

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 818**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2013 PCT/EP2013/052743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120830**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2013 E 13703603 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2815240**

54 Título: **Uso de la forma soluble de AXL en el diagnóstico y/o pronóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

**13.02.2012 EP 12382048**

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

**03.02.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÉDIQUES  
AUGUST PI I SUNYER (IDIBAPS) (50.0%)  
C/ Rosselló, 149-153  
08036 Barcelona, ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BATLLE PERALES, MONTSERRAT y  
GARCÍA DE FRUTOS, PABLO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 599 818 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

Uso de la forma soluble de AXL en el diagnóstico y/o pronóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca

- 5 La presente invención generalmente se refiere a ensayos de diagnóstico y pronóstico. Particularmente, la presente invención se refiere a la identificación y el uso de sAXL como un biomarcador que se expresa de manera diferencial en pacientes que padecen de síndrome de insuficiencia cardíaca.

10 **Técnica anterior**

El síndrome de insuficiencia cardíaca (a continuación en el presente documento también denominada "IC") puede resultar de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que afecta a la capacidad del ventrículo a llenarse con o expulsar sangre. La IC constituye la fase terminal de muchas cardiopatías y se caracteriza por una disfunción ventricular.

15 En 2008, las pautas de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) para la IC (Dickstein K *et al.*, 2008) indicaron que la prevalencia de la IC está entre el 2-3% y aumenta bruscamente a los 75 años de edad, estando la prevalencia en personas de 70-80 años entre el 10-20%. La prevalencia global de la IC aumenta debido al envejecimiento de la población, el éxito prolongando la supervivencia en pacientes que padecen episodios coronarios y el éxito posponiendo episodios coronarios mediante prevención eficaz. La IC es la causa del 5% de los ingresos hospitalarios agudos, es la causa del 10% de pacientes en camas de hospital y representa aproximadamente el 2% del coste nacional en sanidad, mayormente debido al coste de los ingresos hospitalarios.

20 Se emplean dos clasificaciones de la gravedad de la IC (Dickstein K *et al.*, 2008):

25 a) La clasificación según la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA), que se basa en los síntomas y la capacidad funcional. Se ha demostrado que esta clasificación es clínicamente útil y se usa en la mayoría de ensayos clínicos. Clasifica a los pacientes en cuatro clases diferentes:

30 Clase I, sin limitación de la actividad física. La actividad física habitual no causa excesiva fatiga, palpitación o disnea.

35 Clase II, ligera limitación de la actividad física. Cómodo en reposo, pero la actividad física habitual tiene como resultado fatiga, palpitación o disnea.

Clase III, marcada limitación de la actividad física. Cómodo en reposo, pero la actividad física inferior a la habitual tiene como resultado fatiga, palpitación o disnea.

40 Clase IV, incapaz de llevar a cabo cualquier actividad física sin molestia. Síntomas en reposo. Si se realiza cualquier tipo de actividad física, aumenta la molestia.

45 b) El Colegio Americano de Cardiología / Asociación Americana del Corazón (a continuación en el presente documento también denominado "ACC/AHA") (Jessup M. *et al.*, 2009), que se basa en los cambios estructurales y síntomas de la IC.

El diagnóstico de la IC es complejo y requiere un examen clínico, un electrocardiograma, una radiografía de tórax y una ecocardiografía. Se emplean varias pruebas de diagnóstico de manera rutinaria para confirmar la IC pero son más sensibles para la detección de pacientes con fracción de expulsión reducida que para pacientes con fracción de expulsión conservada (Dickstein K *et al.*, 2008).

50 La solicitud de patente internacional WO 2008/060871 A1 divulga el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca usando tirosina quinasas como biomarcador.

55 EKMAN C *ET AL.*, CLINICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC, US, CA, vol. 43, nº 10-11, 1 de julio de 2010, páginas 873-876 divulga que Axl y su ligando Gas6 están implicados en y sirven como biomarcadores para isquemia crítica de extremidades. Además, se conoce de este documento que la expresión de Gas6 está implicada en insuficiencia cardíaca congestiva.

60 Con respecto a esto, péptidos natriuréticos, péptido natriurético de tipo B (BNP) y N-terminal pro-BNP (NT-proBNP) se han propuesto como herramientas de diagnóstico de la IC, dado que niveles elevados de los mismos dan soporte a un diagnóstico de función ventricular o hemodinámica anómala causando la IC sintomática. No deben usarse niveles elevados de péptidos natriuréticos en aislamiento para confirmar o excluir la presencia de IC. Pueden dar peso a un diagnóstico sospechoso de IC o desencadenar la consideración de IC cuando se desconoce el diagnóstico (Jessup M. *et al.*, 2004).

