



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:
02.05.2007 07761742.1

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:
**15.04.2015 Europejski Biuletyn Patentowy 2015/16
EP 2019965 B1**

(13) **T3**
(51) Int.Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/58 (2006.01)

(54) Tytuł wynalazku:

Rozpoznawanie różnicowe chorób układu oddechowego i sercowo-naczyniowego

(30)

Pierwszeństwo:
02.05.2006 US 797285 P

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

04.02.2009 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2009/06

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:

30.10.2015 Wiadomości Urzędu Patentowego 2015/10

(73) Uprawniony z patentu:

Critical Care Diagnostics, Inc., New York, US

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAMES V. SNIDER, Pleasanton, US
SVEN JACOBSON, New York, US

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Izabela Szychulska-Hawranek
KANCELARIA PRAWNO-PATENTOWA BELLEPAT
ul. Grunwaldzka 58/48
37-700 Przemyśl

PL/EP 2019965 T3

Uwaga:

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

ROZPOZNAWANIE RÓŻNICOWE CHOROÓB UKŁADU ODDECHOWEGO I SERCOWO-NACZYNIOWEGO

DZIEDZINA TECHNIKI

5 Niniejszy wynalazek dotyczy metod określania prawdopodobieństwa obecności choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) lub choroby układu oddechowego (PD) u danego osobnika przy użyciu ST2 (zwanego również receptorem typu 1 interleukiny 1 [IL1RL1]) i biomarkera diagnostycznego, np. peptydu natriuretycznego, np. mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP).

TŁO

10 Takie nieswoiste objawy, jak duszność i ból w klatce piersiowej, stanowią częsty problem w warunkach podstawowej opieki ambulatoryjnej. Ustalenie rozpoznania może być trudne, ponieważ w rozpoznaniu różnicowym można uwzględnić wiele kategorii diagnostycznych, w tym choroby układu sercowo-naczyniowego i układu oddechowego. Zaburzenia podstawowe leżące u podłoża choroby mogą być stosunkowo łagodne (np. hiperwentylacja) lub poważniejsze, a nawet groźne dla życia (np. zator płucny albo niewydolność serca). Takie przypadki najlepiej jest kierować do oddziału pomocy
15 doraźnej. Przeprowadzona w porę ocena, trafne rozpoznanie i rozpoczęcie właściwego leczenia mają zasadnicze znaczenie dla optymalizacji terapii i powrotu pacjenta do zdrowia.

Weinberg i in. (2003) opisują badanie, w którym sprawdzano hipotezę zakładającą, że stężenie rozpuszczalnego biomarkera ST2 w surowicy krwi pacjentów z ciężką przewlekłą niewydolnością serca jest podwyższone u osób z aktywacją neurohormonalną. Wyniki badania wskazują na to, że
20 rozpuszczalny ST2 w surowicy krwi jest nowym biomarkerem aktywacji neurohormonalnej u pacjentów z niewydolnością serca, a dodatkowo, że u pacjentów z ciężką przewlekłą niewydolnością serca stopnia III-IV wg klasyfikacji NYHA zmiana stężenia ST2 stanowi niezależny czynnik prognostyczny zgonu lub przeszczepu w późniejszym czasie.

Shimpo i in. (2004) opisują badanie, w którym sprawdzano hipotezę zakładającą, że stężenie
25 ST2 w surowicy krwi wiąże się z ryzykiem zgonu lub niewydolności serca u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST (STEMI). Wyniki tego badania wskazują na to, że stężenie ST2 w surowicy krwi prognozuje ryzyko zgonu i niewydolności serca u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego.

30 Patent US 2004/0121343 opisuje metody i kompozycje umożliwiające ustalenie obecności lub braku jednej, a najlepiej wielu chorób, w tym zatorowości płucnej i niewydolności serca, którym towarzyszy jeden lub większa ilość podobnych objawów, w tym między innymi duszność.

PODSUMOWANIE

35 Niniejszy wynalazek dotyczy metody diagnostyki różnicowej in vitro chorób układu sercowo-naczyniowego (CVD) i chorób układu oddechowego (PD) u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością; metoda ta polega na:

oznaczeniu stężenia rozpuszczalnego ST2 (receptora typu 1 interleukiny 1 [IL1RL1]) w próbce pobranej od danego osobnika;

oznaczeniu stężenia mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP) w próbce; oraz

40 porównaniu stężenia rozpuszczalnego ST2 z referencyjnym stężeniem ST2 u osobnika bez CVD i PD, u którego prawdopodobieństwo wystąpienia PD lub CVD jest wysokie lub u osobnika z CVD i/lub PD;

porównaniu stężenia BNP w próbce ze niskim progiem stężenia BNP wynoszącym 100 pg/ml i z wysokim progiem stężenia BNP wynoszącym 500 pg/ml; oraz

rozpoznanii CVD u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością, u którego stężenie rozpuszczalnego ST2 jest niższe od wartości referencyjnej, a stężenie BNP wynosi co najmniej 100 pg/ml;

rozpoznanii PD u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością, u którego stężenie rozpuszczalnego ST2 jest co najmniej równe wartości referencyjnej, a stężenie BNP wynosi powyżej 500 pg/ml; lub

rozpoznanii CVD u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością, u którego stężenie rozpuszczalnego ST2 jest co najmniej równe wartości referencyjnej, a stężenie BNP przekracza 500 pg/ml;

przy czym próbka jest próbką krwi, surowicy lub osocza.

Opisano tu również dodatkowo pobieranie próbki biologicznej od osobnika; oznaczanie w takiej próbce stężenia pierwszego biomarkera wybranego z grupy złożonej z ST2 i/lub IL-33; oznaczenie w tej próbce stężenia drugiego biomarkera choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD); i porównanie stężeń pierwszego i drugiego biomarkera w próbce ze stężeniami referencyjnymi. Stężenie biomarkerów w próbce w porównaniu ze stężeniem referencyjnym koreluje (tj. koreluje statystycznie) z prawdopodobieństwem rozpoznania choroby układu oddechowego lub układu sercowo-naczyniowego u danego osobnika. W niektórych aspektach u osobnika występuje objaw nieswoisty, np. duszność lub ból w klatce piersiowej, sugerujący rozpoznanie choroby układu oddechowego lub CVD, a stężenie biomarkera wskazuje, która z tych dwóch chorób występuje u danego osobnika (o ile występuje).

Biomarker CVD jest biomarkerem diagnostycznym dla schorzeń sercowo-naczyniowych. Biomarkerem CVD może być peptyd natriuretyczny (NPO, np. mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP), prohormon BNP (proBNP), N-końcowy proBNP (NT-proBNP), przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), proANP lub NT-proANP. W jednym aspekcie biomarkerem CVD jest BNP.

Próbka biologiczna może być próbką krwi, surowicy, osocza, moczu lub tkanki. W jednym aspekcie próbka jest próbką surowicy krwi.

W pewnych aspektach opisanych tu metod stężenie referencyjne odpowiada stężeniu u osobnika, który nie choruje na CVD ani PD. W pewnych aspektach stężenie referencyjne odpowiada stężeniu u osobnika, który choruje na CVD. W pewnych aspektach stężenie referencyjne odpowiada stężeniu u osobnika, który choruje na PD lub jednocześnie na PD i CVD.

Oznaczenie stężenia biomarkera w próbce może obejmować kontakt kompozycji wiążącej z próbką, gdzie kompozycja wiążąca swoiście wiąże się z biomarkerem, oraz zmierzenie lub oznaczenie zakresu swoistego wiązania kompozycji wiążącej z próbką. Do odpowiednich kompozycji wiążących zalicza się przeciwciała wiążące się swoiście z biomarkerami w postaci sond polipeptydowych i oligopeptydowych wiążącymi się swoiście z polinukleotydem kodującym biomarker.

W niektórych aspektach u osobnika występuje duszność, a choroba układu sercowo-naczyniowego rozpoznana opisaną tu metodą to zastoinowa niewydolność serca, choroba niedokrwienna serca, niemiaryowość serca (arytmia), zapalenie osierdzia, ostry zawał mięśnia sercowego lub niedokrwistość.

