientes para participar en un estudio clínico.

**Sumario**

10 La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la presencia de un nivel elevado de galectina-3 o la presencia de un nivel elevado de ST2 (también conocido como receptor tipo-1 de interleucina 1 (IL1RL1)) indica un sujeto con un mayor riesgo de un resultado clínico adverso (ACO), y la presencia de un nivel elevado de galectina-3 y un nivel elevado de ST2 indica un sujeto con un riesgo muy elevado de un ACO. Por lo tanto, en algunos aspectos, los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen la determinación de los niveles de galectina-3 y ST-2 en un sujeto y, opcionalmente, la determinación de los niveles de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de proANP, NT-pro-ANP, ANP, proBNP, NT-proBNP, BNP, troponina, CRP, creatinina, 15 nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana en el sujeto. Estos procedimientos se pueden usar para determinar el riesgo de un ACO, decidir si dar de alta o iniciar, continuar o finalizar el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado), seleccionar un sujeto para participar en un estudio clínico o seleccionar un tratamiento terapéutico para un sujeto.

20 Por consiguiente, en un aspecto proporcionado en la presente memoria, se encuentran procedimientos para evaluar el riesgo de un ACO en un sujeto que incluyen las etapas de: (a) determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, y (b) determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, donde los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto en relación con los niveles de referencia de ST2 y galectina-3 indican el riesgo del sujeto de un ACO. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel elevado de ST2 o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 indica un mayor riesgo de un ACO, y la presencia de un nivel elevado de ST2 y un nivel elevado de galectina-3 indica un riesgo mucho mayor de un ACO. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel no elevado de ST2 y un nivel no elevado de galectina-3 indica un riesgo reducido de un ACO. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el riesgo de un ACO es dentro de 1 año o dentro de 30 días.

30 También se proporcionan procedimientos para decidir si dar de alta o iniciar, finalizar o continuar el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado que incluye las etapas de: (a) determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, y (b) determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, donde los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto en relación con los niveles de ST2 y galectina-3 de referencia determinan si el sujeto debe ser dado de alta, recibir tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o si el tratamiento debe iniciarse o finalizarse. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel elevado de ST2 o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 indica que el sujeto debe recibir un tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o que se debe iniciar el tratamiento, y la presencia de un nivel elevado de ST2 y un nivel elevado de galectina-3 fuertemente indica que el sujeto debe recibir un tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o que el tratamiento debe iniciarse. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel no elevado de ST2 y un nivel no elevado de galectina-3 indica que el sujeto debe ser dado de alta, recibir tratamiento de forma ambulatoria o que el tratamiento debe finalizar.

45 En otros aspectos, los procedimientos de selección de un sujeto para participar en un estudio clínico incluyen las etapas de: (a) determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, y (b) determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, y seleccionar al sujeto para participar en un estudio clínico si los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto en relación con los niveles de ST2 y galectina-3 de referencia indican que el sujeto debe seleccionarse para participar en un estudio clínico. En algunas realizaciones de estos procedimientos, la presencia de un nivel elevado de ST2 o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 indica que el sujeto debe seleccionarse para participar en un estudio clínico y, en algunos aspectos, la presencia de un nivel elevado de ST2 y un nivel elevado de galectina-3 indican fuertemente que el sujeto debe seleccionarse para participar en un estudio clínico. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel no elevado de ST2 y/o la presencia de un nivel no elevado de galectina-3 indica que el sujeto debe ser excluido de participar en un estudio clínico.

55 También se proporcionan procedimientos para seleccionar un tratamiento terapéutico para un sujeto que incluyen las etapas de: (a) determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, y (b) determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica (por ejemplo, suero) del sujeto, donde los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto en relación con los niveles de referencia de ST2 y galectina-3 se usan para seleccionar un tratamiento terapéutico para el sujeto. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel elevado de ST2 o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 se usa para seleccionar el tratamiento terapéutico

para el sujeto, y la presencia de un nivel elevado de ST2 y un nivel elevado de galectina-3 se utiliza predominantemente para seleccionar el tratamiento terapéutico para el sujeto. En algunos aspectos de estos procedimientos, la presencia de un nivel no elevado de ST2 y/o la presencia de un nivel no elevado de galectina-3 se usa para seleccionar el tratamiento terapéutico para el sujeto. El tratamiento terapéutico puede seleccionarse del grupo de: nitratos, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, 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, captoril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril y trandolapril), antagonistas de aldosterona (por ejemplo, espironolactona, eplerenona, canrenoato (potasio de canrenoato), prorenona (potasio de prorenoato) y mexrenona (potasio de mexrenoato)), inhibidores de renina (por ejemplo, aliskiren, remikiren y enalkiren) y bloqueadores de los receptores de angiotensina II (por ejemplo, valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán y olmesartán) y agentes reductores del colesterol (por ejemplo, una estatina).

En algunos aspectos de todos los procedimientos descritos en la presente memoria, el ACO puede ser rehospitalización, la recurrencia de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, un aumento en la gravedad de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, un aumento en la frecuencia de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, mortalidad (por ejemplo, mortalidad debida a CVD), admisión a un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital o centro de atención asistida) o trasplante de órganos (por ejemplo, trasplante de corazón). En algunos aspectos, el estado de la enfermedad puede ser angina, enfermedad cardiovascular e insuficiencia cardíaca. En los procedimientos anteriores, la rehospitalización o admisión puede ser por enfermedad cardiovascular.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y/o dislipidemia. En algunos aspectos de los procedimientos anteriores, el sujeto puede ser no diagnosticado, normal o aparentemente sano. En algunos ejemplos de todos los procedimientos anteriores, la muestra puede ser suero, sangre o plasma. En algunos ejemplos de los procedimientos anteriores, la muestra en la etapa (a) y la muestra en la etapa (b) se obtienen del sujeto al mismo tiempo.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el sujeto puede tener un BMI elevado, un BMI de 25-29, un BMI de  $\geq 30$  o insuficiencia renal. En ejemplos adicionales de cualquiera de los procedimientos anteriores, el nivel de referencia de ST2 es un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene una enfermedad cardiovascular de alto riesgo; el nivel de referencia de ST2 es un nivel umbral de ST2; el nivel de referencia de galectina-3 es un nivel de galectina-3 en un sujeto que no tiene enfermedad cardiovascular de alto riesgo o que no tiene enfermedad cardiovascular positiva a galectina-3; o el nivel de referencia de galectina-3 es un nivel de galectina-3 antes o después del inicio de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); antes o después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); antes o después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); o en un momento diferente durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); o antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

En algunos aspectos de todos los procedimientos anteriores, el procedimiento incluye además determinar el nivel de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) marcadores adicionales en el sujeto (por ejemplo, proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP, BNP, troponina, CRP, creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), enzimas de función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana).

También se proporcionan kits que contienen un anticuerpo que se enlaza específicamente a ST2, un anticuerpo que se enlaza específicamente a galectina-3, e instrucciones para usar el kit en cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria.

Por la expresión "resultado clínico adverso" o "ACO" se entiende un aumento (por ejemplo, al menos uno, dos, tres o cuatro) en el número de síntomas o la gravedad o frecuencia de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas en un sujeto, muerte o tratamiento terapéutico que es necesario por el aumento (por ejemplo, al menos uno, dos, tres o cuatro) en el número o la gravedad o frecuencia de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas en un sujeto. Los ejemplos no limitantes de un ACO incluyen la rehospitalización, la recurrencia de

uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardiovascular), un aumento en la gravedad de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, un aumento en la frecuencia de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, mortalidad (por ejemplo, mortalidad por una enfermedad cardiovascular), ingreso a un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital o centro de atención asistida) o trasplante de órganos (por ejemplo, trasplante de corazón). Los síntomas pueden estar asociados con un estado de enfermedad específico, como una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto o dislipidemia.

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

Por el término "galectina-3" o "gal-3" se entiende una proteína que contiene una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) al número de acceso NCBI NP\_001170859 (SEQ ID NO: 3), una proteína que contiene una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) al número de acceso NCBI NP\_002297 (SEQ ID NO: 4), un ácido nucleico que contiene una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) al número de acceso NCBI NM\_001177388.1 (SEQ ID NO: 5), un ácido nucleico que contiene una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) al número de acceso NCBI NM\_002306.3 (SEQ ID NO: 6).

Por el término "elevado" o "elevación" se entiende una diferencia estadísticamente significativa (por ejemplo, un aumento de al menos 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 260 %, 280 % o 300 % de aumento) en un nivel determinado o medido (por ejemplo, un nivel de galectina-3 o de proteína ST2 o ácido nucleico) en comparación con un nivel de referencia (por ejemplo, un nivel de galectina-3 en un sujeto que no tiene CVD de alto riesgo o que no tiene enfermedad cardiovascular positiva a galectina-3, un nivel umbral de galectina-3, un nivel de ST2 en un sujeto que no tiene CVD y un nivel umbral de ST2). El nivel de referencia de ST2 o galectina-3 puede ser un nivel de proteína o ácido nucleico. Niveles de referencia adicionales de ST2 y galectina-3 se describen en la presente memoria.

Por la expresión "centro de atención médica" se entiende un lugar donde un sujeto puede recibir atención médica de un profesional de la salud (por ejemplo, una enfermera, un médico o un asistente médico). Ejemplos no limitantes de centros de atención médica incluyen hospitales, clínicas y centros de atención asistida (por ejemplo, un hogar de ancianos).

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 ser determinado por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Un nivel de referencia puede ser un nivel basal o un nivel en el mismo paciente medido en un punto en el tiempo anterior o posterior. Algunos ejemplos no limitantes de niveles de referencia de ST2 incluyen el nivel de ST2 en un sujeto que: no tiene CVD de alto riesgo, no tiene insuficiencia renal o tiene un BMI inferior a 25. En la presente memoria se describen poblaciones de pacientes de control adicionales. Ejemplos adicionales de niveles de referencia de ST2 incluyen niveles umbral de ST2. Ejemplos no limitantes de niveles de referencia de ST2 son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria.

En algunos aspectos, la proporción de dos niveles de ST2 en un sujeto se compara con un nivel de referencia que es una proporción de niveles de ST2 medidos en un sujeto (por ejemplo, cualquiera de los sujetos de control descritos en la presente memoria o el mismo sujeto), por ejemplo, un nivel de referencia puede ser una proporción de los niveles de ST2 antes y después del inicio de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o

hipertensión) o una proporción de los niveles de ST2 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

Los ejemplos no limitantes de niveles de referencia de galectina-3 incluyen el nivel de galectina-3 en un sujeto que: no tiene CVD de alto riesgo, no tiene enfermedad cardiovascular positiva a galectina-3, no tiene insuficiencia renal o tiene un BMI menor de 25. En la presente memoria se describen poblaciones de pacientes de control adicionales y niveles umbral para un control de galectina-3. Ejemplos adicionales no limitantes de niveles de referencia de galectina-3 incluyen niveles umbral de galectina-3. Ejemplos no limitantes de niveles de referencia de galectina-3 son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria.

Ejemplos adicionales de un nivel de referencia de galectina-3 es un nivel de galectina-3 antes o después del inicio de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); un nivel de galectina-3 antes o después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); un nivel de galectina-3 antes o después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); o un nivel de galectina-3 en un punto de tiempo diferente durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión), o antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

En algunos aspectos, la proporción de dos niveles de galectina-3 en un sujeto se compara con un nivel de referencia que es una proporción de niveles de galectina-3 medidos en un sujeto (por ejemplo, cualquiera de los sujetos de control descritos en la presente memoria o el mismo sujeto), por ejemplo, un nivel de referencia puede ser una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después de la aparición de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de galectina-3 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión), o una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

Por la expresión "tratamiento terapéutico" o "tratamiento" se entiende la administración de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos a un sujeto o la realización de un procedimiento médico en el cuerpo de un sujeto (por ejemplo, cirugía, como trasplante de órganos o cirugía cardíaca). Ejemplos no limitantes de agentes farmacéuticos que pueden administrarse a un sujeto incluyen nitratos, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, 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 bloqueadores de los receptores de angiotensina II) y agentes reductores del colesterol (por ejemplo, una estatina). La expresión tratamiento terapéutico también incluye un ajuste (por ejemplo, aumentar o disminuir) en la dosis o frecuencia de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos que un sujeto puede estar tomando, la administración de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) nuevos agentes farmacéuticos para el sujeto, o la eliminación de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos del plan de tratamiento del sujeto.

Como se usa en la presente memoria, un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En todas las realizaciones, se pueden usar ácidos nucleicos humanos, polipéptidos humanos y sujetos humanos.

Como se usa en la presente memoria, una "muestra biológica" incluye uno o más de sangre, suero, plasma, orina y tejido corporal. En algunas realizaciones, una muestra es una muestra de suero o sangre.

Por la expresión "estado de enfermedad" se entiende la manifestación de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) síntomas en un sujeto que indican una disminución anormal en la viabilidad y/o actividad biológica de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) tejidos en el cuerpo del sujeto. Los ejemplos no limitantes de estados de enfermedad en un sujeto incluyen una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia

cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia.

Por la frase "síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad" se entiende uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) síntomas que se manifiestan por un sujeto que tiene un estado de enfermedad particular.