65 Las desventajas principales de usar péptidos natriuréticos como herramientas para el diagnóstico de la IC es su

labilidad a temperatura ambiente y el coste de su medición (Tang W. H. *et al.*, 2009). Una vez que se extrae la sangre del paciente, debe establecerse un ciclo frío para la conservación de BNP o NT-proBNP. Las muestras deben recogerse en tubos helados y procesarse rápidamente para evitar la degradación *in vitro*. Estos problemas hacen que la medición de sus niveles sea un procedimiento engorroso no disponible en muchas prácticas clínicas. Todos estos obstáculos hacen que sea interesante idear nuevos métodos para ayudar a diagnosticar y categorizar la IC.

A pesar de los esfuerzos realizados, por tanto, todavía existe la necesidad de herramientas adicionales de diagnóstico de la IC.

## Sumario de la invención

Los inventores han revelado que la forma soluble de AXL (a continuación en el presente documento también denominada "sAXL") representa un biomarcador recientemente realizado particularmente ventajoso para predecir, diagnosticar y/o pronosticar el síndrome de insuficiencia cardíaca (IC).

En particular, los presentes inventores han encontrado que la forma soluble de la proteína AXL (a continuación en el presente documento también denominada "sAXL") se encuentra en niveles altos en el suero de pacientes con IC en comparación con los niveles detectados en el suero de sujetos sin IC (véase la figura 1).

Además, los inventores han encontrado que la cantidad de sAXL aumenta con las clases funcionales según la NYHA, siendo la diferencia entre clases funcionales estadísticamente significativa (véase la figura 2). Esto es indicativo de que sAXL proporciona información útil de pronóstico: cuanto mayor sea el nivel de sAXL más grave será el síndrome de IC.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar y/o pronosticar un síndrome de insuficiencia cardíaca (IC), comprendiendo dicho método la etapa de medir, *in vitro*, la cantidad de la forma soluble de AXL (sAXL) en una muestra de prueba.

Tal como se declara anteriormente, se usan péptidos natriuréticos en el estado de la técnica para determinar síndrome de IC. Dichos péptidos son inestables y, si no se realiza un procesamiento adecuado de la muestra tomada del sujeto, se degrada el péptido, siendo imposible su detección. Como una consecuencia de su degradación, la no detección de dichos péptidos en una muestra de prueba da origen a falsas determinaciones de IC negativas, con serias implicaciones para el paciente que padece el síndrome.

Sorprendentemente, y al contrario que los péptidos natriuréticos, sAXL es estable en suero. Esto confiere dos ventajas importantes al método del primer aspecto de la invención cuando se compara con el uso de péptidos natriuréticos. La primera es que no se necesita conservación en frío para el procesamiento de la muestra; siendo más simple la etapa de detección del método de la invención. La segunda es que usando el método del primer aspecto de la invención puede haber una reducción de las falsas determinaciones negativas asociadas con el uso de péptidos natriuréticos como biomarcadores, dado que no se produce degradación de sAXL.

Además, se ha encontrado que la diferencia en el perfil de expresión de sAXL entre sujetos de control y sujetos que padecen de IC es tan notable que un doctor experto, con medios adecuados, tendría una nueva herramienta para ayudar en el diagnóstico del síndrome, con las ventajas resultantes para diseñar un tratamiento adecuado.

Además, el hecho de que la cantidad de sAXL medida en la muestra de prueba se compare con una muestra de control da información acerca del pronóstico del síndrome: cuanto mayor sea el valor de sAXL de un paciente en comparación con el límite superior de intervalo de referencia de sAXL, peor será el pronóstico.

El método objeto del primer aspecto de la invención puede ser útil en descartar y aceptar IC en un entorno agudo con pacientes sin tratar; y estratificando la población, entre otros.

Además, el método de la presente invención es útil en diagnosticar y/o pronosticar IC asociada con otras enfermedades cardiovasculares previas tales como fibrilación auricular o infarto de miocardio agudo.