W niektórych aspektach u osobnika występuje duszność, a choroba układu oddechowego rozpoznana opisanymi tu metodami to przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), astma, zapalenie płuc, odma opłucnowa, zatorowość płucna, wysięk w opłucnej, zmiana przerzutowa, obrzęk płuc, choroba refluksowa żołądka i przełyku z aspiracją treści żołądkowej lub restrykcyjna choroba płuc.

5 W niektórych aspektach opisane tutaj metody obejmują również oznaczanie w próbce stężenia jednego lub większej liczby innych dodatkowych biomarkerów, np. biomarkerów wybranych z grupy składającej się z troponiny, mioglobiny, izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB), albuminy modyfikowanej niedokrwieniem (IMA), interleukiny-6 (IL-6), białka C-reaktywnego (CRP), kreatyniny, D-dimerów, azotu mocznikowego (BUN), enzymów wątrobowych, albuminy i endotoksyny bakteryjnej.

10 Opisujemy tu także zestawy przeznaczone do diagnostyki chorób układu oddechowego. W skład zestawów wchodzi jedno lub większa liczba oddzielnych przeciwciał, z których każde wiąże się swoiście z biomarkerem wykorzystywanym w opisanym tu metodach i/lub sonda oligonukleotydowa wiążąca się swoiście z kwasem nukleinowym kodującym rzeczony biomarkery oraz instrukcję użycia w opisanym tu metodzie.

15 Opisano tu również zestawy przeznaczone do określania prawdopodobieństwa obecności choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) lub choroby układu oddechowego (PD). W skład zestawów wchodzi: (i) jedna lub większa liczba kompozycji wiążących, które swoiście wiążą się z IL-33 oraz kompozycja wiążąca, która swoiście wiąże się z ST2, (ii) kompozycja wiążąca, która wiąże się z biomarkerem dla CVD, a także (iii) instrukcja użycia w opisanym tu metodzie określającej
20 prawdopodobieństwo obecności CVD lub PD u danego osobnika. IL-33 i/lub ST2 oraz biomarker dla CVD mogą zawierać polipeptydy, a kompozycja wiążąca obejmuje przeciwciało lub jego fragment wiążący antygen, który wiąże się swoiście z każdym z tych polipeptydów. W niektórych aspektach IL-33 i/lub ST2 oraz biomarker dla CVD mogą zawierać kwas nukleinowy lub sondę kwasu nukleinowego, który wiąże się swoiście z każdym z tych kwasów nukleinowych.

25 Stosowane tu określenie „choroba układu sercowo-naczyniowego” odnosi się do zaburzeń serca i naczyń krwionośnych i obejmuje zaburzenia tętnic, żył, tętniczek, żyłek oraz naczyń włosowatych. Choroby układu sercowo-naczyniowego rozpoznawane opisaną tu metodą mogą obejmować niewydolność serca, chorobę niedokrwinną serca, niemiarywość serca (arytmia), zapalenie osierdzia oraz ostry zawał mięśnia sercowego.

30 Stosowane tu określenie „choroba układu oddechowego” odnosi się do zaburzeń płuc. Choroby układu oddechowego rozpoznawane opisanymi tu metodami mogą obejmować przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP), astmę, zapalenie płuc, odmę opłucnową, zatorowość płucną, wysięk w opłucnej, zmianę przerzutową, obrzęk płuc, chorobę refluksową żołądka i przełyku z aspiracją treści żołądkowej i/lub restrykcyjną chorobę płuc.

35 Stosowane tu określenie „wzrost ekspresji” odnosi się do zwiększenia poziomu ekspresji genu i/lub kodowanego przez niego polipeptydu. „Zwiększenie poziomu ekspresji” oznacza zwiększenie (to znaczy do wykrywalnego poziomu) replikacji, transkrypcji i/lub translacji genu, np. ST2, gdyż wzrost ekspresji któregośkolwiek z tych procesów powoduje podwyższenie stężenia/ilości polipeptydu kodowanego przez dany gen. Natomiast stosowane tu określenie „zahamowanie ekspresji” lub
40 „zmniejszenie poziomu ekspresji” odnosi się do ograniczenia replikacji, transkrypcji i/lub translacji genu i/lub kodowanego przez niego polipeptydu. Wzrost lub zahamowanie ekspresji genu można określić w sposób bezpośredni wykrywając odpowiednio zmniejszenie lub zwiększenie poziomu mRNA dla danego genu albo poziomu ekspresji polipeptydu kodowanego przez ten gen wykorzystując dowolne odpowiednie metody znane w danej dziedzinie, takie jak (odpowiednio) hybrydyzacja kwasu

nukleinowego lub metody wykrywania przeciwciał, i porównując z kontrolą. Stosowane tu określenie „ekspresja” odnosi się do ekspresji kwasu nukleinowego i/lub polipeptydu.

5 Stosowane tu określenie „osobnik” oznacza ssaka, np. człowieka lub inny gatunek ssaków. Na ogół do zastosowania w diagnostyce u ludzi korzystne są ludzkie kwasy nukleinowe i polipeptydy albo cząsteczki kwasu nukleinowego lub polipeptydy syntetyzowane lub wytwarzane w oparciu o odpowiednią sekwencję ludzkiego kwasu nukleinowego lub polipeptydu.

Stosowane tu określenie „próbka” dotyczy próbki krwi i/lub surowicy, i/lub osocza, i/lub moczu, i/lub tkanki. W niektórych aspektach próbka jest próbką surowicy lub krwi.

10 O ile nie określono inaczej, wszystkie stosowane tu terminy techniczne i naukowe mają takie samo znaczenie, jak terminy powszechnie znane przez przeciętnego specjalistę w dziedzinie, do której należy to ujawnienie. Opisano tu metody i materiały przeznaczone do stosowania w niniejszym odkryciu; mogą być również użyte odpowiednie znane w danej dziedzinie metody i materiały. Materiały, metody i przykłady służą jedynie do celów demonstracyjnych i nie mają być ograniczające. W przypadkach spornych niniejsza charakterystyka włącznie z podanymi w niej definicjami jest
15 rozstrzygająca.

Inne cechy i zalety wynalazku będą wynikały z podanego niżej szczegółowego opisu, figur i zastrzeżeń.

OPIS RYSUNKÓW

20 FIG. 1 przedstawia tabelę ilustrującą wpływ przebiegu POChP na stężenie ST2 u osobników z ostrą niewydolnością serca lub bez ostrej niewydolności serca.

FIG. 2 przedstawia wykres pudełkowy ilustrujący stężenia ST2 u osobników z POChP/astmą i/lub niewydolnością serca.

OPIS SZCZEGÓŁOWY

25 Ustalenie dokładnego rozpoznania u osobnika zgłaszającego się z nieswoistymi objawami może być trudne, gdyż etiologia tych objawów może być bardzo różna. Na przykład, osoba z dusznością (zadyszka, problemy z oddychaniem) może cierpieć na chorobę układu oddechowego lub chorobę układu sercowo-naczyniowego, albo na obie te choroby jednocześnie.

Metodyka ogólna

30 Na ogół, opisane tu metody dotyczą oceny stężenia pierwszego biomarkera (ST2 i/lub IL-33) oraz drugiego biomarkera dla CVD (np. peptydu natriuretycznego (NP)) w próbce biologicznej (np. krwi, surowicy, osocza, moczu lub tkanki) pobranej od danego osobnika, np. ssaka, np. człowieka. Jak opisano w niniejszym dokumencie, stężenie to może zawierać informacje o wartości diagnostycznej, np. może wskazywać, czy u danego osobnika występuje choroba układu oddechowego (PD, czy choroba układu sercowo-naczyniowego (CVD). W niektórych aspektach drugim biomarkerem jest
35 mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP).

W jednym przykładzie rozpoznanie CVD lub PD można ustalić kierując się informacjami podanymi w Tabeli 1.