5 Los síntomas físicos asociados con varios estados de enfermedad son conocidos en la técnica por profesionales de la salud médica (por ejemplo, médicos). Los ejemplos no limitantes de síntomas físicos asociados con una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina) incluyen dificultad para respirar, palpitaciones del corazón, aumento de la frecuencia cardíaca, debilidad, mareos, náuseas, sudoración, molestias o presión en el pecho, dolor en el pecho, dolor en el brazo, llenura, indigestión, sudoración, sibilancia, apnea del sueño o ansiedad.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece la presente invención. Los procedimientos y materiales se describen en la presente memoria para su uso en la presente invención; pueden usarse también otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

15 Los detalles de uno o más aspectos de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

### Descripción de dibujos

20 La Figura 1 es dos gráficos que representan los datos de un análisis Kaplan-Meier (K-M) de galectina-3 para 1 año (Figura 1A) o 4 años (Figura 1B), que muestran la probabilidad de supervivencia de los sujetos que tienen niveles de galectina-3 bajos (por debajo del nivel de la mediana de galectina-3, 0) o elevados (mayor o igual que el nivel de la mediana de galectina-3, 1).

25 Las Figuras 2A y 2B, juntas, son dos gráficos que representan los datos del análisis K-M de ST2 durante 1 año (Figura 2A) o 4 años (Figura 2B), que muestran la probabilidad de supervivencia de los sujetos que tienen un nivel de ST2 soluble bajo (por debajo del nivel de la mediana de ST2 soluble, 0) o niveles elevados (mayor o igual que el nivel de la mediana de ST2 soluble, 1).

30 La Figura 2C es un gráfico que representa los datos de un análisis K-M de ST2 soluble, que muestra la probabilidad de supervivencia de los sujetos que tienen niveles de ST2 soluble bajos (por debajo de 35 ng/ml, 0) o niveles elevados (mayor o igual a 35 ng/ml, 1).

35 La figura 3 es un gráfico que representa los datos de un análisis K-M de ST2 soluble más galectina-3, que muestra la probabilidad de supervivencia de sujetos con niveles de ST2 soluble y galectina-3 por debajo del nivel (1) de la mediana, sujetos con un nivel de ST2 soluble por debajo del nivel de la mediana y un nivel de galectina-3 mayor o igual al nivel (2) de la mediana, sujetos con un nivel de ST2 soluble mayor o igual al nivel de la mediana de ST2 soluble y un nivel de galectina-3 por debajo del nivel (3) de la mediana de galectina-3, y sujetos con un nivel de ST2 soluble mayor que o igual a la mediana de los niveles de ST2 soluble y un nivel de galectina-3 mayor o igual al nivel (4) de la mediana de galectina-3.

### Descripción detallada

40 Se proporcionan procedimientos para evaluar el riesgo de un ACO en un sujeto (por ejemplo, un humano), decidir si iniciar, finalizar o continuar el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, tratar a pacientes hospitalizados), seleccionar un sujeto (por ejemplo, un humano) para participar en un estudio clínico y seleccionar un sujeto (por ejemplo, un humano) para el tratamiento terapéutico, incluidas las etapas para determinar (por ejemplo, midiendo o ensayando) un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y determinar (por ejemplo, midiendo o ensayando) un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto. También se proporcionan kits para realizar estos procedimientos.

### 45 Galectina-3

La galectina-3 es un miembro de la familia galectina, que consiste en lectinas animales que enlazan a los  $\beta$ -galactósidos. Los ejemplos no limitantes de la proteína galectina-3 incluyen proteínas que contienen una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) a la secuencia de números de acceso NCBI NP\_001170859 o NP\_002297. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos de galectina-3 incluyen ácidos nucleicos que contienen una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) a la secuencia de los números de acceso NCBI NM\_001177399.1 o NM\_002306.3.

55 Recientemente, se ha sugerido un papel para la galectina-3 en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (Sharma et al., Circulation 110:3121-3128 (2004)). Se observó que la galectina-3 está específicamente sobrerregulada en la insuficiencia cardíaca descompensada en comparación con la insuficiencia cardíaca compensada en modelos

animales de insuficiencia cardíaca. La galectina-3 se ha propuesto recientemente como un biomarcador útil involucrado en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (de Boer et al., *Eur. J. Heart Failure* 11:811-817 (2009)). La galectina-3 se distribuye ampliamente en todo el cuerpo, incluida la expresión en el corazón, cerebro y vasos (Yang et al., *Expert Rev. Mol. Med.* 13:e17-e39 (2008)). Específicamente, la secreción de galectina-3 está asociada con la activación de fibroblastos y fibrosis (Yang et al., *supra*).

La insuficiencia cardíaca (HF) es un gran problema médico y epidemiológico, y estudios recientes, tanto en HF aguda como crónica, indican que está asociada con una alta morbilidad y mortalidad (Jessup et al., *Circulation* 48:1217-1224 (2009)) La identificación temprana de pacientes de alto riesgo puede afectar favorablemente el resultado y se reconoce cada vez más que los biomarcadores tienen un valor clínico importante a este respecto (Jessup et al., *supra*).

Van Kimmenade et al. publicaron el primer estudio clínico que evaluó el papel potencial de la galectina-3 como biomarcador plasmático en la insuficiencia cardíaca aguda. (*J. Am. Coll. Cardiol.* 48:1217-1224 (2006)). En este estudio, se evaluaron 599 sujetos con disnea aguda con el objetivo de establecer la utilidad del péptido natriurético cerebral con prohormona N-terminal (NT-proBNP), galectina-3 y apelina para diagnosticar la insuficiencia cardíaca y predecir el resultado. Se recogió una muestra de sangre al inicio del estudio, y se midieron NT-proBNP, galectina-3 y apelina en esa muestra. Un total de 209 pacientes en esta cohorte fueron diagnosticados con insuficiencia cardíaca. En este análisis, la galectina-3 no fue significativa para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca, pero fue significativa para el pronóstico en pacientes con insuficiencia cardíaca. Para predecir el pronóstico a corto plazo (60 días, mortalidad primaria de punto final por todas las causas [n = 17]), la galectina-3 fue el predictor más poderoso en comparación con NT-proBNP y apelina: un AUC para galectina-3 de 0,74 (P = 0,0001) y un AUC para NT-proBNP de 0,67 (P = 0,009), siendo la diferencia casi significativa (P = 0,05). En el análisis multivariado, la galectina-3 fue el predictor más fuerte de muerte dentro de un período de seguimiento de 60 días. Sin embargo, este estudio proporciona un fuerte apoyo para la exploración de la galectina-3 como un biomarcador que puede predecir el pronóstico, mientras que su utilidad para detectar la insuficiencia cardíaca o agregar valor incremental (sobre correlacionados clínicos utilizados actualmente y NT-proBNP) en pruebas de diagnóstico de insuficiencia cardíaca sigue sin estar clara.

Un estudio más grande en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (n = 232) mostró que la galectina-3 predice el resultado a largo plazo (mediana de seguimiento, 3,4 años; HR, 1,95; 95 % CI, 1,24-3,09; P = 0,004) (Lok et al., *Clin. Res. Cardiol.* 99: 323-328 (2010)). Debido a que no se midieron muchos otros biomarcadores de insuficiencia cardíaca, es imposible valorar el papel preciso de la galectina-3 en esta cohorte de este estudio.

La determinación del nivel de galectina-3 en un sujeto generalmente incluye la obtención de una muestra biológica, por ejemplo, plasma, suero o sangre, del sujeto. En algunos aspectos, los niveles de galectina-3 en la muestra se pueden determinar midiendo los niveles de polipéptido utilizando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria, por ejemplo, inmunoensayos, tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). Un ejemplar de kit de ELISA que está disponible comercialmente es el kit galectina-3 ELISA disponible de EMD Chemicals. Alternativamente, los niveles de ARNm de galectina-3 se pueden medir, de nuevo usando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria, por ejemplo, mediante PCR cuantitativo o análisis de inmunoprecipitación Northern.

Por ejemplo, un procedimiento como se describe en la presente memoria, por ejemplo, evaluar el riesgo de un ACO en un sujeto, puede incluir poner en contacto una muestra de un sujeto, por ejemplo, una muestra que incluye sangre, suero o plasma, con una composición de enlace (por ejemplo, una sonda de anticuerpos u oligonucleótidos) que se enlaza específicamente a un polipéptido o ácido nucleico de galectina-3. Los procedimientos también pueden incluir poner en contacto una muestra de un sujeto de control, sujeto normal o tejido o fluido normal del sujeto de prueba, con la composición de enlace, por ejemplo, para proporcionar un nivel de referencia de galectina-3.

Un anticuerpo que "se enlaza específicamente a" un antígeno, se enlaza preferentemente al antígeno en una muestra que contiene otras proteínas. El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una porción inmunológicamente activa de la misma, es decir, una porción de enlace a antígeno. Los ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. El anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado, completamente humano, no humano, por ejemplo, murino, monoespecífico o de cadena única. En algunos aspectos tiene función efectora y puede fijar el complemento. Para la medición de ST2, como se describe más adelante, se puede usar un anticuerpo producido a partir del hibridoma depositado en la Colección Tipo Americana de Cultivos y designado por la Designación de Depósito de Patente PTA-10432.

Una "sonda de oligonucleótidos" (también conocida simplemente como "sonda") es un ácido nucleico que tiene al menos 10, y menos de 200 (típicamente menos de aproximadamente 100 o 50) pares de bases de longitud. Una sonda que "se enlaza específicamente a" un ácido nucleico diana se hibrida al diana bajo condiciones de alta rigurosidad. Como se usa en la presente memoria, el término "se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad" describe condiciones para hibridación y lavado. Como se usa en la presente memoria, las condiciones de alta rigurosidad son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados a SSC 0,2X, SDS al 1 %

a 65 °C. Las personas experimentadas en la técnica conocen procedimientos para realizar ensayos de hibridación de ácido nucleico y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

5 La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento (por ejemplo, uniendo físicamente) el anticuerpo o la sonda a una sustancia detectable (por ejemplo, marcado de anticuerpos). Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos  
10 incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, 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 radioactivo adecuado incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S o <sup>3</sup>H.

15 Los ensayos de diagnóstico se pueden usar con matrices biológicas como células vivas, extractos celulares, lisados celulares, células fijas, cultivos celulares, fluidos corporales o muestras forenses. Los anticuerpos conjugados útiles para fines de diagnóstico o de kit incluyen anticuerpos acoplados a colorantes, isótopos, enzimas y metales, véase, por ejemplo, Le Doussal et al., *New Engl. J. Med.* 146:169-175 (1991); Gibellini et al., *J. Immunol.* 160:3891-3898 (1998); Hsing and Bishop, *New Engl. J. Med.* 162:2804-2811 (1999); y Everts et al., *New Engl. J. Med.* 168:883-889 (2002). Existen diversos formatos de ensayo, como los radioinmunoensayos (RIA), el ensayo inmunoabsorbente  
20 ligado a enzima (ELISA) y laboratorio en un chip (Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,176,962 y 6,517,234).

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

Una vez que se ha determinado un nivel de galectina-3 en un sujeto o muestra, el nivel se puede comparar con un nivel de referencia. En algunos aspectos, por ejemplo, donde el nivel de galectina-3 se determina usando un ELISA, el nivel de referencia representará un nivel umbral, por encima del cual se identifica que el sujeto tiene un mayor  
30 riesgo de un ACO, se selecciona para continuar el tratamiento con hospitalización, se selecciona para participar en un estudio clínico, o se selecciona para tratamiento terapéutico (como se describe en la presente memoria). El nivel de referencia elegido puede depender de la metodología (por ejemplo, el anticuerpo particular o el kit de ELISA) utilizado para medir los niveles de galectina-3.

Los niveles umbral no limitantes de galectina-3 pueden representar el nivel de la mediana de galectina-3 en poblaciones particulares de pacientes, por ejemplo, sujetos con un BMI inferior a 25, sujetos con función renal normal, sujetos sin enfermedad cardiovascular de alto riesgo, sujetos con un BMI entre 25 y 30, sujetos con un BMI superior a 30, sujetos con un BMI elevado, sujetos con insuficiencia renal, hombres sanos, mujeres sanas y niños sanos.

Como se señaló anteriormente, un nivel umbral de galectina-3 puede variar según la metodología utilizada para medir los niveles de galectina-3. Por ejemplo, un nivel umbral de galectina-3 medido usando el kit ELISA de Bender Medsystems, Viena, Austria puede estar entre 1,0 a 3,0 ng/ml, 2,0 a 4,0 ng/ml, 3,0 a 5,0 ng/ml, 4,0 a 6,0 ng/ml, 5,0 a 7,0 ng/ml, 6,0 a 8,0 ng/ml, 7,0 a 9,0 ng/ml, 1,0 a 5,0 ng/ml, 5,0 a 9,0 ng/ml, 7,0 a 11,0 ng/ml, o 9,0 a 13,0 ng/ml. Los ejemplos adicionales no limitantes de los niveles umbral de galectina-3 incluyen: 1,0 ng/ml, 1,1 ng/ml, 1,2 ng/ml, 1,3 ng/ml, 1,4 ng/ml, 1,5 ng/ml, 1,6 ng/ml, 1,7 ng/ml, 1,8 ng/ml, 1,9 ng/ml, 2,0 ng/ml, 2,1 ng/ml, 2,2 ng/ml, 2,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 2,5 ng/ml, 2,6 ng/ml, 2,7 ng/ml, 2,8 ng/ml, 2,9 ng/ml, 3,0 ng/ml, 3,1 ng/ml, 3,2 ng/ml, 3,3 ng/ml, 3,4 ng/ml, 3,5 ng/ml, 3,6 ng/ml, 3,7 ng/ml, 3,8 ng/ml, 3,9 ng/ml, 4,0 ng/ml, 4,1 ng/ml, 4,2 ng/ml, 4,3 ng/ml, 4,4 ng/ml, 4,5 ng/ml, 4,6 ng/ml, 4,7 ng/ml, 5,0 ng/ml, 5,2 ng/ml, 5,4 ng/ml, 5,6 ng/ml, 5,8 ng/ml, 6,0 ng/ml, 6,2 ng/ml, 6,4 ng/ml, 6,6 ng/ml, 6,8 ng/ml, 7,0 ng/ml, 7,2 ng/ml, 7,4 ng/ml, 7,6 ng/ml, 7,8 ng/ml, 8,0 ng/ml, 8,2 ng/ml, 8,4 ng/ml, 8,6 ng/ml, 8,8 ng/ml, y 9,0 ng/ml.