De los datos experimentales incluidos en la presente solicitud, también puede concluirse que sAXL puede usarse como marcador para determinar el riesgo de desarrollar IC realizando las siguientes etapas:

a) determinar, *in vitro*, la cantidad de sAXL en una muestra de prueba del sujeto; siendo el sujeto una persona sin síndrome de insuficiencia cardíaca pero sospechoso de que puede desarrollarla en el futuro; y

b) determinar si la cantidad de sAXL determinada en la etapa (a) se encuentra dentro de un intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC,

en el que, si la cantidad de sAXL en la muestra de prueba está cerca del límite superior del intervalo de referencia

de sAXL, pero sin superar el valor superior de dicho intervalo, es indicativo de que el paciente tiene riesgo de desarrollar IC.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para decidir o recomendar si iniciar un régimen médico de un sujeto que se sospecha que padece un síndrome de insuficiencia cardíaca, cuyo método comprende las etapas de:

a) determinar, *in vitro*, la cantidad de sAXL en una muestra de prueba del sujeto; y

10 b) diagnosticar el síndrome de insuficiencia cardíaca si la cantidad de sAXL en la muestra de prueba es mayor que el límite superior del intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC, tal como se define en el método del primer aspecto de la invención;

en el que:

15 i) si se diagnostica que el sujeto padece un síndrome de insuficiencia cardíaca, entonces se recomienda el inicio del régimen médico, y

20 ii) si se diagnostica que el paciente no padece el síndrome de insuficiencia cardíaca, se realiza el seguimiento de la función cardíaca, opcionalmente en consideración del resultado de un examen del paciente por un cardiólogo.

Determinando el nivel de sAXL en una muestra de prueba, el experto puede establecer, adicionalmente, cuál es la terapia más adecuada que puede recomendarse, dado que el nivel detectado en la muestra puede reflejar la extensión (es decir, gravedad) del síndrome.

25 Además, una vez que se ha decidido iniciar el régimen médico ya que el sujeto padece síndrome de IC (siguiendo el método definido en el segundo aspecto de la invención), puede monitorizarse cómo de eficaz es el régimen: un descenso o retorno a un nivel normal de sAXL (es decir, al nivel dentro del intervalo de referencia de concentración de sAXL) puede indicar que el paciente con IC ha reaccionado de manera favorable al régimen médico y, por tanto, dicho régimen es eficaz; si el nivel de sAXL no cambia significativamente o aumenta, esto puede indicar que el régimen médico no es eficaz. Finalmente, el nivel de sAXL puede medirse al final del tratamiento como parte de los cuidados de monitorización para controlar recaídas.

35 Por tanto, en un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente que ya tiene diagnóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca, comprendiendo el método las etapas de:

(a) medir la cantidad de sAXL *in vitro* en una muestra del paciente antes de iniciar el régimen médico;

40 (b) medir la cantidad de sAXL *in vitro* en una muestra del paciente una vez comenzado el régimen médico; y

(c) comparar las cantidades medidas en las etapas (a) y (b), de tal modo que si la cantidad de sAXL medida en la etapa (b) es menor que la cantidad de sAXL medida en la etapa (a), es indicativo de que el régimen médico es eficaz en el tratamiento de la IC;

45 o, alternativamente, comprendiendo el método las etapas de:

(i) medir la cantidad de sAXL *in vitro* en una muestra del paciente una vez iniciado el régimen médico; y

50 (ii) determinar si la cantidad medida en la etapa (i) se encuentra dentro de un intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC,

en el que, si la cantidad de sAXL medida en la etapa (i) se encuentra dentro del intervalo de referencia de concentración de sAXL, es indicativo de que el régimen médico es eficaz en el tratamiento de IC.

55 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de sAXL como un marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca.

60 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de medios para detectar la presencia de sAXL en una muestra aislada para el diagnóstico y/o pronóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca en cualquiera de los métodos definidos anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 es una representación de barras que muestra los niveles de sAXL en suero de controles y pacientes con IC. Particularmente, cada barra representa el valor medio de concentración de sAXL y las barras de error  $\pm 2X$  error

estándar. Eje Y: sAXL= nivel de sAXL medio en suero (ng/ml); eje X: C= suero de sujetos que no tienen IC seleccionados para establecer el intervalo de referencia, IC= suero de pacientes con IC.

La figura 2 es una representación de barras que muestra los niveles de sAXL en suero de pacientes con IC (n=149) que pertenecen a las clases funcionales I-IV según la NYHA. Particularmente, cada barra representa el valor de concentración de sAXL medio y las barras de error  $\pm 2X$  error estándar. Eje Y: sAXL= nivel de sAXL medio en suero (ng/ml); eje X: I= pacientes que padecen de clase funcional I según la NYHA, II= pacientes que padecen de clase funcional II según la NYHA, III= pacientes que padecen de clase funcional III según la NYHA, y IV= pacientes que padecen de clase funcional IV según la NYHA.