Tabela 1: Rozpoznanie of CVD lub PD

	Niskie stężenie ST2	Wysokie stężenie ST2
	(np. < 0.20 ng/ml w surowicy krwi)	(np. ≥ 0.20 ng/ml w surowicy krwi)
Niskie stężenie BNP (< 100 pg/ml)	małe prawdopodobieństwo CVD lub PD	prawdopodobnie PD
Umiarkowane stężenie BNP (100-500 pg/ml)	przypuszczalnie CVD	przypuszczalnie PD
Wysokie stężenie BNP (> 500 pg/ml)	prawdopodobnie CVD	wysoce prawdopodobnie CVD

5 Zatem u osobnika, u którego zarówno stężenie biomarkera CVD (np. BNP), jak i stężenie ST2 jest niskie, prawdopodobieństwo obecności CVD lub PD jest niewielkie. Niskie stężenie biomarkera CVD i wysokie stężenie ST2 wskazuje na większe prawdopodobieństwo PD niż CVD.

U osobników, u których stężenie BNP jest umiarkowane, niskie stężenie ST2 wskazuje na przypuszczalne występowanie CVD (z większym prawdopodobieństwem niż PD), natomiast wysokie stężenie ST2 wskazuje na przypuszczalne występowanie PD (z większym prawdopodobieństwem niż CVD).

10 U osobników, u których stężenie biomarkera CVD jest wysokie, niskie stężenie ST2 wskazuje na prawdopodobne występowanie CVD (z większym prawdopodobieństwem niż PD), a wysokie stężenie ST2 wskazuje na wysoce prawdopodobne występowanie CVD (z większym prawdopodobieństwem niż PD).

15 Wykorzystując opisane tu metody można ustalić lub wykluczyć rozpoznanie u danego osobnika, dzięki czemu lekarz może odpowiednio ukierunkować diagnostykę, a zatem także leczenie. Choć występowanie jednocześnie u jednego osobnika chorób o obydwu etiologiach jest możliwe, w danym okresie (a zwłaszcza w sytuacjach nagłych wymagających natychmiastowej interwencji, takich jak duszność) prawdopodobnie choroba o jednej etiologii będzie „dominująca”, a zatem będzie stanowić podstawowy cel leczenia.

20 Stężenia biomarkerów można oznaczyć jednorazowo, np. w momencie zgłoszenia się do lekarza. W niektórych aspektach stężenia biomarkerów oznacza się przynajmniej raz po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 18 i/lub 24 godzinach, i/lub 1-7 dniach (lub później) po wystąpieniu objawów.

25 W przypadku, gdy stężenie biomarkerów oznaczane jest więcej niż raz, można wykorzystać stężenie najwyższe lub przeciętne albo określić i wykorzystać zmianę stężenia. Stężenia biomarkerów można również oznaczać wielokrotnie, aby ocenić odpowiedź osobnika na leczenie. Przykładowo, stężenie np. IL-33 i/lub ST2 oznaczane po podaniu leków, np. co najmniej jednej dawki lub jednego kursu leczenia, można porównać ze stężeniem oznaczonym przed rozpoczęciem leczenia, np. stężeniem wyjściowym. Zmiana stężenia może wskazywać, czy leczenie okazało się skuteczne; np. obniżenie stężenia mogłoby wskazywać na skuteczność leczenia.

30 Ocena stężenia biomarkera u danego osobnika zazwyczaj obejmuje pobranie od niego próbki biologicznej, np. surowicy lub krwi. Stężenia biomarkerów w próbce można oznaczyć mierząc poziom polipeptydów biomarkera w próbce metodami znanymi w danej dziedzinie i/lub opisanymi w tym dokumencie, np. metodą immunoenzymatyczną, taką jak test immunoenzymosorbcyjny (ELISA). Ewentualnie, można zmierzyć poziom mRNA kodującego biomarkery, także metodami znanymi w

danej dziedzinie i/lub opisanymi w tym dokumencie, np. za pomocą testu ilościowego PCR lub metodą hybrydyzacji Northern blotting.

Przykładowo, opisana tu metoda, np. diagnostyki różnicowej chorób układu oddechowego, może obejmować kontakt próbki pobranej od osobnika, np. krwi, surowicy, osocza, moczu lub tkanki, z kompozycją wiążącą (np. przeciwciałem lub sondą oligonukleotydową), która wiąże się swoiście z polipeptydem lub kwasem nukleinowym tych biomarkerów w sposób opisany w niniejszym dokumencie. Wspomniane metody mogą również obejmować kontakt próbki pobranej od osobnika kontrolnego, osobnika zdrowego albo próbki prawidłowej tkanki lub płynu ustrojowego pobranej od osobnika badanego z kompozycją wiążącą, np. w celu uzyskania materiału referencyjnego lub kontrolnego. Ponadto, metoda może dodatkowo obejmować porównanie poziomu swoistego wiązania danej kompozycji z próbką osobnika badanego i poziomu swoistego wiązania danej kompozycji z próbką osobnika zdrowego, osobnika kontrolnego albo próbką prawidłowej tkanki lub płynu ustrojowego pobraną od osobnika badanego. Można także porównać ekspresję lub aktywność biomarkerów w próbce badanej lub u badanego osobnika i w próbce kontrolnej lub u osobnika kontrolnego. Do próbek kontrolnych można zaliczyć np. próbki pobrane od osobników bez danej choroby albo od osobników z potwierdzonym schorzeniem, np. chorobą układu oddechowego lub układu sercowo-naczyniowego. Poziom ekspresji lub aktywności u osobnika kontrolnego lub w próbce kontrolnej można przedstawić jako wartość ustaloną z góry, np. określoną w grupie osobników kontrolnych odpowiedniej pod względem statystycznym.

Przeciwciało, które „wiąże się swoiście” z antygenem, wiąże się preferencyjnie z konkretnym antygenem w próbce zawierającej inne białka. Stosowane tu określenie „przeciwciało” odnosi się do cząsteczki immunoglobuliny lub jej części aktywnej immunologicznie, np. części wiążącej się z antygenem. Do przykładowych aktywnych immunologicznie części cząsteczek immunoglobuliny zalicza się fragmenty F(ab) and F(ab')₂, które można otrzymać poddając określone przeciwciało działaniu enzymu, takiego jak pepsyna. Przeciwciało to może być przeciwciałem poliklonalnym, monoklonalnym, rekombinowanym (np. chimerycznym lub humanizowanym), w pełni ludzkim, nie-ludzkim (np. mysim), monoswoistym lub jednołańcuchowym. W niektórych aspektach pełni ono funkcję efektorową i może wiązać komplement.

„Sonda oligonukleotydowa” (zwana także po prostu „sondą”) jest kwasem nukleinowym złożonym z co najmniej 10, ale mniej niż 200 (zazwyczaj mniej niż około 100 lub 50) par bazowych. Sonda, która „wiąże się swoiście” z docelowym kwasem nukleinowym, hybryduje z materiałem docelowym w bardzo rygorystycznych warunkach. Stosowane tu określenie „hybryduje w bardzo rygorystycznych warunkach” opisuje warunki hybrydyzacji i płukania. Stosowane tu bardzo rygorystyczne warunki oznaczają użycie 0.5 M fosforanu sodu z 7% SDS w temperaturze 65°C, a następnie co najmniej jedno płukanie w roztworze 0.2 x SSC z 1% SDS w temperaturze 65°C. Metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych są znane specjalistom w danej dziedzinie i można je znaleźć w publikacji Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Wykrywanie można ułatwić przez sprzęganie (tj. fizyczne połączenie) przeciwciała lub sondy z wykrywalną substancją (czyli znakowanie przeciwciał). Do przykładowych substancji wykrywalnych można zaliczyć różne enzymy, grupy prostetyczne, materiały fluorescencyjne, materiały luminescencyjne, materiały bioluminescencyjne i materiały radioaktywne. Do przykładowych odpowiednich enzymów zalicza się peroksydazę chrzanową, fosfatazę zasadową, β-galaktozydazę lub acetylocholinoesterazę; do przykładowych odpowiednich kompleksów grup prostetycznych zalicza się kompleksy streptawidyna/biotyna i awidyna/biotyna; do przykładowych odpowiednich materiałów fluorescencyjnych zalicza się umbeliferon, fluoresceinę, izotiocyjanian fluoresceiny, rodaminę, dichlorotriazynyloaminę fluoresceiny, chlorek dansylu, kropki kwantowe lub fikoerytrynę; do

przykładowych materiałów luminescencyjnych zalicza się luminol; do przykładowych materiałów bioluminescencyjnych zalicza się lucyferazę, lucyferynę i ekworynę, a do przykładowych odpowiednich materiałów radioaktywnych zalicza się ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S lub ³H.