50 Un nivel umbral de galectina-3 medido usando el kit ELISA de BG Medicine, Inc. incluye: mayor que 25,9 ng/ml, 17,8 ng/ml a 25,9 ng/ml, menor que 17,8 ng/ml, 9 ng/ml, 10,0 ng/ml, 11,0 ng/ml, 12,0 ng/ml, 13,0 ng/ml, 14,0 ng/ml, 15,0 ng/ml, 16,0 ng/ml, 17,0 ng/ml, 18,0 ng/ml, 19,0 ng/ml, 20 ng/ml, 21 ng/ml, 22 ng/ml, 23 ng/ml, 24 ng/ml, 25 ng/ml, y 26 ng/ml.

Se conocen valores umbral adicionales (por ejemplo, Sharma et al., *Circulation* 110:3121-3128, (2004) y de Boer et al., *Eur. J. Heart Failure* 11:811-817 (2009)) y se pueden determinar fácilmente por una persona experimentada en la técnica. Un valor umbral de galectina-3 puede reflejar el nivel de galectina-3 justo debajo del nivel de galectina-3 observado en un sujeto que presenta uno o más fenotipos de enfermedad (por ejemplo, que presenta uno o más síntomas de un estado de enfermedad, como enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad

de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular e hipertensión).

5 Ejemplos adicionales de un nivel de referencia de galectina-3 es un nivel de galectina-3 antes o después del inicio de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión; un nivel de galectina-3 antes o después del diagnóstico de enfermedad (enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); un nivel de galectina-3 antes o después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular e hipertensión); o un nivel de galectina-3 en un punto de tiempo diferente durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, o hipertensión), o antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

En algunos aspectos, el nivel de galectina-3 se determina una vez, por ejemplo, en la presentación. En algunos aspectos, el nivel de galectina-3 se determina a una o más de 2, 4, 6, 8, 12, 18 y/o 24 horas, y/o 1-7 días después del inicio de los síntomas.

20 En algunos aspectos, el nivel de galectina-3 se determina más de una vez; en algunos aspectos, se puede usar la medición más alta. En aspectos donde el nivel de galectina-3 se determina más de una vez, se puede usar el nivel más alto o se puede determinar y usar el cambio en los niveles (por ejemplo, una proporción de dos niveles de galectina-3).

25 En algunos aspectos, la proporción de dos niveles de galectina-3 en un sujeto se compara con un nivel de referencia que es una proporción de niveles de galectina-3 medidos en un sujeto (por ejemplo, cualquiera de los sujetos de control descritos en la presente memoria o el mismo sujeto), por ejemplo, un nivel de referencia puede ser una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después de la aparición de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de galectina-3 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); o una proporción de los niveles de galectina-3 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

40 Los niveles de galectina-3 también se pueden determinar varias veces para evaluar la respuesta de un sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, un nivel de galectina-3 tomado después de la administración de un tratamiento, por ejemplo, una o más dosis o rondas de un tratamiento, se puede comparar con los niveles de galectina-3 antes de iniciar el tratamiento, por ejemplo, un nivel basal, o en un punto de tiempo temprano en el tratamiento en curso. El cambio en los niveles de galectina-3 indicaría si el tratamiento fue efectivo; por ejemplo, una reducción en los niveles de galectina-3 indicaría que el tratamiento fue efectivo.

## ST2

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

Además, se encontró que ST2 es uno de los tres biomarcadores que predicen significativamente la mortalidad a los 4 años en una cohorte de 517 pacientes con insuficiencia cardíaca (estudio PRIDE), y esto se validó en una cohorte independiente de pacientes con disnea aguda (Januzzi et al., Clinical Chemistry. 56(12):1814-1821 (2010)). Los

datos del estudio PRIDE también se utilizaron para proponer un modelo para predecir la mortalidad a 1 año utilizando una combinación de marcadores que incluyen ST2 (Rehman et al. *Clinica Chimica Acta*. 392(1-2):41-45 (2008)). También se describió que ST2 y galectina-3 "pueden tener un papel no solo para el pronóstico de pacientes con insuficiencia cardíaca, sino también en el manejo óptimo de estos pacientes" (Uthamalingam et al. *US Cardiology*. 6(1):41-45 (2009)). El documento WO 2007/127749 describe procedimientos para predecir la mortalidad y detectar la presencia de una enfermedad grave midiendo los niveles circulantes de ST2 solo o en combinación con biomarcadores, aunque no menciona la galectina-3.

Se cree que la forma transmembrana de ST2 juega un papel en la modulación de las respuestas de las células T colaboradoras tipo 2 (Lohning et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(12):6930-6935 (1998); Schmitz et al., *Immunity* 23(5):479-90 (2005)), y puede desempeñar un papel en el desarrollo de la tolerancia en estados de inflamación severa o crónica (Brint et al., *Nat. Immunol.* 5(4):373-9. (2004)), mientras que la forma soluble de ST2 está sobrerregulada por aumento en fibroblastos estimulados por el crecimiento (Yanagisawa et al., 1992, supra). Los datos experimentales sugieren que el gen ST2 está marcadamente sobrerregulado en estados de estiramiento de miocitos (Weinberg et al., 2002, supra) de manera análoga a la inducción del gen BNP (Bruneau et al., *Cardiovasc. Res.* 28(10):1519-25 (1994)).

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

La secuencia de ARNm de la isoforma soluble más corta de ST2 humano se puede encontrar en la cuenta de GenBank No. NM\_003856.2, y la secuencia de polipéptidos está en la cuenta de GenBank No. NP\_003847.2; la secuencia de ARNm para la forma más larga de ST2 humano está en la cuenta de GenBank No. NM\_016232.4; la secuencia de polipéptidos está en la cuenta de GenBank No. NP\_057316.3. Información adicional está disponible en las bases de datos públicas en GeneID: 9173, MIM ID # 601203 y UniGene No. Hs.66. En general, en los procedimientos descritos en la presente memoria, se mide la forma soluble del polipéptido ST2. Los ejemplos no limitantes de proteína ST2 soluble incluyen proteínas que contienen una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) a la secuencia de NCBI con números de acceso NP\_003847.2. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos de ST2 solubles incluyen ácidos nucleicos que contienen una secuencia al menos 90 % idéntica (por ejemplo, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) a la secuencia de NCBI con números de acceso NM\_003856.2.

Los procedimientos para detectar y medir ST2 son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos números de publicación 2003/0124624, 2004/0048286 y 2005/0130136. Los kits para medir el polipéptido ST2 también están disponibles comercialmente, por ejemplo, el kit ST2 ELISA fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), no. 7638. Además, los dispositivos para medir ST2 y otros biomarcadores se describen en la patente de Estados Unidos número de publicación 2005/0250156.

Los niveles de proteína ST2 también se pueden medir usando los anticuerpos producidos a partir del hibridoma depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana y designados por la Designación de Depósito de Patentes PTA-10432, o cualquiera de los anticuerpos descritos en el documento WO 2011/127412 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2011/0256635.

Las concentraciones elevadas de ST2 son marcadamente pronósticos de muerte, con una divergencia dramática en las curvas de supervivencia para aquellos con ST2 elevado poco después de la presentación, independientemente del diagnóstico subyacente. Como un ejemplo, existe una relación dramática entre las elevaciones de ST2 y el riesgo de mortalidad dentro de los cuatro años posteriores a la presentación con disnea. La relación entre ST2 y la muerte en pacientes con disnea fue independiente del diagnóstico y reemplazó a todos los demás biomarcadores predictores de mortalidad en este entorno, incluidos otros marcadores de inflamación, mionecrosis, disfunción renal y, en particular, NT-proBNP, un marcador recientemente descrito como que tiene valor para predecir la muerte en esta población (Januzzi et al., *Arch. Intern. Med.* 166(3):315-320 (2006)). De hecho, la mayor parte de la mortalidad en el estudio se concentró entre sujetos con niveles elevados de ST2 en la presentación; sin embargo, la combinación de ST2 elevado y NT-proBNP se asoció con las tasas más altas de muerte dentro de un año.

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

En algunos aspectos, el nivel de ST2 se determina más de una vez; en algunos aspectos, se puede usar la medición más alta. En aspectos donde el nivel de ST2 se determina más de una vez, se puede usar el nivel más alto o se puede determinar y usar el cambio en los niveles (por ejemplo, una proporción de dos niveles de ST2).

Los niveles de ST2 también se pueden determinar varias veces para evaluar la respuesta de un sujeto a un tratamiento. Por ejemplo, un nivel de ST2 tomado después de la administración de un tratamiento, por ejemplo, una o más dosis o rondas de un tratamiento, se puede comparar con los niveles de ST2 antes de que se inicie el tratamiento, por ejemplo, un nivel basal o en un punto en el tiempo temprano en un tratamiento en curso. El cambio en los niveles de ST2 indicaría si el tratamiento fue efectivo; por ejemplo, una reducción en los niveles de ST2 indicaría que el tratamiento fue efectivo.

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

Una vez que se ha determinado un nivel de ST2 en un sujeto, el nivel puede compararse con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, por ejemplo, donde el nivel de ST2 se determina usando un ELISA, el nivel de referencia representará un nivel umbral, por encima del cual se identifica que el sujeto tiene un mayor riesgo de un ACO, seleccionado para continuar el tratamiento como paciente hospitalizado, seleccionado para participar en un estudio clínico, o seleccionado para tratamiento terapéutico (como se describe en la presente memoria). El nivel de referencia elegido puede depender de la metodología (por ejemplo, el anticuerpo particular o el kit ELISA) utilizado para medir los niveles de ST2. Los niveles de referencia son conocidos en la técnica y una persona experimentada en la técnica puede determinarlos fácilmente.

Los niveles umbral no limitantes de ST2 pueden representar el nivel de la mediana de ST2 en poblaciones particulares de pacientes, por ejemplo, sujetos con un BMI inferior a 25, sujetos con función renal normal, sujetos sin enfermedad cardiovascular, sujetos con un BMI entre 25 y 30, sujetos con un BMI superior a 30, sujetos con un BMI elevado, sujetos con insuficiencia renal, hombres sanos, mujeres y niños sanos. Por ejemplo, un valor umbral para ST2 puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 1,0 a 10 ng/ml, 5,0 ng/ml a 10 ng/ml, aproximadamente 10,0 ng/ml a 20,0 ng/ml, aproximadamente 10,0 ng/ml a 15,0 ng/ml, aproximadamente 15,0 ng/ml a 20,0 ng/ml, aproximadamente 20,0 ng/ml a 40 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml a 30 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml a 25 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml a 30 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml a 35 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml a 40 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, y aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml.

En algunos aspectos, el valor umbral para ST2 en hombres y mujeres puede ser cualquier valor listado en la Tabla 1. Por ejemplo, el valor umbral de ST2 en hombres puede ser 17,0 ng/ml, 18,0 ng/ml, 19,0 ng/ml, 20,0 ng/ml, 21,0 ng/ml, 22,0 ng/ml, 23,0 ng/ml, 24,0 ng/ml, 25,0 ng/ml, 26,0 ng/ml, 27,0 ng/ml, 28,0 ng/ml, 29,0 ng/ml, 30,0 ng/ml, 31,0 ng/ml, 32,0 ng/ml, 33,0 ng/ml, 34,0 ng/ml, 35,0 ng/ml, 36,0 ng/ml, 37,0 ng/ml, 38,0 ng/ml, 39,0 ng/ml, 40,0 ng/ml, 41,0 ng/ml, 42,0 ng/ml, 43,0 ng/ml, 44,0 ng/ml, 45,0 ng/ml, 46,0 ng/ml, 47,0 ng/ml, 48,0 ng/ml, 49,0 ng/ml, y 50,0 ng/ml. Los valores umbral ejemplares de ST2 en mujeres pueden ser 12,0 ng/ml, 13,0 ng/ml, 14,0 ng/ml, 15,0 ng/ml, 16,0 ng/ml, 17,0 ng/ml, 18,0 ng/ml, 19,0 ng/ml, 20,0 ng/ml, 21,0 ng/ml, 22,0 ng/ml, 23,0 ng/ml, 24,0 ng/ml, 25,0 ng/ml, 26,0 ng/ml, 27,0 ng/ml, 28,0 ng/ml, 29,0 ng/ml, 30,0 ng/ml, 31,0 ng/ml, 32,0 ng/ml, 33,0 ng/ml, 34,0 ng/ml, 35,0 ng/ml, 36,0 ng/ml, 37,0 ng/ml, 38,0 ng/ml, 39,0 ng/ml, y 40,0 ng/ml.

**Tabla 1. Concentraciones séricas de ST2 en hombres y mujeres**

Percentiles	ST2 (ng/ml)		
	Combinado	Masculino	Femenino
2,5	8,0	8,6	7,3
25	14,5	17,6	12,4
50	18,8	23,6	16,2
75	25,3	30,6	19,9
90	34,3	37,2	23,7
95	37,9	45,4	29,0
97,5	45,6	48,5	33,1
99	50,2	52,7	39,9

Como se señaló anteriormente, un nivel umbral de ST2 puede variar según la metodología utilizada para medir los niveles de ST2. Por ejemplo, si un anticuerpo producido a partir del hibridoma depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana, designado con la Deposition de Depósito de Patentes PTA-10432 se usa para determinar un nivel de ST2, los valores umbral no limitantes de ST2 pueden incluir: debajo de 20 ng/ml, 5 ng/ml a 15 ng/ml, 5,0 ng/ml a 10 ng/ml, 10 ng/ml a 20 ng/ml, 10 ng/ml a 15 ng/ml, 14,5 ng/ml a 25,3 ng/ml, 15 ng/ml a 25 ng/ml, 15 ng/ml a

20 ng/ml, 18,0 ng/ml a 20,0 ng/ml, 18,1 ng/ml a 19,9 ng/ml, 20 ng/ml a 30 ng/ml, 20 ng/ml a 25 ng/ml, 25 ng/ml a 35 ng/ml, 25 ng/ml a 30 ng/ml, 30 ng/ml a 40 ng/ml, 30 ng/ml a 35 ng/ml, 35 ng/ml a 45 ng/ml, 35 ng/ml a 40 ng/ml, y 40 ng/ml a 45 ng/ml. Los valores de referencia de ST2 adicionales que pueden usarse cuando se usa el anticuerpo producido a partir del hibridoma designado PTA-10432 se usan para determinar un nivel de ST2 que incluyen: para mujeres, 12,4 ng/ml a 19,9 ng/ml, 12,0 ng/ml a 20 ng/ml, 15,3 ng/ml a 17,4 ng/ml, 15,0 a 17,0 ng/ml, debajo de 20 ng/ml, y debajo de 18 ng/ml; y para hombres, menor que 31,0 ng/ml, menor que 26,0 ng/ml, 17,6 ng/ml a 30,6 ng/ml, 17,0 ng/ml a 30,0 ng/ml, 21,3 ng/ml a 25,1 ng/ml, y 21,0 ng/ml a 25,0 ng/ml. Los valores umbral adicionales no limitantes que pueden usarse cuando se mide un nivel de ST2 usando el anticuerpo producido a partir del hibridoma designado PTA-10432 incluyen: 10 ng/ml, 11 ng/ml, 12 ng/ml, 13 ng/ml, 14 ng/ml, 15 ng/ml, 16 ng/ml, 17 ng/ml, 18 ng/ml, 19 ng/ml, 20 ng/ml, 21 ng/ml, 22 ng/ml, 23 ng/ml, 24 ng/ml, 25 ng/ml, 26 ng/ml, 27 ng/ml, 28 ng/ml, 29 ng/ml, 30 ng/ml o 31 ng/ml.

En ejemplos adicionales no limitantes, cuando se mide un nivel de ST2 con el kit de ELISA de ST2 (MBL International Corp., Woburn, MA), los niveles de umbral de ST2 incluyen: 0,1 ng/ml a 0,6 ng/ml, 0,2 ng/ml a 0,6 ng/ml, 0,2 ng/ml a 0,5 ng/ml, 0,3 ng/ml a 0,5 ng/ml, 0,2 ng/ml a 0,3 ng/ml, 0,3 ng/ml a 0,4 ng/ml, y 0,4 ng/ml a 0,5 ng/ml. Los valores umbral adicionales no limitantes cuando se usa el kit ST2 ELISA (MBL International Corp.) para medir un nivel ST2 incluyen: 0,17 ng/ml, 0,18 ng/ml, 0,19 ng/ml, 0,20 ng/ml, 0,21 ng/ml, 0,22 ng/ml, 0,23 ng/ml, 0,24 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,26 ng/ml, 0,27 ng/ml, 0,28 ng/ml, o 0,29 ng/ml de sangre, suero o plasma.

En algunos aspectos, la proporción de dos niveles de ST2 en un sujeto se compara con un nivel de referencia que es una proporción de niveles de ST2 medidos en un sujeto (por ejemplo, cualquiera de los sujetos de control descritos en la presente memoria o el mismo sujeto), por ejemplo, un nivel de referencia puede ser una proporción de los niveles de ST2 antes y después del inicio de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión) o una proporción de los niveles de ST2 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio).

### Procedimientos de evaluación del riesgo de ACO

Se proporcionan procedimientos para evaluar el riesgo de un ACO en un sujeto. En un entorno clínico, los pacientes pueden presentar una combinación de síntomas ambiguos, de modo que un médico o profesional de la salud tiene dificultades para diagnosticar al sujeto. En tales situaciones, es difícil para el médico determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de experimentar posteriormente un resultado clínico adverso. Se proporcionan procedimientos para evaluar el riesgo de un resultado clínico adverso en un sujeto que requiere las etapas de determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y determinar un nivel de galectina-2 en una muestra biológica del sujeto.

Un resultado clínico adverso (ACO) puede ser un aumento (por ejemplo, en uno, dos, tres o cuatro) en el número, la gravedad o la frecuencia de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) síntomas en un sujeto, muerte o tratamiento que es necesario por el aumento (por ejemplo, en uno, dos, tres o cuatro) en el número, gravedad o frecuencia de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) síntomas en un sujeto. Un ACO puede ser la rehospitalización, la recurrencia de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, un aumento en la gravedad de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, o cuatro) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, un aumento en la frecuencia de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) síntomas físicos asociados con un estado de enfermedad, mortalidad, admisión a un centro de atención médica, trasplante de órgano (por ejemplo, trasplante de corazón) o cirugía (por ejemplo, cirugía de corazón). Por ejemplo, el ACO puede ser un aumento en el número, gravedad, duración o frecuencia de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) síntomas asociados con angina, enfermedad cardiovascular o insuficiencia cardíaca. Para los pacientes que presentan enfermedad cardiovascular, el ACO puede ser, por ejemplo, rehospitalización o ingreso por enfermedad cardiovascular o mortalidad.

Los procedimientos anteriores se pueden realizar en un sujeto que presenta uno o más síntomas (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital, como en la sala de emergencias). El procedimiento puede ser realizado por un médico, un técnico de laboratorio, un asistente médico o una enfermera. Se puede medir un nivel de ST2 y galectina-3 en una muestra biológica de un paciente dentro de los 14 días de la presentación del paciente a un centro de atención médica (por ejemplo, dentro de 12 días, 10 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 36 horas, 24 horas, 20 horas, 16 horas, 12 horas, 10 horas, 8

horas, 6 horas, 4 horas o 2 horas). Los niveles de ST2 y galectina-3 también se pueden medir en una muestra biológica de un sujeto que ya está hospitalizado o bajo supervisión médica (por ejemplo, chequeos periódicos o en un centro de atención asistida). Los niveles de ST2 y galectina-3 también pueden medirse en una muestra biológica que se haya recolectado previamente de un sujeto.

- 5 Se pueden usar dos niveles diferentes de ST2 y/o galectina-3 para calcular una proporción que luego se puede comparar con un nivel de referencia (por ejemplo, cualquiera de las proporciones de referencia descritas anteriormente). Por ejemplo, una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del inicio de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); o una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio) puede ser determinado y comparado con un valor de referencia.

El sujeto puede haber sido diagnosticado previamente con una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia. Es posible que el sujeto tampoco haya sido diagnosticado previamente con una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia). En algunos aspectos de los procedimientos descritos en la presente memoria, el sujeto puede presentar uno o más síntomas ambiguos (por ejemplo, dificultad para respirar, mareos, molestias y náuseas). El sujeto puede tener un BMI entre 25 y 29, un BMI mayor o igual a 30, un BMI elevado o tener insuficiencia renal.

El nivel de ST2 y galectina-3 se puede medir en cualquier muestra biológica obtenida del sujeto. Las muestras biológicas no limitantes que pueden usarse en los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen sangre, suero y plasma. La muestra biológica utilizada para medir ST2 y la muestra biológica utilizada para medir galectina-3 pueden recolectarse del sujeto al mismo tiempo. La muestra biológica puede congelarse o transportarse antes de determinar el nivel de ST2 o galectina-3 presente en la muestra. Preferiblemente, la muestra biológica utilizada para determinar el nivel de ST2 o galectina-3 es suero.

Tras la determinación de un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y la determinación de un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto, el riesgo de resultado clínico adverso se indica al comparar los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto a niveles de referencia de ST2 y galectina-3. Por ejemplo, la presencia de un nivel elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3) indica un mayor riesgo (por ejemplo, un mayor riesgo de al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 %) de un ACO. En algunos aspectos, la presencia de un nivel elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) y un nivel elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3) indica un riesgo mucho mayor (por ejemplo, un riesgo aumentado de al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 260 %, 280 % o 300 %) de un ACO. En algunos aspectos, un nivel no elevado de ST2 y un nivel no elevado de galectina-3 indica una disminución (por ejemplo, una disminución del riesgo de al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 %) de riesgo de un ACO.

En ejemplos adicionales, la presencia de una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) o la presencia de una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) indica un riesgo aumentado (por ejemplo, un riesgo aumentado de al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 %) de un ACO. En algunos aspectos, la presencia de una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) indica un riesgo muy elevado (por ejemplo, un riesgo elevado de al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 260 %, 280 % o 300 %) de un ACO. En algunos aspectos, una

proporción no elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción no elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) indica un riesgo disminuido (por ejemplo, un riesgo disminuido de al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, o 80 %) de un ACO.

- 5 Cualquiera de los niveles de referencia descritos anteriormente para ST2 o galectina-3 puede usarse en estos procedimientos. Cualquiera de las técnicas descritas anteriormente para determinar el nivel de ST2 o galectina-3 puede usarse en estos procedimientos.

Los procedimientos anteriores pueden usarse para determinar el riesgo de un ACO dentro de 1 año y dentro de 30 días del momento en el cual se obtuvo la muestra biológica del sujeto.

10 **Procedimientos para decidir dar de alta o continuar el tratamiento como paciente hospitalizado**

También se proporcionan procedimientos para decidir si dar de alta o iniciar, finalizar o continuar el tratamiento de un sujeto hospitalizado, incluidas las etapas para determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica y determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto. Este procedimiento puede ser realizado por un profesional de la salud (por ejemplo, un médico, un asistente médico, una enfermera o un técnico de laboratorio).

- 15 Los sujetos a menudo se presentan a profesionales de la salud con síntomas ambiguos (por ejemplo, dificultad para respirar, mareos, náuseas o molestias) que son difíciles de diagnosticar. A menudo, una profesional de atención médica tiene que decidir si da de alta al sujeto o si continúa tratando al sujeto como paciente hospitalizado (por ejemplo, comenzar la hospitalización, continuar la hospitalización o ingresar en un centro de atención asistida). Este procedimiento puede realizarse cuando un sujeto se presenta a un profesional de la salud en un centro de atención médica. Este procedimiento también se puede realizar en un sujeto que ya ha sido admitido en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital o un centro de atención asistida).

20 El procedimiento puede realizarse en sujetos que tienen enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, inflamación o hipertensión, o en sujetos que se presentan con uno o más de los siguientes síntomas: dificultad para respirar, palpitaciones cardíacas, aumento de la frecuencia cardíaca, debilidad, mareos, náuseas, sudoración, molestias o presión en el pecho, dolor en el pecho, dolor en los brazos, llenura, indigestión, sudoración, sibilancia, apnea del sueño o ansiedad. El procedimiento también se puede realizar en pacientes con un BMI de 25-30, un BMI de más de 30 o un BMI elevado.

25 El nivel de ST2 y el nivel de galectina-3 se pueden medir en cualquiera de las muestras biológicas descritas anteriormente. Los niveles de ST2 y galectina-3 pueden medirse utilizando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y compararse con cualquiera de los niveles de referencia descritos anteriormente.

30 Tras la determinación de un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y la determinación de un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto, los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto en relación con los niveles de referencia de ST2 y galectina-3 se utilizan para determinar si el sujeto debe ser dado de alta, si debe recibir un tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o si el tratamiento debe iniciarse o finalizarse. Por ejemplo, la presencia de un nivel elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3) indica que el sujeto debe recibir un tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o ese tratamiento debe iniciarse. En algunos aspectos de los procedimientos descritos en la presente memoria, la presencia de un nivel elevado de ST2 y un nivel elevado de galectina-3 (en relación con los niveles de control) indica fuertemente que el sujeto debe recibir un tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o que se debe iniciar el tratamiento. En ejemplos adicionales, la presencia de un nivel no elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) y la presencia de un nivel no elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3) indica que el sujeto debe ser dado de alta, recibir tratamiento de forma ambulatoria o ese tratamiento debe finalizar.

35 Se pueden usar dos niveles diferentes de ST2 y/o galectina-3 para calcular una proporción que luego se puede comparar con un nivel de referencia (por ejemplo, una proporción de referencia como se describió anteriormente). Por ejemplo, una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del inicio de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad ((por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo,

tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), insuficiencia renal, accidente cerebrovascular o hipertensión); o una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio) puede determinarse y compararse con un valor de referencia.

En ejemplos adicionales, la presencia de una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) o la presencia de una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) indica que el sujeto debe recibir tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o ese tratamiento debe iniciarse. En algunos aspectos de los procedimientos descritos en la presente memoria, la presencia de una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) indica fuertemente que el sujeto debe recibir tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o que el tratamiento debe iniciarse. En algunos aspectos, una proporción no elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción no elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) indica que el sujeto debe ser dado de alta o que el tratamiento debe ser finalizado.