5 Można zastosować testy diagnostyczne z matrycami biologicznymi, takimi jak żywe komórki, wyciągi komórkowe, utrwalone komórki, hodowle komórkowe, płyny ustrojowe lub próbki do ekspertyz z dziedziny medycyny sądowej. Do przeciwciał sprzężonych przydatnych w diagnostyce lub w zestawach zalicza się przeciwciała sprzężone z barwnikami, izotopy, enzymy i metale - patrz np. w publikacjach: Le Doussal i in., *New Engl. J. Med.* 146:169-175 (1991); Gibellini i in., *J. Immunol.* 160:3891-3898 (1998); Hsing i Bishop, *New Engl. J. Med.* 162:2804-2811 (1999); Everts i in., *New Engl.*
10 *J. Med.* 168:883-889 (2002). Istnieją różne formy metod analitycznych, takie jak testy radioimmunologiczne (RIA), testy ELISA i mikroukłady „lab on a chip” (patenty US Nr 6,176,962 oraz 6,517,234).

15 W opisanych tu metodach można wykorzystać techniki znane w biochemii i biologii molekularnej (patrz np. publikacje: Maniatis i in., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook i Russell, *Molecular Cloning*, wyd. III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Wu, *Recombinant DNA*, Tom 217, Academic Press, San Diego, Calif (1993); i Ausbel i in., *Current Protocols in Molecular Biology*, Tom 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. (2001)).

20 Po oznaczeniu stężenia biomarkera można je porównać ze stężeniem referencyjnym. W niektórych aspektach stężenie referencyjne będzie stanowiło stężenie progowe, powyżej którego u danego osobnika można rozpoznać CVD lub PD. Wybrane stężenie referencyjne może zależeć od metodyki zastosowanej do pomiaru stężenia biomarkerów. W niektórych aspektach stężenie referencyjne stanowi przedział stężeń.

25 W niniejszym dokumencie piszemy również, że można oznaczyć zarówno stężenie ST2, jak i IL-33, a informacje uzyskane w wyniku porównania stężeń obydwu tych biomarkerów z ich odpowiednimi stężeniami referencyjnymi dostarczają łącznych danych dotyczących występowania u danego osobnika choroby układu oddechowego i/lub występowania u danego osobnika ciężkiej choroby. W niektórych aspektach można określić stosunek stężenia ST2 do stężenia IL-33 i porównać go ze stosunkiem referencyjnym stanowiącym stosunek progowy, powyżej którego u osobnika
30 stwierdza się CVD lub PD, np. jak w Tabeli 1.

ST2/receptor typu 1 interleukiny 1 (IL1RL1)

35 Gen ST2 należy do rodziny receptora interleukiny 1, której produkt białkowy istnieje zarówno w postaci przezbłonowej, jak i w postaci rozpuszczalnego receptora wykrywalnego w surowicy krwi (Kieser i in., *FEBS Lett.* 372(2-3):189-93 (1995); Kumar i in., *J. Biol. Chem.* 270(46):27905-13 (1995); Yanagisawa i in., *FEBS Lett.* 302(1):51-3 (1992); Kuroiwa i in., *Hybridoma* 19(2):151-9 (2000)). Niedawno wykazano, że ekspresja ST2 znacząco wzrasta w doświadczalnym modelu niewydolności serca (Weinberg i in., *Circulation* 106(23):2961-6 (2002)), a wstępne wyniki badań wskazują na możliwość podwyższenia stężeń ST2 u osób z przewlekłą ciężką niewydolnością serca, (Weinberg i in., *Circulation* 107(5):721-6 (2003)) a także u osób z ostrym zawałem mięśnia sercowego (Shimpo i in.,
40 *Circulation* 109(18):2186-90 (2004)).

Sądzi się, że przezbłonowa postać ST2 uczestniczy w modulowaniu odpowiedzi limfocytów T pomocniczych typu 2 (Lohning i in., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(12):6930-5 (1998); Schmitz i in., *Immunity* 23(5):479-90 (2005)) i może także uczestniczyć w rozwoju tolerancji w ciężkich lub przewlekłych odczynach zapalnych (Brint i in., *Nat. Immunol.* 5(4):373-9 (2004)), natomiast w

fibroblastach pobudzonych do wzrostu zwiększa się poziom ekspresji rozpuszczalnej postaci ST2 (Yanagisawa i in., 1992, wyżej). Dane z badań doświadczalnych wskazują na znaczący wzrost ekspresji genu ST2 w rozciągniętych miocytach (Weinberg i in., 2002, wyżej) w sposób analogiczny do aktywacji genu BNP (Bruneau i in., *Cardiovasc. Res.* 28(10):1519-25 (1994)).

5 Tominaga (*FEBS Lett.* 258:301-304 (1989)) wyizolował mysie geny ekspresowane swoiście przez pobudzenie wzrostu w komórkach BALB/c-3T3; jeden z tych genów nazwał St2 (skrót od Growth Stimulation-Expressed Gene 2 [Gen 2 ekspresowany przez stymulację wzrostu]). Gen St2 koduje 2 produkty białkowe: ST2 (IL1RL1) w wydzielanej postaci rozpuszczalnej; oraz ST2L w postaci receptora przezłonowego bardzo podobnego do receptorów interleukiny 1. Komitet Nazewnictwa HUGO
10 wskazał ludzki gen homologiczny jako receptor typu 1 interleukiny 1 (IL1RL1), którego klonowanie opisano w publikacji Tominaga i in., *Biochim. Biophys. Acta.* 1171:215-218 (1992). Obydwie te nazwy (ST2 i IL1RL1) są tu stosowane zamiennie.

15 Sekwencja mRNA krótszej, rozpuszczalnej izoformy ludzkiego ST2 znajduje się w banku genów GenBank Acc. No. NM_003856.2, a sekwencja polipeptydowa znajduje się w banku genów GenBank Acc. No. NP_003847.2; sekwencja mRNA dłuższej postaci ludzkiego ST2 znajduje się w banku genów GenBank Acc. No. NM_016232.4; sekwencja polipeptydowa znajduje się w banku genów GenBank Acc. No. NP_057316.3. Dodatkowe informacje udostępniono w publicznej bazie danych po numerem GeneID: 9173, MIM ID # 601203 oraz UniGene No. Hs.66. Na ogół w opisanych tu metodach oznaczana jest postać rozpuszczalna polipeptydu ST2.

20 Metody wykrywania i oznaczania stężenia ST2 są znane w danej dziedzinie, np. jak opisane w amerykańskich patentach publikowanych nr 2003/0124624, 2004/0048286 i 2005/0130136. Zestawy do oznaczania stężenia polipeptydu ST2 są również dostępne w obrocie, np. ST2 ELISA Kit produkowany przez Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), nr 7638. Poza tym, urządzenia do pomiaru stężenia ST2 i innych biomarkerów opisano w amerykańskim patencie publikowanym nr 2005/0250156.

25 W jednym aspekcie stężenie ST2 oznacza się jednorazowo, np. w momencie zgłoszenia się do lekarza. W niektórych aspektach stężenie ST2 oznacza się przynajmniej raz 2, 4, 6, 8, 12, 18 i/lub 24 godzin, i/lub 1-7 dni po wystąpieniu objawów.