El tratamiento continuo como paciente hospitalizado puede significar una nueva admisión en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital o centro de atención asistida), continuar la admisión en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital o centro de atención asistida) o visitas frecuentes (por ejemplo, diarias, semanales, quincenales o mensuales) consistentes a un centro de atención médica (por ejemplo, una clínica u hospital). El sujeto puede recibir uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) agentes farmacéuticos durante el tratamiento continuo o se pueden realizar pruebas periódicamente para detectar cambios en los niveles de ST2 y/o galectina-3 en una muestra biológica del sujeto. Una disminución en el nivel de ST2 y/o galectina-3 de un sujeto en relación con una muestra de referencia (determinada por pruebas posteriores) puede indicar más tarde que el sujeto puede ser dado de alta.

#### **Procedimientos para seleccionar un sujeto para participar en un estudio clínico**

También se proporcionan procedimientos para seleccionar un sujeto para participar en un estudio clínico que incluye las etapas para determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica en un sujeto y determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica en un sujeto.

Ejemplos no limitantes de estudios clínicos incluyen estudios de enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia. Los estudios clínicos también pueden usarse para estudiar el efecto del tratamiento de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos (por ejemplo, nitratos, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, agentes moduladores del sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (por ejemplo, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de aldosterona, inhibidores de renina y bloqueadores de los receptores de angiotensina II) y agentes reductores del colesterol (por ejemplo, una estatina)) en un sujeto.

Los estudios clínicos pueden ser realizados por profesionales de la salud (por ejemplo, médicos, asistentes médicos, enfermeras, flebotomistas o técnicos de laboratorio) en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital, una clínica o un centro de investigación). Las muestras biológicas pueden obtenerse de sujetos que se presentan con uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de un estado de enfermedad (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, angina o insuficiencia cardíaca), sujetos que son admitidos en un hospital, o sujetos que son asintomáticos.

El nivel de ST2 y el nivel de galectina-3 se pueden medir en cualquiera de las muestras biológicas descritas anteriormente. Los niveles de ST2 y galectina-3 pueden medirse utilizando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y compararse con cualquiera de los niveles de referencia descritos anteriormente.

Tras la determinación de un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y la determinación de un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto, se selecciona un sujeto para participar en un estudio clínico en base a la comparación de los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto a niveles de ST2 y galectina-3 de referencia. Por ejemplo, el sujeto se selecciona para participar en un estudio clínico si el sujeto tiene un nivel elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) o un nivel elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3). En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en la presente memoria, el sujeto se selecciona fuertemente para participar en un estudio clínico si el sujeto tiene un nivel elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) y un nivel elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3). En algunos aspectos, el sujeto está excluido de participar en un estudio clínico si el sujeto tiene un nivel no elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) y un nivel no elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3).

En otros aspectos, un sujeto con un nivel de galectina-3 que es más bajo que un nivel de referencia de galectina-3 (por ejemplo, un sujeto que tiene un nivel elevado de ST2 en comparación con un nivel de referencia y un nivel disminuido de galectina-3 en relación con un nivel de referencia) se puede seleccionar para participar en un estudio clínico (por ejemplo, un estudio del efecto de una o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) estatinas en un sujeto (por ejemplo, un sujeto con una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y/o dislipidemia).

Como se describió anteriormente, se pueden usar dos niveles diferentes de ST2 y/o galectina-3 para calcular una proporción que luego se puede comparar con un nivel de referencia (por ejemplo, una proporción de referencia como se describió anteriormente). Por ejemplo, una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después de la aparición de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia), insuficiencia renal e hipertensión; una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); o puede determinarse una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio) y compararse con un valor de referencia.

En algunos ejemplos de los procedimientos descritos en la presente memoria, se selecciona un sujeto para participar en un estudio clínico si el sujeto tiene una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) o una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3). En algunos ejemplos de los procedimientos descritos en la presente memoria, un sujeto es fuertemente seleccionado para participar en un estudio clínico si el sujeto tiene una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de los niveles de galectina-3). En algunos aspectos, un sujeto está excluido de participar en un estudio clínico si el sujeto tiene una proporción no elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción no elevada de niveles de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de los niveles de galectina-3).

Factores adicionales pueden indicar además que el sujeto debe incluirse en un estudio clínico. Estos factores adicionales incluyen el diagnóstico previo de enfermedad cardiovascular, angina, ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, inflamación o accidente cerebrovascular, o la presentación de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de los siguientes síntomas: dificultad para respirar, palpitaciones del corazón, aumento de la frecuencia cardíaca, debilidad, mareos, náuseas, sudoración, molestias o presión en el pecho, dolor en el pecho, dolor en el brazo, llenura, indigestión, sudoración, sibilancia, apnea y ansiedad. Los factores adicionales incluyen un BMI de 25-30, un BMI de más de 30, un BMI elevado o una terapia continuada con uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) agentes farmacéuticos (por ejemplo, nitratos, bloqueadores de canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, 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 bloqueadores de los receptores de angiotensina II), y agentes reductores del colesterol (por ejemplo, una estatina)).

#### **Procedimientos para seleccionar un tratamiento terapéutico para un sujeto**

También se proporcionan procedimientos para seleccionar un tratamiento para un sujeto que requiere las etapas de determinar un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y determinar un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto.

Este procedimiento puede realizarse en sujetos que se presentan clínicamente (por ejemplo, diagnosticados) con uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia). El procedimiento también se puede realizar en sujetos que presentan uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de los siguientes síntomas: dificultad para respirar, palpitaciones del corazón, aumento de la frecuencia cardíaca, debilidad, mareos, náuseas, sudoración, molestias en

el pecho o presión, dolor en el pecho, dolor en el brazo, llenura, indigestión, sudoración, sibilancia, apnea y ansiedad. El sujeto puede haber sido diagnosticado previamente con una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) de las siguientes condiciones: una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo, y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia, o el sujeto puede no haber sido diagnosticado previamente con una enfermedad. El sujeto puede haber sido admitido previamente en un centro de atención médica y dado de alta previamente, o puede ser un paciente ingresado en un centro de atención médica (por ejemplo, hospital o centro de atención asistida). Los procedimientos pueden ser realizados por un profesional de la salud (por ejemplo, un médico, un asistente médico, una enfermera o un técnico de laboratorio) en un centro de atención médica (por ejemplo, un hospital, clínica o centro de atención asistida).

El nivel de ST2 y el nivel de galectina-3 se pueden medir en cualquiera de las muestras biológicas descritas anteriormente. Los niveles de ST2 y galectina-3 pueden medirse utilizando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y compararse con cualquiera de los niveles de referencia descritos anteriormente.

Tras la determinación de un nivel de ST2 en una muestra biológica del sujeto y la determinación de un nivel de galectina-3 en una muestra biológica del sujeto, los niveles de ST2 y galectina-3 del sujeto en relación con los niveles de ST2 y galectina-3 de referencia se utiliza para seleccionar un tratamiento para el sujeto. Por ejemplo, la presencia de un nivel elevado de ST2 (en relación con un nivel de referencia de ST2) o la presencia de un nivel elevado de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de galectina-3) se utiliza para seleccionar un tratamiento para el sujeto. En algunos aspectos de los procedimientos descritos en la presente memoria, la presencia de un nivel elevado de ST2 y un nivel elevado de galectina-3 (en relación con los niveles de control) se usa predominantemente (fuertemente) para seleccionar el tratamiento terapéutico para el sujeto. En algunos aspectos de los procedimientos descritos en la presente memoria, la presencia de un nivel no elevado de ST2 y un nivel no elevado de galectina-3 (en relación con los niveles de control) se usa para seleccionar un tratamiento terapéutico para el sujeto.

Como se describió anteriormente, se pueden usar dos niveles diferentes de ST2 y/o galectina-3 para calcular una proporción que luego se puede comparar con un nivel de referencia (por ejemplo, una proporción de referencia como se describió anteriormente). Por ejemplo, una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después de la aparición de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del diagnóstico de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después del tratamiento terapéutico para una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 en dos puntos de tiempo diferentes durante el tratamiento terapéutico (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado o ambulatorio) para una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, síndrome coronario agudo y angina), inflamación, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, obesidad, colesterol alto y dislipidemia); o puede determinarse una proporción de los niveles de ST2 y/o galectina-3 antes y después de un evento cardíaco (por ejemplo, un infarto de miocardio) y compararse con un valor de referencia.

En algunos ejemplos de los procedimientos descritos en la presente memoria, la presencia de una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) o la presencia de una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) se utiliza para seleccionar un tratamiento para un sujeto. En algunos ejemplos de los procedimientos descritos en la presente memoria, la presencia de una proporción elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y una proporción elevada de niveles de galectina-3 (en relación con una proporción de referencia de niveles de galectina-3) se usa fuertemente para seleccionar un tratamiento para un sujeto. En algunos aspectos, la presencia de una proporción no elevada de niveles de ST2 (en relación con una proporción de referencia de niveles de ST2) y la presencia de una proporción no elevada de niveles de galectina-3 (en relación con un nivel de referencia de niveles de galectina-3) se utiliza para seleccionar un tratamiento para un sujeto.

Se pueden usar factores adicionales para seleccionar un tratamiento terapéutico para el sujeto. Estos factores adicionales incluyen el diagnóstico previo con una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) de las siguientes condiciones: enfermedad cardiovascular, angina, ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, inflamación y accidente cerebrovascular, y/o presentación de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de los siguientes síntomas: dificultad para respirar, palpitaciones del corazón, aumento de la frecuencia cardíaca, debilidad, mareos, náuseas, sudoración, molestias o presión en el pecho, dolor en el pecho, dolor en el brazo, llenura, indigestión, sudoración, sibilancia, apnea o ansiedad. Los factores adicionales incluyen un BMI de 25-30, un BMI de

más de 30, un BMI elevado o una terapia continua con uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) agentes farmacéuticos (por ejemplo, nitratos, bloqueadores de canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, 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 bloqueadores de los receptores de angiotensina II), y agentes reductores del colesterol (por ejemplo, una estatina)). Los ejemplos de estos agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica.

El tratamiento terapéutico puede ser la administración al sujeto de uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos y/o la realización de un procedimiento médico en el cuerpo del sujeto (por ejemplo, cirugía, como un trasplante de órganos o cirugía del corazón). Ejemplos no limitantes de agentes farmacéuticos que pueden administrarse a un sujeto incluyen nitratos, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, 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 bloqueadores de los receptores de angiotensina II) y agentes reductores del colesterol (por ejemplo, una estatina). En otro ejemplo, el tratamiento terapéutico puede ser un ajuste (por ejemplo, un aumento o disminución) en la dosis, duración o frecuencia de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos que un sujeto puede estar tomando, la administración de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) nuevos agentes farmacéuticos al sujeto, o la eliminación de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) agentes farmacéuticos del plan de tratamiento del sujeto.

Estos procedimientos se pueden repetir con el tiempo (por ejemplo, semanal, quincenal, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada seis meses, una vez al año) para seleccionar un tratamiento terapéutico diferente para el sujeto.

#### **Marcadores adicionales**

Algunos aspectos de todos los procedimientos anteriores, pueden incluir además determinar el nivel de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro o cinco) marcadores adicionales en una muestra biológica del sujeto. Los marcadores adicionales se pueden seleccionar del grupo de: 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. El uno o más marcadores adicionales se pueden medir en cualquiera de las muestras biológicas descritas anteriormente. La presencia de un nivel aumentado (por ejemplo, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 % o 300 %) de uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) de 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 en un sujeto en comparación con un nivel de referencia para cada uno de estos marcadores pueden indicar además que el sujeto tiene un riesgo aumentado de ACO, el sujeto debe recibir un tratamiento continuo (por ejemplo, tratamiento como paciente hospitalizado) o que ese tratamiento debe iniciarse o finalizarse, el sujeto debe seleccionarse para participar en un estudio clínico, o el sujeto debe seleccionarse para el tratamiento. Los niveles de referencia de estos marcadores adicionales pueden ser un valor umbral o pueden ser el nivel de estos marcadores en una población de pacientes, por ejemplo, sujetos con un BMI inferior a 25, sujetos con función renal normal, sujetos sin enfermedad cardiovascular, sujetos con un BMI entre 25 y 30, sujetos con un BMI superior a 30, sujetos con un BMI elevado, sujetos con insuficiencia renal, hombres sanos, mujeres y niños sanos. Preferiblemente, los procedimientos anteriores incluyen además determinar el nivel de BNP.

Los procedimientos para determinar los niveles de estos marcadores adicionales son conocidos en la técnica. Se encuentran disponibles kits comerciales para determinar estos marcadores adicionales.

#### **Kits**

También se proporcionan kits que contienen un anticuerpo que se enlaza específicamente a ST2, un anticuerpo que se enlaza específicamente a galectina-3, e instrucciones para usar el kit (por ejemplo, los anticuerpos en el kit) para realizar cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria. El anticuerpo que se enlaza específicamente a ST2 y el anticuerpo que se enlaza específicamente a galectina-3 puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado, completamente humano, no humano, por ejemplo, murino, monoespecífico o de cadena única. Cualquiera de los kits descritos en la presente memoria también puede proporcionarse como un ensayo ELISA (por ejemplo, puede incluir adicionalmente uno o más anticuerpos secundarios y/o un sustrato para la detección). Por ejemplo, cualquiera de los kits descritos en la presente memoria puede incluir un anticuerpo producido a partir del híbrido depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americano y designado por la Designación de depósito de patente PTA-10432. Se describen ejemplos adicionales de anticuerpos que se enlazan específicamente a ST2 en el documento WO 2011/127412 y la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2011/0256635.