30 Opisujemy tu także możliwość oznaczania stężenia ST2 więcej niż raz; w tym przypadku można wykorzystać najwyższy wynik pomiarów. W przypadku, gdy stężenie ST2 oznaczane jest więcej niż raz, można wykorzystać stężenie najwyższe albo określić i wykorzystać zmianę stężenia. Stężenia ST2 można również oznaczać wielokrotnie, aby ocenić odpowiedź osobnika na leczenie. Przykładowo, stężenie ST2 oznaczane po podaniu leków, np. co najmniej jednej dawki lub jednego kursu leczenia, można porównać ze stężeniem ST2 oznaczonym przed rozpoczęciem leczenia, np. stężeniem
35 wyjściowym. Zmiana stężenia ST2 może wskazywać, czy leczenie okazało się skuteczne; np. obniżenie stężenia ST2 mogłoby wskazywać na skuteczność leczenia.

Metody te mogą również obejmować określenie zbieżności sekwencji nukleotydów pod nr RefSNP ID: rs1041973.

Interleukina 33 (IL-33)

40 Niedawno zidentyfikowano IL-33 jako ligand ST2, opisywano także obecność podwyższonych stężeń IL-33 w różnych schorzeniach o podłożu zapalnym (patrz Schmitz i in., *Immunity* 23(5):479-90 (2005); amerykański patent publikowany nr 2005/0203046). W opisanych tu metodach stężenie ST2 można oznaczać dodatkowo oprócz stężenia IL-33. Można również ustalić stosunek stężenia ST2 do

stężenia IL-33, jak również stosunek kompleksów związanych do związanych i/lub. Białko IL-33 jest eksprymowane jako cząsteczka nieaktywna (pre-IL-33), której aktywacja następuje w wyniku rozszczepienia przez kaspazę I prowadzącego do powstania aktywnego peptydu IL-33, a także peptydowego produktu rozszczepienia pro-IL-33. Z tego względu, opisane tu metody mogą obejmować
5 oznaczanie jednego, dwóch lub wszystkich trzech form: dojrzałej IL-33, pre-IL-33 i/lub pro-IL-33. Wszystkie te formy określane są terminem „IL-33.”

Sekwencja kwasu nukleinowego IL-33 znajduje się w banku genów GenBank Acc. No. NM_033439.2, a sekwencja polipeptydowa w banku genów GenBank Acc. No. NP_254274.1. Dodatkowe informacje udostępniono w publicznej bazie danych po numerem GeneID: 90865, MIM ID
10 # *608678 oraz UniGene No. Hs.348390. IL-33 znana jest również jako C9ORF26 (Chromosome 9 Open Reading Frame 26); NFHEV (Nuclear Factor from High Endothelial Venules); oraz Interleukina 33. Patrz także Baekkevold i in., Am. J. Path. 163: 69-79 (2003).

Metody oznaczania stężenia polipeptydu i kwasu nukleinowego IL-33 są znane w danej dziedzinie, patrz np. Schmitz i in., Immunity 23(5):479-90 (2005); amerykański patent publikowany nr
15 2005/0203046.

Biomarkery CVD

Metody tu opisane obejmują oznaczanie stężeń biomarkerów CVD oprócz IL1RL1 (ST2) i/lub IL-33. Do odpowiednich biomarkerów CVD zalicza się troponinę, NT-proBNP, BNP NT-proANP i ANP.

W niektórych aspektach diagnostyczny biomarker CVD jest peptydem natriuretycznym typu B (BNP), marker stresu hemodynamicznego charakterystyczny dla niewydolności serca. Stężenie BNP można oznaczać metodami standardowymi, np. we krwi pełnej lub w surowicy krwi. Przykładowo, w
20 obrocie dostępnych jest wiele zestawów analitycznych, np. Triage BNP Test (Biosite, Inc., San Diego, CA), szybki test przyłóżkowy (ang. point-of-care) umożliwiający analizę krwi pełnej lub osocza i uzyskanie wyników w ciągu około 15 minut; chemiluminescencyjny test immunologiczny „kanapkowy”
25 (Bayer HealthCare Diagnostics, Tarrytown, NY) do oznaczania BNP wykonywany na platformach ADVIA Centaur i ACS:180; mikrocząsteczkowy test immunoenzymatyczny (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) do oznaczania BNP wykonywany na platformie AxSYM; oraz chemiluminescencyjny test immunoenzymatyczny (Biosite, Inc., San Diego, CA) do oznaczania BNP wykonywany na następujących platformach firmy Beckman Coulter: Access, Access 2, Synchron LXI i UniCel DXI. Dostępny jest test
30 elektrochemiluminescencyjny (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) do oznaczania stężenia NT-proBNP.

Zakresy stężeń referencyjnych BNP i NTproBNP różnią się w zależności od wielu czynników. Stosowane są podane niżej zakresy, gdzie stężenia BNP oznaczane są metodą ELISA, a specjalista w danej dziedzinie będzie mógł ustalić, które stężenie uzyskane innymi metodami jest równoważne. Jeśli stężenie BNP wynosi >500 pg/ml, niewydolność serca jest bardzo prawdopodobna. Stężenia BNP
35 mieszczące się w zakresie 100-500 pg/ml często określa się jako „szara strefa”, w której rozpoznanie jest mniej pewne. Jeśli u osób szczupłych stężenie BNP wynosi <100 pg/ml, niewydolność serca jest mało prawdopodobna. Jednak otyłość wpływa na poziom ekspresji BNP w przewlekłej niewydolności serca (Mehra i in., J Am Coll Cardiol. 43(9):1590-1595 (2004)), zatem stężenie wynoszące < 100 pg/ml nie wyklucza niewydolności serca u osób otyłych (Silver i in., Cong. Heart Fail. 10(5 suppl. 3):1-30
40 (2004)).

Inne biomarkery

Opisano tu również metody oznaczania stężeń innych biomarkerów, np. jednego lub więcej spośród następujących biomarkerów: troponiny, izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB),

mioglobiny (Myo), albuminy modyfikowanej niedokrwieniem (IMA), interleukiny-6 (IL-6), białka C-reaktywnego (CRP), kreatyniny, D-dimerów, azotu mocznikowego (BUN), enzymów wątrobowych, albuminy i/lub endotoksyny bakteryjnej. Metody oznaczania stężeń tych biomarkerów są znane w danej dziedzinie, patrz np. amerykańskie patenty publikowane nr 2004/0048286 i 2005/0130136 na rzecz Lee i in.; Dhalla i in., Mol. Cell Biochem. 87:85-92 (1989); Moe i in., Am. Heart J. 139:587-95 (2000).

Zestawy

Opisano tu również zestawy zawierające odczynnik składający się z kompozycji wiążącej umożliwiającej wykrycie jednego lub większej liczby polipeptydów IL-33 lub ST2 albo kwasu nukleinowego, np. przeciwciała anty-IL-33 lub anty-ST2 (tj. przeciwciała lub jego fragment wiążący antygen, które wiąże się swoiście z IL-33 lub ST2), albo sondę kwasu nukleinowego stanowiącą uzupełnienie całości lub części kwasu nukleinowego IL-33 lub ST2), a także odczynnik składający się z kompozycji wiążącej umożliwiającej wykrycie jednego lub większej liczby biomarkerów CVD, np. biomarkera CVD w postaci polipeptydu lub kwasu nukleinowego kodującego biomarker CVD, oraz instrukcję stosowania w opisanej tu metodzie. Zestaw może także zawierać kontrolę, np. epitop IL-33 lub ST2 i biomarkera CVD.

Zestawy zasadniczo zawierają następujące główne elementy: opakowanie, odczynniki składające się z kompozycji wiążących opisanych powyżej, opcjonalnie kontrolę oraz instrukcję. Opakowaniem może być rodzaj pudełka na fiolkę (lub wiele fiolek) zawierającą rzeczony kompozycje wiążące, fiolka (lub wiele fiolek) zawierająca kontrolę i instrukcja użycia w opisanej tu metodzie. Specjaliści w danej dziedzinie mogą łatwo zmodyfikować opakowanie zgodnie z indywidualnym zapotrzebowaniem.

W jednym przykładzie zestaw może zawierać przeciwciała lub jego fragment wiążący antygen, które wiąże się swoiście z ST2 (lub IL-33) oraz przeciwciała lub jego fragment wiążący antygen, które wiąże się swoiście z biomarkerem CVD, np. BNP, proBNP, NT-proBNP, ANP, proANP lub NT-proANP.

Opisano również możliwość zastosowania innych metod wykrywania, np. metod kolorymetrycznych, testów radioimmunologicznych lub testów chemiluminescencyjnych. Można także zastosować metody „kanapkowe”, np. polegające na wykorzystaniu dwóch przeciwciał monoklonalnych, jednego znakowanego izotopem jodu I25 a drugiego adsorbowanego na kulkach, np. jak w zestawie IRMA-BNP2 firmy CISBIO International (Francja) i zestawach ShionoRIA BNP lub ANP (SHIONOGI USA Inc.).

Przykładowo, zestaw może być przeznaczony do stosowania w teście z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA), takim jak test ARCHITECT firmy Abbot Diagnostics (Abbott Park, IL), i w związku z tym może zawierać mikrocząsteczki paramagnetyczne opłaszczone przeciwciałami anty-BNP oraz mikrocząsteczki paramagnetyczne opłaszczone przeciwciałami anty-ST2. Te mikrocząsteczki kontaktują się z osoczem, a obecny w próbce BNP lub ST2 wiąże się z opłaszczonymi mikrocząsteczkami. Opcjonalnie, próbkę można podzielić na co najmniej dwie podwielokrotności, a mikrocząsteczki każdego rodzaju można skontaktować z poszczególnymi podwielokrotnościami. Po zakończeniu płukania można dodać koniugat anty-BNP i anty-ST2 znakowany akrydyną w celu uzyskania na drugim etapie mieszaniny reakcyjnej. Po kolejnym cyklu płukania do mieszaniny reakcyjnej dodaje się roztwory przedwyzwalające (pre-trigger) i wyzwalaające (trigger). Następnie mierzy się intensywność reakcji chemiluminescencyjną, np. przy użyciu układu optycznego analizatora ARCHITECT i System (Abbot Diagnostics, Abbott Park, Illinois). Istnieje bezpośrednia zależność między ilością BNP lub ST2 w próbce a wykrytą chemiluminescencją.

PRZYKŁADY

Przykład 1: Wykrywanie i oznaczanie stężenia ST2 w surowicy krwi

5 W tym przykładzie zastosowano zestaw ST2 ELISA Kit produkowany przez Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL International Corp., Woburn, MA), nr 7638. Zestaw ten jest zestawem do
testu kanapkowego ELISA, w którym do wychwytywania i detekcji wykorzystuje się przeciwciała
monoklonalne. Ta procedura służy do analizy całej płytki próbek oznaczanych w powtórzeniach przy
współczynniku rozcieńczenia 1:3 ściśle według protokołu producenta. Do czasu użycia zestaw należy
przechowywać w temperaturze 4°C. Procedura opisana w tym przykładzie została zoptymalizowana
10 pod kątem zastosowania próbek ludzkiej surowicy lub osocza pobieranych do probówek z
antykoagulantem cytrynianowym lub EDTA. W tym teście nie należy używać osocza pobieranego do
probówek z antykoagulantem heparynowym, ponieważ heparyna wiąże ST2 i utrudnia wykonywanie
oznaczeń według tego protokołu ELISA. Można wykorzystać próbki osocza lub surowicy świeże albo
przechowywane w stanie zamrożonym. Maksymalnie trzykrotne mrożenie i rozmrażanie próbek
osocza nie wpływa niekorzystnie na tę metodę analityczną.

15 Przed wykonaniem oznaczeń należy przygotować świeże odczynniki z nowego zestawu. Przed
użyciem należy pozostawić zestaw do ogrzania w temperaturze pokojowej. Odczynniki, które nie
zostały wyraźnie omówione poniżej dostarczane są przez producenta w postaci gotowej do użycia.

20 1. Roztwór płuczący - roztwór płuczący dostarczany jest przez producenta w stężeniu 10 x. Aby
otrzymać 1 litr roztworu płuczącego należy rozcieńczyć 100 ml koncentratu 10 x w 900 ml wody
destylowanej.

25 2. Roztwór wykrywający - roztwór wykrywający przygotowuje się rozcieńczając koncentrat
wykrywający w stosunku 1:101 w rozcieńczalniku roztworu wykrywającego. W przypadku
pełnej płytki zawierającej 96 studzienek potrzeba 10 ml roztworu wykrywającego. Aby
przygotować 10 ml roztworu wykrywającego należy pipetą przenieść 10 ml rozcieńczalnika
roztworu wykrywającego zabarwionego na niebiesko do probówki z polipropylenu z
pomarańczową zatyczką o pojemności 15 ml. Do tej objętości rozcieńczalnika roztworu
wykrywającego należy dodać 100 µl koncentratu roztworu wykrywającego.

a. UWAGA: odczynnik ten należy przygotować na pierwszym etapie inkubacji.

30 3. Zapas kalibratora - należy odtworzyć kalibrator białkowy rozpuszczając liofilizowane białko
w takiej ilości wody destylowanej, jaka określił producent dla tej serii produktu, aby otrzymać
roztwór o stężeniu 8 ng/ml. Tę objętość roztworu podano w ulotce dołączonej do opakowania
produktu.

Przygotowanie wzorców i próbek:

- 35 • Opisane niżej czynności należy wykonać, używając oznakowanych probówek z
polipropylenu o pojemności 1.5 ml, a otrzymany produkt należy przenieść na płytkę
analityczną za pomocą pipety P200.

Wzorce:

40 Krzywą wzorcową sporządza się przygotowując serię dwukrotnych rozcieńczeń zapasu
roztworu wyjściowego o stężeniu 8 ng/ml.

1. Pipetą P1000 przenieść 250 µl rozpuszczalnika analitycznego do 8 probówek z polipropylenu o pojemności 1.5 ml oznakowanych jako S1-S8.

2. Tą samą pipetą P1000 przenieść 250 µl roztwór kalibratora o stężeniu 8 ng/ml do probówki S1. Probówka ta zawiera teraz kalibrator białkowy o stężeniu 4 ng/ml.

5 a. Dokładnie wymieszać zawartość delikatnie pipetując ją 3 razy i starając się nie wytworzyć piany.

3. Powtórzyć mieszanie używając tej samej pipety P1000 i świeżej końcówki podczas każdego następnego przeniesienia 250 µl odczynnika z probówki S1 do probówki S2.

10 4. Powtórzyć etap 3 przenosząc roztwór z S2 do S3, z S3 do S4, z S4 do S5, z S5 do S6 i z S6 do S7. S8 będzie zawierać odczynnik do próby zerowej, zatem nie należy przenosić kalibratora białkowego do tej studzienki.

a. Teraz probówki S1-S6 i S8 zawierają 250 µl odczynnika, a probówka S7 zawiera 450 µl.

Próbki:

15 Płytką została skonfigurowana w taki sposób, że każda próbka jest analizowana w rozcieńczeniu 1:3 w dwóch egzemplarzach.

1. Dla każdej próbki oznakować probówkę z polipropylenu o pojemności 1.5 ml.

2. Pipetą P200 przenieść do każdej probówki 160 µl rozpuszczalnika analitycznego.

20 3. Pipetą P200 przenieść 80 µl surowicy lub osocza z próbki 1 do probówki 1. Starannie wymieszać pipetując 3 razy tak, by nie wytworzyć piany.

4. Przenosić próbki do probówek powtarzając etap 2 dla każdej próbki.

Procedura:

1. Pipetą P200 szybko przenieść roztwory wzorcowe i rozcieńczone próbki surowicy na płytkę analityczną zawierającą 96 studzienek. Przykładowy rozkład przedstawiono w Tabeli 2 poniżej.