Cualquiera de los kits descritos en la presente memoria también puede incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpos adicionales para uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) marcadores adicionales seleccionados del grupo de: proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP, BNP, troponina, CRP,

creatinina, enzimas de la función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana. Los anticuerpos para ST2, galectina-3, proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP, BNP, troponina, CRP, creatinina, enzimas de función hepática, albúmina y endotoxina bacteriana están disponibles comercialmente.

5 La divulgación se describe adicionalmente en el siguiente ejemplo, que no limita el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

**Ejemplo**

10 Se ha informado que las concentraciones circulantes tanto del receptor de interleucina-1 tipo 1 miembro de la familia ST2 y galectina-3 están elevadas en pacientes con insuficiencia cardíaca (HF) y son de pronóstico independientes entre sí. Se realizaron experimentos para investigar la utilidad de la medición de ST2 en pacientes con concentraciones elevadas de galectina-3.

15 Los sujetos utilizados en este ejemplo participaron en el estudio de investigación ProBNP de disnea en el departamento de emergencias (PRIDE), un estudio prospectivo y ciego de 599 sujetos con disnea que se presentaron en el servicio de ED del Hospital General de Massachusetts, que se realizó con el propósito de validar el uso diagnóstico y pronóstico de la prueba NT-proBNP. Los resultados del estudio PRIDE se informaron recientemente (Januzzi et al., Am. J. Cardiol. 95(8):948-954 (2005)).

20 El estándar de oro para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda se basó en la impresión de los médicos examinadores, cegados a los valores de NT-proBNP, que tenían toda la información disponible desde la presentación hasta un período de seguimiento de 60 días; para los pocos pacientes en los que el diagnóstico era incierto, los examinadores recibieron instrucciones de utilizar las pautas según lo informado por el Estudio Cardíaco de Framingham (McKee et al., N. Engl. J. Med. 285(26): 1441-1446(1971)).

Como se informó, 209 sujetos (35 %) en el estudio PRIDE fueron juzgados por tener disnea debido a insuficiencia cardíaca aguda desestabilizada, de los cuales 17 tenían síntomas leves (Clase II) según la clasificación de la Asociación Cardíaca de Nueva York (NYHA), 80 tenían síntomas moderados (Clase III), y 112 tenían síntomas graves (Clase IV).

25 Al final de un año, se contactó al médico encargado de cada paciente con el fin de determinar el estado vital. Como se informó, el seguimiento al año se completó en 597 sujetos en total.

30 La sangre recolectada en el momento de la presentación se analizó posteriormente para determinar las concentraciones de ST2, usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Critical Diagnostics, San Diego), como se describe en la presente memoria. Este ensayo utiliza anticuerpos monoclonales contra ST2 humano tanto para la captura como para la detección, y tuvo un coeficiente de variación interensayos de <10 % en el presente análisis. La galectina-3 se analizó utilizando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima disponible comercialmente (Bender Medsystems, Viena, Austria) y se midió en un lector de placas Victor 2 (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). La calibración del ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los valores se normalizaron a una curva estándar. Las variaciones intraensayo e interensayo para galectina-3 fueron 5,6 % y 8,6 %, respectivamente. La sangre utilizada para el presente estudio había sido sometida previamente a un solo ciclo de congelación-descongelación.

Distribución de valores de analitos

40 En esta cohorte de 209 pacientes con insuficiencia cardíaca, se produjeron valores de galectina-3 de 200 pacientes y valores de ST2 soluble de 204 pacientes. Ambos analitos mostraron una distribución no normal, por lo que los modelos de análisis de riesgo posteriores tendrán como base valores de la mediana, un valor correspondiente al percentil superior de variables continuas normales o como logaritmo (logaritmo natural) transformado, (Tabla 2). Como se muestra en la Tabla 1, una concentración para ST2 soluble de 35 ng/ml está por encima del percentil 90 de lo normal.

**Tabla 2: Medianas de analitos y valores de IQR**

	N	Mediana (ng/ml)	25-75 P	Distr. Normal
<b>Galectina-3</b>	200	9,2	7,4-12,0	<0,0001
<b>ST2</b>	204	42,7	26,9-78,7	<0,0001

45 **Análisis de riesgos**

En este estudio, la cohorte de ambos analitos, ST2 soluble y galectina-3, fueron predictores significativos de riesgo de mortalidad dentro de 1 año como se evaluó en un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox con cada analito utilizado como una variable de logaritmo transformado, continua (Tablas 3A y 3B). En este análisis, el

ST2 soluble tiene una proporción de riesgo (HR) más alto (más fuerte), pero ambos son estadísticamente significativos.

**Tabla 3A: Modelo de Cox HR univariado; Mortalidad dentro de 1 año**

Covariable	P	HR	95 % CI de HR
Ln ST2	<0,0001	2,12	1,58 a 2,85
Ln Galectina-3	0,0249	1,78	1,08 a 2,94

5

**Tabla 3B: Modelo de Cox HR univariado; Mortalidad dentro de 4 años**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
Ln ST2	0,0001	1,53	1,23 a 1,91
Ln Galectina-3	0,0089	1,63	1,13 a 2,36

En un modelo multivariado de regresión de riesgos proporcionales de Cox con cada analito utilizado como un logaritmo transformado, la variable continua de ambos analitos es significativa para el riesgo de mortalidad dentro de 4 años, sin embargo, la galectina-3 ya no es estadísticamente significativa para el riesgo de mortalidad dentro de 1 año, mientras que el ST2 soluble sigue siendo altamente predictivo (Tablas 4A y 4B).

10

**Tabla 4A: Modelo de Cox HR multivariado; Mortalidad dentro de 1 año**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
Ln ST2	<0,0001	2,07	1,54 a 2,79
Ln Galectina-3	0,0818	1,63	0,94 a 2,81

**Tabla 4B: Modelo de Cox HR multivariado; Mortalidad dentro de 4 años**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
Ln ST2	0,0006	1,49	1,19 a 1,86
Ln Galectina-3	0,0321	1,52	1,04 a 2,23

15 Ambos analitos también fueron probados para determinar su significación para predecir el riesgo en un período de seguimiento de 30 días. Como se observó para el período de seguimiento más largo de 1 año, ambos analitos son predictores significativos de mortalidad por todas las causas en un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariado con cada analito utilizado como una variable de logaritmo transformado, continua (Tabla 5).

**Tabla 5: Modelo de Cox HR univariado; Mortalidad dentro de 30 días**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
Ln ST2	0,0001	3,50	1,84 a 6,65
Ln Galectina-3	0,0030	3,41	1,52 a 7,61

20

En el modelo de seguimiento más corto, la galectina-3 conserva significación cuando también se incluye ST2 soluble en el modelo (Tabla 6).

**Tabla 6: Modelo de Cox HR multivariado; Mortalidad dentro de 30 días**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
<b>Ln ST2</b>	0,0003	3,27	1,73 a 6,20
<b>Ln Galectina-3</b>	0,0148	3,34	1,27 a 8,77

5 Cada analito también se evaluó para el riesgo de mortalidad por todas las causas dentro de 1 año y 4 años mediante el análisis de Kaplan-Meier (K-M) utilizando el valor de la mediana de la cohorte para cada uno. Como se muestra en las Figuras 1A y 1B, cuando se analiza mediante el valor de concentración de la mediana, la galectina-3 no es un predictor significativo del riesgo de mortalidad por todas las causas dentro de 1 año, pero alcanza significación durante 4 años. Sin embargo, como se muestra en las Figuras 2A y 2B, el ST2 soluble es un predictor fuertemente significativo del riesgo de mortalidad por todas las causas tanto en 1 año como en 4 años.

10 La ST2 también se evaluó mediante análisis K-M utilizando la concentración más baja de 35 ng/ml (Figura 2C). Como se muestra en la Figura 2C, el ST2 soluble es un predictor fuertemente significativo de mortalidad dentro de 4 años.

15 Para determinar si el ST2 soluble agrega valor predictivo en pacientes con insuficiencia cardíaca con galectina-3, se analizó un subconjunto de pacientes con concentraciones de galectina-3 mayores o iguales a la mediana de la concentración de la cohorte de 9,2 ng/ml con ST2 soluble. La Tabla 7 muestra los resultados de modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariados con ST2 soluble utilizado como una variable de logaritmo transformado, continua para la evaluación del riesgo de mortalidad por todas las causas dentro de 1 año y dentro de 20 días. El ST2 soluble es altamente predictivo en ambos períodos de tiempo en pacientes con insuficiencia cardíaca con galectina-3.

**Tabla 7: Aditivo de ST2 en pacientes con HF con galectina-3 (N = 98 pacientes)**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
<b>Ln ST2 (1 año)</b>	0,0010	1,96	1,32 a 2,93
<b>Ln ST2 (30 días)</b>	0,0029	3,25	1,50 a 7,04

25 Sin embargo, lo contrario no es completamente cierto (ver las Tablas 8A y 8B). En el subconjunto de pacientes con insuficiencia cardíaca con ST2 soluble, pacientes con concentraciones de ST2 solubles mayores o iguales a la mediana de la concentración del cohorte de 42,7 ng/ml, o en la concentración de ST2 soluble más baja de 35 ng/ml, la galectina-3 no es predictor significativo de mortalidad por todas las causas dentro de 1 año, pero alcanza significación estadística para el riesgo dentro de 30 días según lo evaluado por los modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox (Tablas 8A y 8B).

**Tabla 8A: Aditivo de galectina-3 para pacientes con HF con ST2 (ST2≥mediana), N = 98**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
<b>Ln Galectina-3 (1 año)</b>	0,2251	1,59	0,75 a 3,36
<b>Ln Galectina-3 (30 días)</b>	0,0214	4,10	1,24 a 13,53

30

**Tabla 8B: Aditivo de galectina-3 para pacientes con HF con ST2 (ST2≥35 ng/ml), N = 122**

Covariable	P	HR	95% CI de HR
------------	---	----	--------------

Covariable	P	HR	95% CI de HR
<b>Ln Galectina-3 (1 año)</b>	0,4332	1,26	0,71 a 2,26
<b>Ln Galectina-3 (30 días)</b>	0,0467	2,44	1,02 a 5,86

5 Estos resultados también se ilustran en la Figura 3, y se resumen en la Tabla 9, donde un análisis de la curva K-M de esta cohorte cuando los dos analitos se combinan (Log Rank p = 0,0011). En este análisis en pacientes con concentraciones inferiores a la mediana para ambos analitos se observa el perfil de riesgo más bajo (línea 1). Cuando el ST2 soluble está por debajo de la mediana y la galectina-3 es  $\geq$  a la mediana, el riesgo aumenta moderadamente (línea 2). Cuando la galectina-3 está por debajo de la mediana y el ST2 soluble es  $\geq$  a la mediana, el riesgo aumenta significativamente (línea 3). Y en pacientes con concentraciones  $\geq$  a la mediana para ambos analitos, el riesgo es el mayor.

**Tabla 9: Sumario del análisis K-M que se muestra en la Figura 3**

Factor/Descarte	1	2	3	4
<b>N</b>	62	43	45	57
<b>N decesos</b>	8	11	17	24
<b>% decesos</b>	12,9%	25,6%	37,8%	42,1%

10

**Listado de secuencias**

<110> Critical Care Diagnostics, Inc.