25 a. Ustawić pipetę P200 na pojemność 100 µl.

b. Przenieść 100 µl rozcieńczeń krzywej wzorcowej do każdej z kolumn 1 i 2 na płytce analitycznej.

c. Przenieść 100 µl każdej z próbek surowicy na płytkę analityczną dokładnie w te same miejsca, jakie pokazano poniżej na rozkładzie płytki.

30 2. Przykryć płytkę analityczną osłoną dołączoną do zestawu i inkubować w temperaturze pokojowej przez 60 minut.

3. Przepłukać płytkę 4 razy w automatycznej myjce.

4. Roztwór wykrywający: za pomocą pipety 8-kanalowej przenieść 100 µl roztworu wykrywającego do każdej studzienki i inkubować w temperaturze pokojowej przez 60 minut.

35 a. UWAGA: odczynnik ten należało przygotować na pierwszym etapie inkubacji.

b. UWAGA: odczynnik ten należy dodawać używając jednorazowego naczynia na odczynniki.

Dla każdego odczynnika ZAWSZE należy używać świeżego jednorazowego naczynia na odczynniki. Na tym etapie nie jest konieczna zmiana końcówek pipety.

5 5. Przepłukać płytkę, jak na etapie 3.

6. Substrat: za pomocą 8-kanałowej pipety przenieść 100 µl substratu do każdej studzienki i inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

a. Substrat jest dostarczany przez producenta w postaci gotowej do użycia.

10 7. Roztwór hamujący: po zakończeniu inkubacji substratu za pomocą 8-kanałowej pipety przenieść 100 µl roztworu hamującego do każdej studzienki.

a. Roztwór hamujący jest dostarczany przez producenta w postaci gotowej do użycia.

8. Wykonać odczyt przy długości fali 450 nm z poprawką na tło 620 nm.

a. Płytkę należy odczytać w ciągu 30 minut po zatrzymaniu reakcji.

9. Wyniki pomiaru absorbancji należy wpisać w arkuszu obliczeniowym dla analizy.

15 **Tabela 2: Rozkład przykładowej płytki analitycznej zawierającej 96 studzienek**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4.0		1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	2.0		2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	1.0		3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	0.5		4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	0.25		5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	0.125		6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	0.0625		7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	0.0		8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

Przykład 2: Wykrywanie i oznaczanie stężenia IL-33 w surowicy krwi

20 Od osobnika pobierana jest próbka krwi, a następnie standardowymi metodami z próbki otrzymywana jest surowica. Do próbki dodaje się znakowane przeciwciało monoklonalne dla IL-33 (np. takie, jakie opisano w amerykańskim publikowanym zgłoszeniu patentowym nr 2005/020304) i inkubuje w okresie umożliwiającym wystąpienie reakcji wiązania. Następnie kompleksy przeciwciała/IL-33 wykrywa się standardowymi metodami i mierzy ilość obecnej IL-33. Zgodnie z tym, co opisano w niniejszym dokumencie przewiduje się, że stężenie IL-33 będzie korelowało z chorobą w sposób podobny, jak stężenie ST2.

Przykład 3: POChP a stężenie ST2

25 U uczestników badania PRIDE oceniano wpływ przebiegu POChP na stężenie ST2 u osobnika z ostrą niewydolnością serca lub bez ostrej niewydolności serca.

30 Do badania PRIDE rekrutowano 600 osób z dusznością w celu sprawdzenia przydatności NT-proBNP w diagnostyce i ustaleniu rokowania u osób z ostrą niewydolnością serca. W momencie rekrutacji metodą ślepą pobierano próbkę krwi, poddawano obróbce i zamrażano w temperaturze

-80°C. Do analizy ST2 rozmrażano podwielokrotność próbki krwi z cytrynianem (drugi cykl zamrażania-rozmrażania) i oznaczano w niej stężenie białka ST2 w sposób opisany w Przykładzie 1.

5 Wyniki przedstawiono na Fig. 1-2. Wykazano, że podwyższone stężenie ST2 w surowicy krwi (np. powyżej 0.2 ng/ml w przypadku oznaczania w sposób opisany w Przykładzie 1) można wykorzystać do prognozowania prawdopodobieństwa obecności choroby układu oddechowego, np. u osobników bez ostrej zdekompensowanej niewydolności serca, np. z niskim lub umiarkowanym stężeniem BNP.

Przykład 4: Podwyższone stężenie ST2 u pacjentów bez niewydolności serca

10 Stężenie ST2 oznaczano w sposób opisany w Przykładzie 1 powyżej w grupie 350 pacjentów, którzy zgłosili się do oddziału pomocy doraźnej z bólem w klatce piersiowej. Od większości pacjentów pobierano próbki surowicy i oznaczano stężenie ST2 w punkcie wyjścia, po 90 minutach i po 180 minutach. U większości pacjentów pobrano także próbkę wyjściową w okresie 2 godzin po wystąpieniu objawów.

15 U 17 pacjentów ostatecznie rozpoznano zawał mięśnia sercowego, a u 5 z nich stężenie ST2 wynosiło ≥ 0.23 (0.25 - 0.65). U dwóch spośród tych pacjentów wynik oznaczania stężenia troponiny był ujemny. U 11 pacjentów stężenie ST2 było bardzo wysokie (0.97 - 9.22), ale u żadnego z nich nie potwierdzono ostatecznie zawału mięśnia sercowego i u żadnego nie wykazano oznaczalnego stężenia troponiny, chociaż u wszystkich stwierdzono poważne choroby, w tym POChP, chłoniaka, posocznicę, nadużywanie alkoholu i zatorowość płucną. Stężenia ST2 i rozpoznania ustalone u tych 11 pacjentów podano w Tabeli 3; ST2 1 to stężenie wyjściowe, ST2 2 to stężenie oznaczone 90 minut później, a ST2 20 3 to stężenie oznaczone po 180 minutach.

Tabela 3: Pacjenci bez zawału mięśnia sercowego z wysokim stężeniem ST2

Pacjent	ST2 1 (punkt wyjścia) (ng/ml)	ST2 2 (po 90 min.) (ng/ml)	ST2 3 (po 180 min.) (ng/ml)	Ostateczne rozpoznanie
811	1.43	1.62	1.63	POChP z niewydolnością serca po operacji pomostowania tętnic wieńcowych oraz nadciśnienie płucne
847	2.37	4.44	3.53	Zatorowość płucna
873	2.36	2.42	2.74	Reaktywna choroba dróg oddechowych (RAD)
898	1.32	1.24	1.66	Operacja pomostowania tętnic wieńcowych po rozpoznanej w przeszłości niewydolności serca
920	6.03	9.22		Bakteriemia w przebiegu posocznicy
928	3.80	4.69	3.99	Nadciśnienie i nadużywanie alkoholu
952	6.76			Nadużywanie alkoholu, niezżyt błony śluzowej żołądka i nadciśnienie płucne
953	3.77			Operacja pomostowania tętnic wieńcowych po rozpoznanej w przeszłości niewydolności serca
1055	1.42	1.28	1.13	Infekcja górnych dróg oddechowych
1213	0.97	1.19	1.07	Zatorowość płucna i zapalenie osierdzia
1245	4.11	6.46		oraz nadciśnienie
1280	1.30	1.33		POChP

Na podstawie tych wyników wykazano, że podwyższenie stężenia ST2 (np. powyżej 0.2 ng/ml) u pacjentów z bólem w klatce piersiowej i ujemnym wynikiem oznaczania poziomu troponiny wiąże się z dużym prawdopodobieństwem występowania choroby układu oddechowego.