<120> PROCEDIMIENTOS DE PREDICCIÓN DEL RIESGO DE UN RESULTADO CLÍNICO ADVERSO

<130> 20060-0018WO1

15 <150> 61/453,782

<151> 2011-03-17

<160> 6

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

20 <211> 328

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

ES 2 750 126 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

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 750 126 T3

```

gaggaggac ctacaaagac tggaaactat tcttagctcc gtcactgact ccaagttcat 60
cccctctgtc tttcagtttg gttgagatat aggctactct tcccaactca gtcttgaaga 120
gtatcaccaa ctgcctcatg tgtggtgacc ttcactgtcg tatgccagtg actcatctgg 180
agtaatctca acaacgagtt accaatactt gctcttgatt gataaacaga atggggtttt 240
ggatcttagc aattctcaca attctcatgt attccacagc agcaaagttt agtaaacaat 300
catggggcct ggaaaatgag gctttaattg taagatgtcc tagacaagga aaacctagt 360
acaccgtgga ttggtattac tcacaaacaa acaaaagtat tcccactcag gaaagaaatc 420
gtgtgtttgc ctcaggccaa cttctgaagt ttctaccagc tgcagttgct gattctggta 480
tttataacctg tattgtcaga agtcccacat tcaataggac tggatatgcg aatgtcacca 540
tatataaaaa acaatcagat tgcaatgttc cagattattt gatgtattca acagatctcg 600
gatcagaaaa aaattccaaa atttattgtc ctaccattga cctctacaac tggacagcac 660
ctcttgagtg gtttaagaat tgtcaggctc ttcaaggatc aaggtagcag gcgcacaagt 720
catttttggg cattgataat gtgatgactg aggacgcagg tgattacacc tgtaaattta 780
tacacaatga aaatggagcc aattatagtg tgacggcgac caggtccttc acggcgaagg 840
atgagcaagg cttttctctg tttccagtaa tcggagcccc tgcacaaaat gaaataaagg 900
aagtggaaat tggaaaaaac gcaaacctaa ctgtctctgc ttgttttggg aaaggcactc 960
agttcttggc tgccgtcctg tggcagctta atggaacaaa aattacagac tttggtgaac 1020
caagaattca acaagaggaa gggcaaaaatc aaagtttcag caatgggctg gcttgtctag 1080
acatggtttt aagaatagct gacgtgaagg aagaggattt attgctgcag tacgactgtc 1140
tggccctgaa tttgcatggc ttgagaaggc acaccgtaag actaagtagg aaaaatccaa 1200
gtaaggagtg tttctgagac tttgatcacc tgaactttct cttagcaagt taagcagaat 1260
ggagtgtggg tccaagagat ccatcaagac aatgggaatg gcctgtgcca taaaatgtgc 1320
ttctcttctt cgggatgttg tttgtgtct gatctttgta gactgttcct gtttgcctgg 1380
agcttctctg ctgcttaaat tgttcgtcct cccccactcc ctctatcgt tggtttgcct 1440
agaacactca gctgcttctt tggcatcct tgttttctaa ctttatgaac tccctctgtg 1500
tcaactgtatg tgaaaggaaa tgcaccaaca accgtaaact gaacgtgttc ttttgtgctc 1560
ttttataact tgcattacat gttgtaagca tggccggttc tatacctttt tctggtcata 1620
atgaacactc attttgttag cgagggtggg aaagtgaaca aaaaggggaa gtatcaaact 1680
actgccattt cagtgagaaa atcctaggtg ctactttata ataagacatt tgttaggcca 1740
ttcttgcaat gatataaaga aatacctgag actgggtgat ttatatgaaa agaggtttaa 1800
ttggctcaca gttctgcagg ctgtatggga agcatggcgg catctgcttc tggggacacc 1860
tcaggagctt tactcatggc agaaggcaaa gcaaaggcag gcacttcaca cagtaaaagc 1920
aggagcgaga gagagggtgc acactgaaac agccagatct catgagaagt cactcactat 1980
tgaaggaca gcatcaaaga gatggtgcta aaccattcat gatgaactca ccccatgat 2040
ccaatcacct cccaccaggc tccacctcga atactgggga ttaccattca gcatgagatt 2100
tgggcaggaa cacagaccca aaccatacca cacacattat cattgttaaa ctttgtaaag 2160
tatttaaggt acatggaaca cacgggaagt ctggtagctc agcccatttc tttattgcat 2220
ctgttattca ccatgtaatt caggtaaccac gtattccagg gagcctttct tggccctcag 2280
tttgcagtat acacactttc caagtactct tgtagcatcc tgtttgtatc atagcactgg 2340
tcacattgcc ttacctaaat ctgtttgaca gtctgctcaa cacgactgca agctccatga 2400
gggcagggac atcatctctt ccatctttgg gtcccttagtg caatacctgg cagctagcca 2460
gtgctcagct aaatatttgt tgactgaata aatgaatgca caaccaaaaa aaaaaaaaaa 2520
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2542

```

<210> 3

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ala Asp Asn Phe Ser Leu His Asp Ala Leu Ser Gly Ser Gly Asn
  1           5           10           15
Pro Asn Pro Gln Gly Trp Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Ala Gly

```

ES 2 750 126 T3

			20					25					30			
Ala	Gly	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ala	Ser	Tyr	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gln	
		35					40					45				
Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	
	50					55					60					
Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Tyr	Pro	
65					70					75					80	
Gly	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Ser	
				85					90					95		
Ala	Thr	Gly	Ala	Tyr	Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	
			100					105					110			
Pro	Leu	Ile	Val	Pro	Tyr	Asn	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Pro	
		115					120					125				
Arg	Met	Leu	Ile	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Val	Lys	Pro	Asn	Ala	Asn	Arg	
	130					135					140					
Ile	Ala	Leu	Asp	Phe	Gln	Arg	Gly	Asn	Asp	Val	Ala	Phe	His	Phe	Asn	
145					150					155					160	
Pro	Arg	Phe	Asn	Glu	Asn	Asn	Arg	Arg	Val	Ile	Val	Cys	Thr	Tyr	Met	
				165					170						175	
Cys	Lys	Gly	Phe	Met	Phe	Thr	Val	Ser	Glu	Asn	Phe	Tyr	Ile	His	Gln	
			180					185					190			
Tyr	Pro	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Thr									
		195					200									

<210> 4

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 750 126 T3

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

<210> 5

<211> 744

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

gagtatttga ggctcggagc caccgccccg ccggcgcccc cagcacctcc tcgccagcag 60  
 ccgtccggag ccagccaacg agcggaaaat ggcagacaat ttttcgctcc atgatgcgtt 120  
 atctgggtct ggaaacccaa accctcaagg atggcctggc gcatggggga accagcctgc 180  
 tggggcaggg ggctaccag gggcttcta tcctggggcc taccctgggc aggcaccccc 240  
 aggggcttat cctggacagg cacctccagg cgcctaccct ggagcacctg gagcttatcc 300  
 cggagcacct gcacctggag tctaccaggg gccaccagc ggccctgggg cctaccatc 360  
 ttctggacag ccaagtgcc cgggagccta ccctgccact ggcccctatg gcgcccctgc 420  
 tggggcactg attgtgcctt ataacctgcc tttgcctggg ggagtgggtc ctcgcatgct 480  
 gataacaatt ctgggcacgg tgaagcccaa tgcaaacaga attgctttag atttccaaag 540  
 agggaatgat gttgccttcc actttaacc acgcttcaat gagaacaaca ggagagtcac 600  
 tgtttgact tacatgtgta aaggtttcat gttcactgtg agtgaaaatt tttacattca 660  
 tcaatatccc tcttgaagt catctactta ataaatatta cagtgaatta cctgtctcaa 720  
 tatgtcaaaa aaaaaaaaaa aaaa 744

<210> 6

<211> 1017

ES 2 750 126 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

gagtatttga ggctcggagc caccgccccg ccggcgcccc cagcacctcc tcgccagcag 60
ccgtccggag ccagccaacg agcggaaaat ggcagacaat ttttcgctcc atgatgcggt 120
atctgggtct ggaaacccaa accctcaagg atggcctggc gcatggggga accagcctgc 180
tggggcaggg ggctaccagc gggcttccca tcctggggcc taccocgggc aggcaccccc 240
aggggcttat cctggacagc cacctccagg cgcctaccct ggagcacctg gagcttatcc 300
cggagcacct gcacctggag tctaccagc gccaccagc ggccctgggg cctaccatc 360
ttctggacag ccaagtgcc aaggagccta cctgccact ggcccctatg gcgccctgc 420
tggggcactg attgtgcctt ataacctgcc tttgcctggg ggagtgggtc ctccatgct 480
gataacaatt ctgggcacgg tgaagcccaa tgcaaacaga attgctttag atttccaaag 540
agggaatgat gttgccttcc actttaacct acgcttcaat gagaacaaca ggagagtcac 600
tgtttgcaat acaaagctgg ataataactg ggggaaggaa gaaagacagt cggttttccc 660
atgtgaaagt gggaaacct tcaaaataca agtactgggt gaacctgacc acttcaagg 720
tgcagtgaat gatgctcact tgttgagta caatcatcgg gttaaaaaac tcaatgaaat 780
cagcaaacctg ggaatttctg gtgacataga cctcaccagt gcttcatata ccatgatata 840
atctgaaagg ggcagattaa aaaaaaaaaa agaatctaaa ccttacatgt gtaaagggtt 900
catgttcact gtgagtgaaa atttttacat tcatcaatat ccctcttgta agtcatctac 960
ttaataaata ttacagtgaa ttacctgtct caatatgtca aaaaaaaaaa aaaaaaa 1017

```

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para evaluar el riesgo de un resultado clínico adverso (ACO) en un sujeto humano con insuficiencia cardíaca y una concentración circulante elevada de galectina-3, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) determinar un nivel de ST2 soluble en una muestra biológica que comprende sangre, suero o plasma de un sujeto seleccionado que tiene insuficiencia cardíaca y una concentración circulante elevada de galectina-3; y
- (b) comparar el nivel de ST2 soluble en la muestra biológica de (a) con un nivel umbral de ST2 soluble,
- 10 en el que un sujeto seleccionado que tiene un nivel elevado de ST2 soluble en la muestra biológica de (a) en comparación con el nivel umbral de ST2 soluble se identifica como que tiene un mayor riesgo de un ACO en comparación con un sujeto que tiene insuficiencia cardíaca y un nivel elevado de galectina-3, que tiene un nivel no elevado de ST2 soluble, o un sujeto seleccionado que tiene un nivel no elevado de ST2 soluble en la muestra biológica de (a) en comparación con el nivel umbral de ST2 soluble se identifica como que tiene un riesgo disminuido de un ACO en comparación con un sujeto con insuficiencia cardíaca y un nivel elevado de galectina-3, que tiene un nivel elevado de ST2 soluble;
- 15 el ACO es, en conjunto, causa de riesgo de mortalidad dentro de 1 año o dentro de 30 días; y
- el nivel umbral de ST2 soluble se encuentra dentro del intervalo de 1,0 a 25 ng/ml.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- (c) determinar que un sujeto seleccionado que tiene un nivel elevado de ST2 soluble en la muestra biológica de (a) en comparación con el nivel umbral de ST2 soluble debe recibir un tratamiento continuo como paciente hospitalizado.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- (c) seleccionar un sujeto seleccionado que tenga un nivel elevado de ST2 soluble en la muestra biológica de (a) en comparación con el nivel umbral de ST2 soluble para participar en un estudio clínico.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- 25 (c) seleccionar un tratamiento terapéutico seleccionado del grupo que consiste en nitratos, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, agentes trombolíticos, digitálicos, agentes moduladores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y agentes reductores del colesterol para un sujeto seleccionado que tiene un nivel elevado de ST2 soluble en la muestra biológica de (a) en comparación con el nivel umbral de ST2 soluble.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los agentes reductores del colesterol son estatinas.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además determinar el nivel de uno o más marcadores adicionales en el sujeto.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el uno o más marcadores adicionales se seleccionan del grupo que consiste en proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP y BNP.

Figura 1A: Análisis K-M de Galectina-3 por 1 año (log Rank p=0,1122)

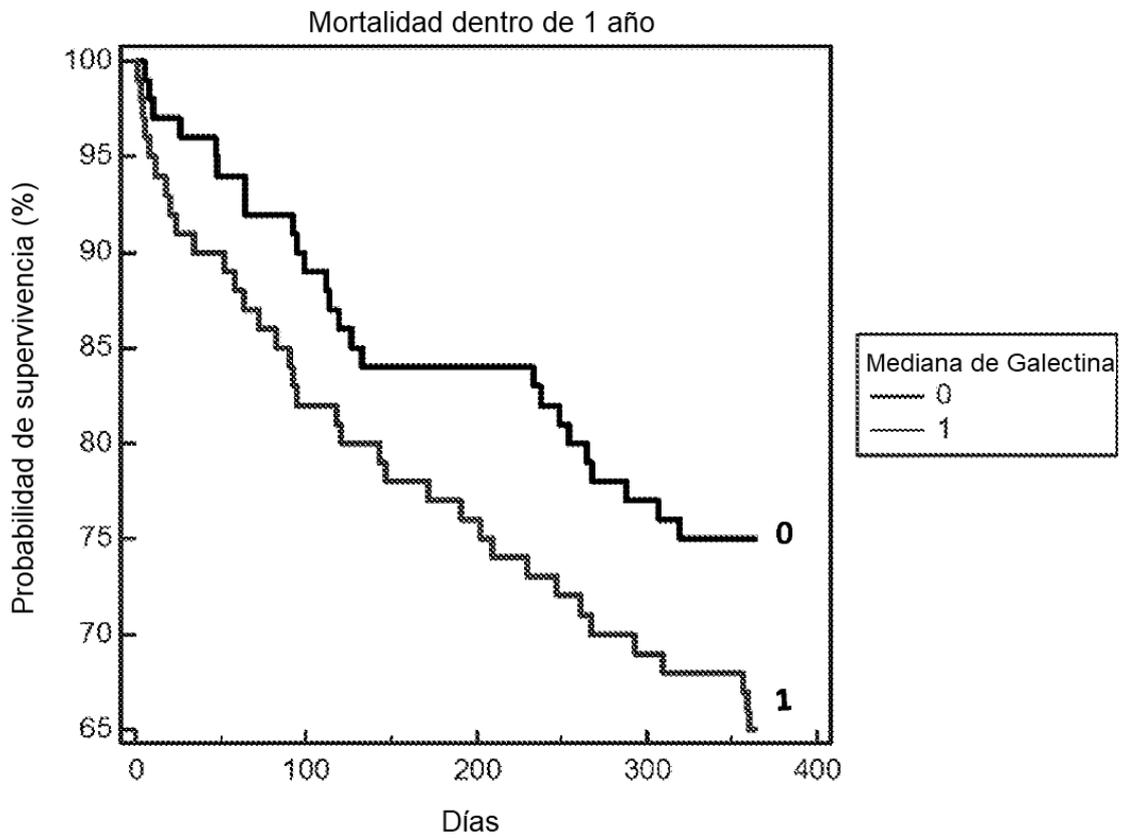


Figura 1B: análisis K-M de Galectina-3 por 4 años (log Rank  $p=0,020$ )