5

Pełnomocnik:

KANCELARIA PRAWNO-PATENTOWA
"BELLEPAT"
Izabela Szychulska-Hawranek
ul. Słowackiego 44, 37-700 Przemysł
tel. (016) 732-37-77 fax: (016) 675-12-87
tel. kom. (0608) 503-081 e-mail: bellepat@op.pl
NIP: 795-207-16-72 REGON: 180350516

RZECZNIK PATENTOWY
mgr Izabela Szychulska-Hawranek
nr wpisu 3192

Zastrzeżenia patentowe

1. Metoda rozpoznawania różnicowego in vitro chorób układu sercowo-naczyniowego (CVD) i chorób układu oddechowego (PD) u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością polegająca na:
 - 5 oznaczeniu stężenia rozpuszczalnego ST2 (receptora typu 1 interleukiny 1 [IL1RL1]) w próbce pobranej od danego osobnika;
 - oznaczeniu stężenia mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP) w próbce; oraz
 - porównaniu stężenia rozpuszczalnego ST2 z referencyjnym stężeniem ST2 u osobnika bez CVD i PD, u których prawdopodobieństwo wystąpienia PD lub CVD jest wysokie lub u osobnika z CVD i/lub PD;
 - 10 porównaniu stężenia BNP w próbce ze niskim progiem stężenia BNP wynoszącym 100 pg/ml i z wysokim progiem stężenia BNP wynoszącym 500 pg/ml; oraz
 - rozpoznananiu CVD u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością, u którego stężenie rozpuszczalnego ST2 jest niższe od wartości referencyjnej, a stężenie BNP wynosi co najmniej
 - 15 100 pg/ml;
 - rozpoznananiu PD u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością, u którego stężenie rozpuszczalnego ST2 jest co najmniej równe wartości referencyjnej, a stężenie BNP wynosi najwyżej 500 pg/ml; albo
 - rozpoznananiu CVD u osobnika z bólem w klatce piersiowej lub dusznością, u którego stężenie rozpuszczalnego ST2 jest co najmniej równe wartości referencyjnej, a stężenie BNP przekracza
 - 20 500 pg/ml;
 - przy czym próbka jest próbką krwi, surowicy lub osocza.
2. Metoda według zastrz. 1, w której oznaczenie stężenia rozpuszczalnego ST2 lub stężenia BNP w próbce polega na kontakcie kompozycji wiążącej z próbką, gdzie kompozycja wiążąca swoiście
- 25 wiąże się z rozpuszczalnym ST2 lub z BNP, oraz zmierzeniu lub oznaczeniu zakresu swoistego wiązania kompozycji wiążącej z próbką.
3. Metoda według zastrz. 2, w której kompozycja wiążąca zawiera przeciwciało wiążące się swoiście z rozpuszczalnym ST2 lub z BNP.
4. Metoda według zastrz. 1, w której choroba układu sercowo-naczyniowego (CVD) to ostry zespół
- 30 wieńcowy, zawał mięśnia sercowego, niewydolność serca, dławica piersiowa, przerost mięśnia sercowego, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie osierdzia, zapalenie wsierdzia lub udar mózgu.
5. Metoda według zastrz. 1, w której choroba układu oddechowego to przewlekła obturacyjna
- 35 choroba płuc (POChP), astma, zapalenie płuc, odma opłucnowa, wysięk w opłucnej, zmiana przerzutowa, obrzęk płuc, choroba refluksowa żołądka i przełyku z aspiracją treści żołądkowej, zatorowość płucna lub restrykcyjna choroba płuc.
6. Metoda według zastrz. 1 albo 2 dodatkowo obejmująca oznaczenie stężenia jednego lub większej
- 40 liczby innych biomarkerów w próbce.

7. Metoda według zastrz. 6, w której jedną lub większą liczbę innych biomarkerów wybrano z grupy składającej się z: izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB), białka C-reaktywnego (CRP), kreatyniny i D-dimerów.

5

Pełnomocnik:

KANCELARIA PRAWNO-PATENTOWA
"BELLEPAT"
Izabela Szychulska-Hawranek
ul. Słowackiego 44, 37-700 Przewrżniśł
tel. (016) 732-37-77 fax: (016) 375-12-87
tel. kom. (0608) 503-081 e-mail: bellepat@op.pl
NIP: 795-207-16-72 REGON: 1803505: 6

RZECZNIK PATENTOWY
mgr Izabela Szychulska-Hawranek
nr wpisu 3192

Figura 1

Statystyka

		ST2 nieHF Nie COPD	ST2 nie HF COPD	st2 nie HF	ST2 HF nie COPD	ST2 HF COPD	ST2 CHF
N	Ważny	224	161	385	155	53	208
	Brak	375	438	214	444	548	391
Mediana		.1220	.2305	.1448	.4944	.5532	.5033
Procenty	25	.0502	.0823	.0622	.2303	.2819	.2671
	75	.2232	.6555	.4227	1.1287	1.9560	1.2254

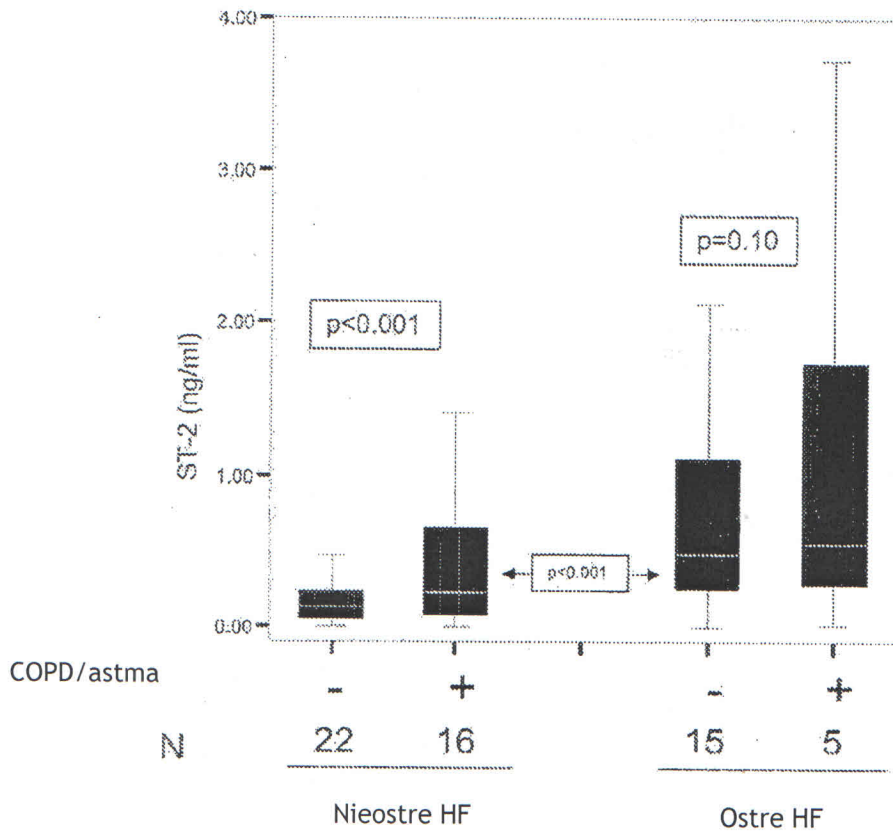
P<0.001
P=0.10
P<0.001

Pełnomocnik:

**KANCELARIA PRAWNO-PATENTOWA
"BELLEPAT"**
Izabela Szychulska-Hawranek
 ul. Słowackiego 44, 37-700 Przemyśl
 tel. (016) 732-37-77 fax: (016) 675-02-87
 tel. kom. (0608) 503-081 e-mail: bellepat@op.pl
 NIP: 795-207-16-72 REGON: 180350536

RZECZNIK PATENTOWY
mgr Izabela Szychulska-Hawranek
 nr wpisu 3192

Figura 2



Pełnomocnik:

**KANCELARIA PRAWNO-PATENTOWA
"BELLEPAT"**

Izabela Szychulska-Hawranek
ul. Słowackiego 44, 37-700 Przemyśl
tel. (016) 732-37-77 fax: (016) 675-02-87
tel. kom. (0608) 503-081 e-mail: bellepat@op.pl
NIP: 795-207-16-72 REGON: 180360018

RZECZNIK PATENTOWY

mgr Izabela Szychulska-Hawranek
nr wpisu 3192