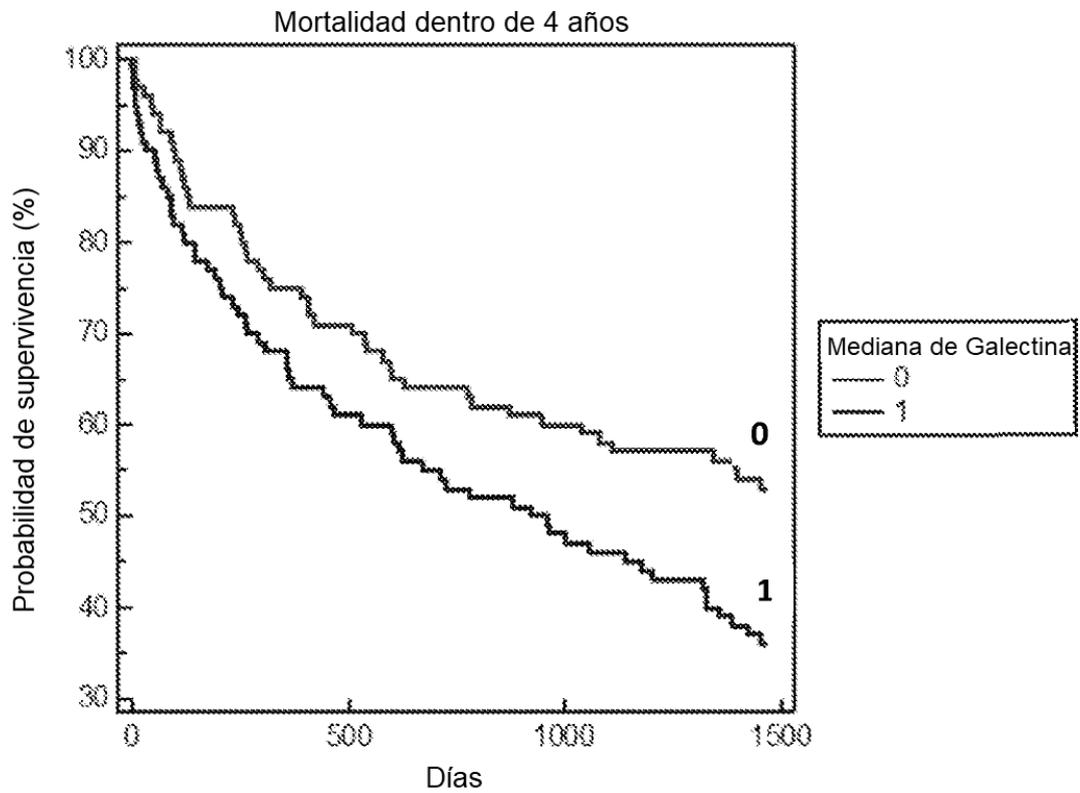


Figura 2A: análisis K-M de ST2 por 1 año (log Rank  $p=0,0003$ )

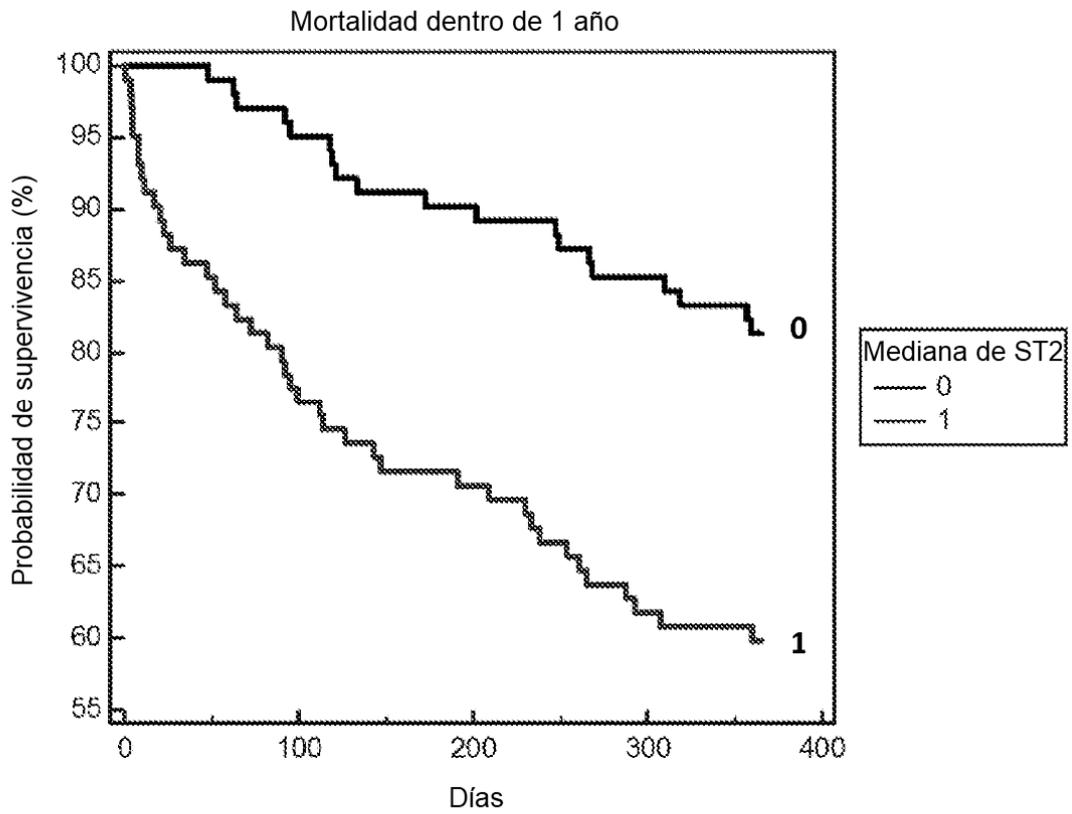


Figura 2B: Análisis K-M de ST2 por 4 años (log rank p=0,0022)

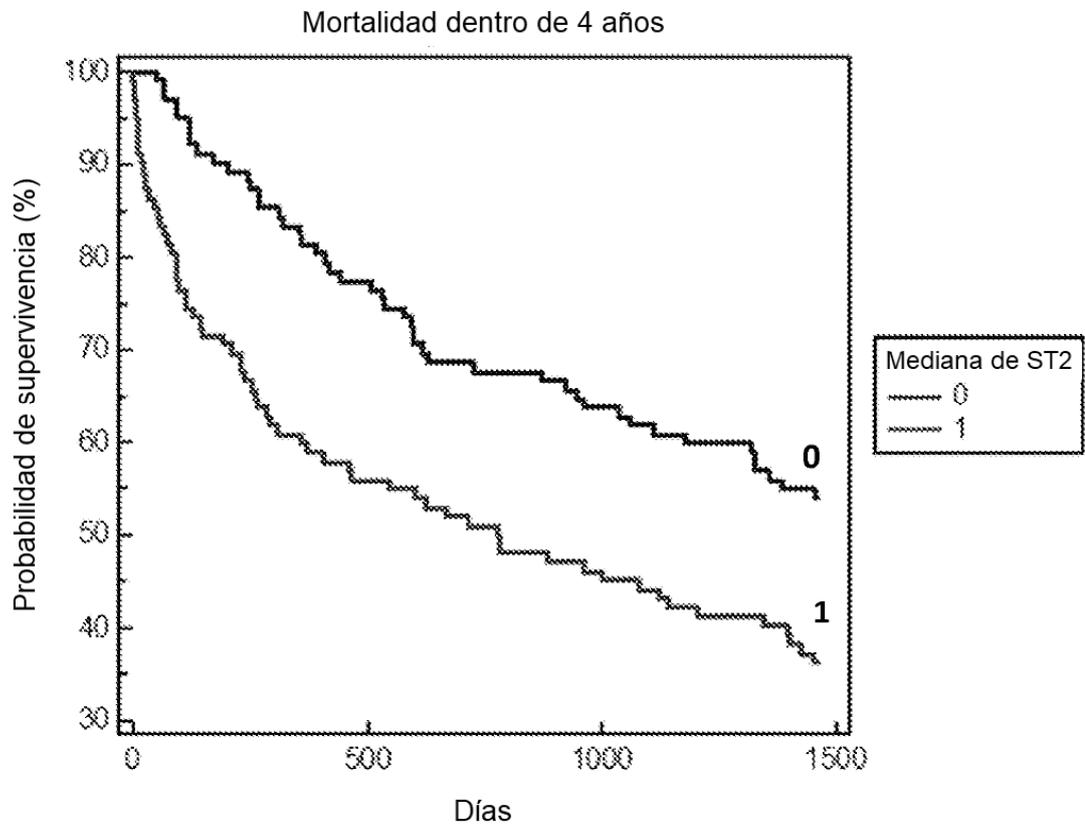


Figura 2C: Análisis K-M de ST2 por 4 años a 35ng/ml (log Rank p=0,0025)

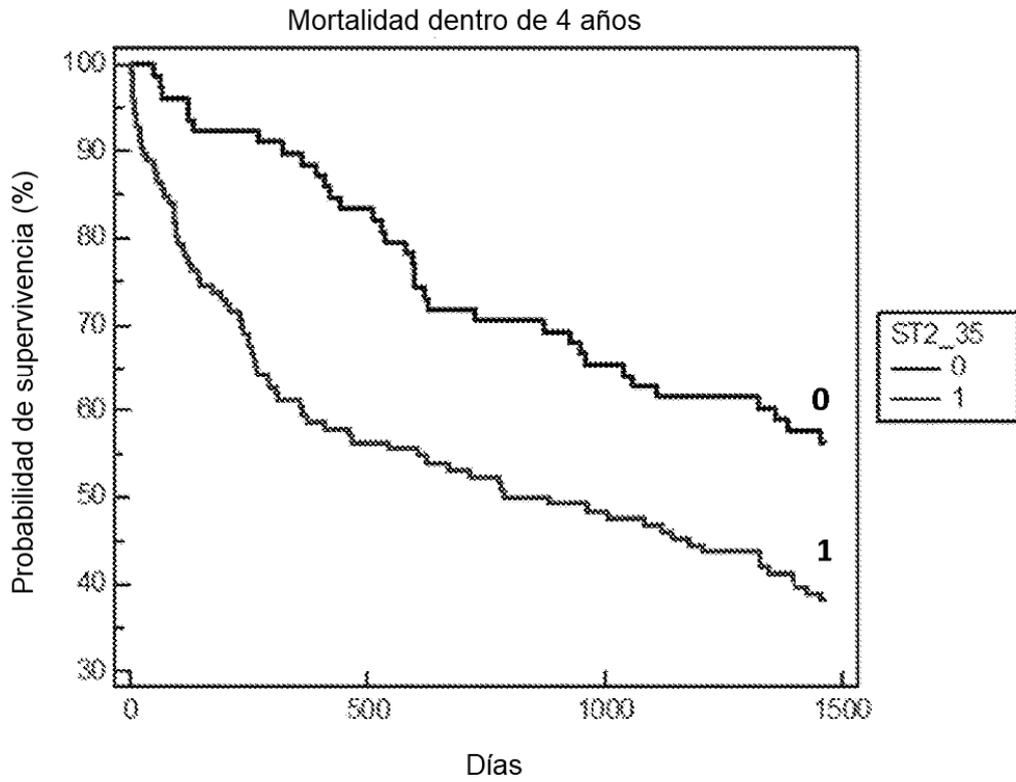
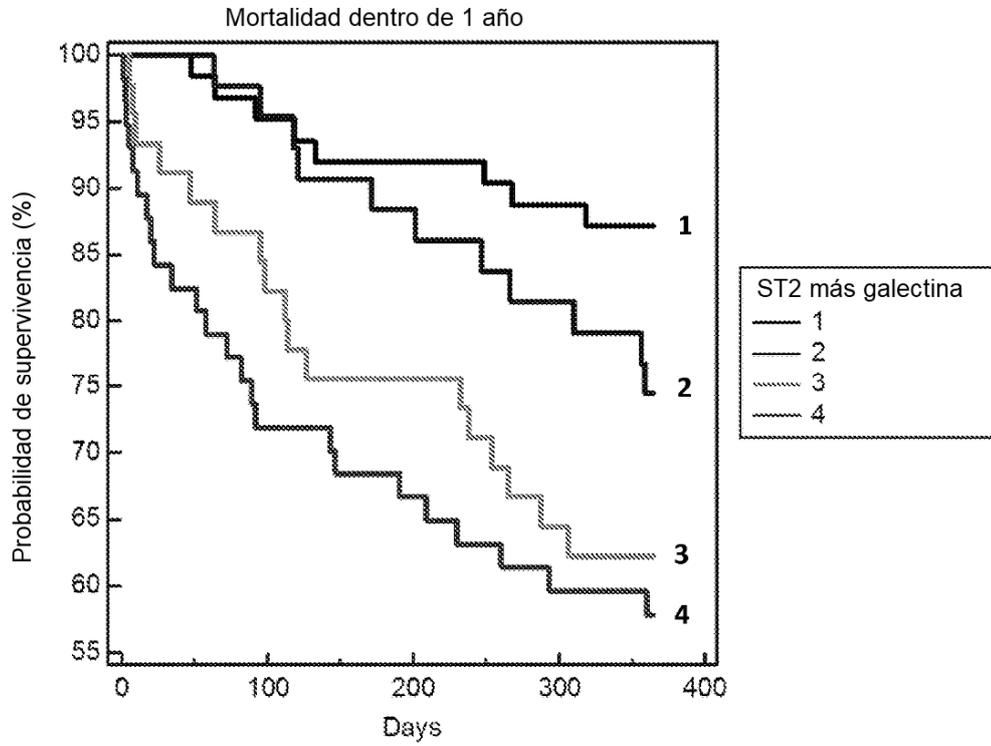


Figura 3: Análisis K-M de ST2 más Galectina-3



4=ambos $\geq$ mediana, 3=ST2 $\geq$ mediana, galectina-3<mediana, 2= ST2<mediana, galectina-3 $\geq$ mediana, 1=ambos<mediana