La figura 3 muestra los niveles en circulación de sAXL y BNP en muestras de pacientes con IC, n=156. Eje Y: sAXL= nivel de sAXL en suero (ng/ml); eje X: BNP= nivel de BNP en plasma (pg/ml).

### Descripción detallada de la invención

Tal como se declara anteriormente, la presente invención proporciona un método para diagnosticar y pronosticar un síndrome de insuficiencia cardíaca, basándose dicho método en la medición de la cantidad de sAXL.

AXL pertenece a la familia de tirosina quinasas receptoras (RTK). Las RTK son proteínas de membrana que reconocen señales extracelulares que conducen a respuestas celulares como proliferación, detención o activación. La secuencia de AXL está disponible en varias bases de datos, tales como las bases de datos del NCBI (NP\_068713.2) y Uniprot (número de registro de base de datos: P30530; versión de base de datos: 133).

En la presente invención los términos “forma soluble de AXL” y “sAXL” tienen el mismo significado y son intercambiables. La forma soluble de AXL es el dominio extracelular de AXL, que se ubica entre los residuos aminoácidos 26 a 451 de secuencia proteica de AXL. Particularmente, sAXL corresponde a N° ID SEC: 1:

N° ID SEC: 1

```

30 APRGT QAEESPFVGN PGNITGARGL TGTLRCQLQV QGEPPEVHWL RDGQILELAD STQTQVPLGE
DEQDDWIVVS QLRITSLQLS DTGQYQCLVF LGHQTFVSQP GYVGLEGLPY FLEEPEDRTV AANTPFNLSC
QAQGPPEPVD LLWLQDAVPL ATAPGHGPQR SLHVPGLNKT SSFSCEAHNA KGVTTTSTAT ITVLPQQPRN
LHLVSRQPTLE LEVAWTPGLS GIYPLTHCTL QAVLSNDGMG IQAGEPDPE EPLTSQASVP PHQLRLGSLH
35 PHTPYHIRVA CTSSQGPSSW THWLPVETPE GVPLGPPENI SATRNGSQAF VHWQEPRAPL QGTTLLGYRLA
YQQGDTPEVL MDIGLRQEV LELQGDGSVS NLTVCVAAAYT AAGDGPWVSLP VPLEAWRPGQ AQPVHQLVKE
PSTPAFVSWPW W
    
```

El término “insuficiencia cardíaca” debe entenderse como un síndrome en el que los pacientes tienen las siguientes características (Dickstein K *et al.*, 2008): (a) síntomas tales como falta de aliento en reposo o durante un esfuerzo, y/o fatiga; (b) signos de retención de líquidos tal como congestión pulmonar o hinchazón de tobillos; y (c) prueba objetiva de una anomalía de la estructura o función del corazón en reposo.

El síndrome de IC puede resultar de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que afecte a la capacidad del ventrículo a llenarse con o expulsar sangre (Hunt S. A. *et al.*, 2005) y constituye la fase terminal de muchas cardiopatías y se caracteriza por una disfunción ventricular. Las causas más comunes de IC son isquemia aguda o crónica, hipertensión, taquiarritmias, síndrome valvular y miocardiopatías (tal como miocarditis que genera arritmias en el ventrículo derecho, restrictiva, dilatada, hipertrófica, entre otros). La IC también puede inducirse por daño miocárdico por fármacos, toxinas, trastornos nutricionales o endocrinos y causa de infiltración tal como sarcoidosis, amiloidosis, entre otros. Otras causas de IC pueden ser enfermedad de Chagas, infección por VIH, miocardiopatía de periparto e insuficiencia renal terminal (Dickstein K *et al.*, 2008).

En la presente invención el “intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC” debe entenderse como el intervalo de referencia de control con el fin de realizar cualquiera de los métodos objeto de la presente invención. Los sujetos (controles) seleccionados para determinar el intervalo de referencia de concentración de sAXL se eligen basándose en el requisito de que los sujetos de este tipo no tienen IC. Con el fin de determinar el intervalo de concentración de sAXL se determina el nivel de sAXL en una muestra tomada de cada sujeto (siendo la muestra suero o plasma) y con los resultados obtenidos se calcula estadísticamente el límite de confianza del 95% del grupo de referencia.

La “muestra de prueba” se refiere a una muestra obtenida con el propósito de diagnosticar y pronosticar. En determinadas realizaciones una muestra de este tipo puede obtenerse con el propósito de determinar el desenlace de un estado en curso o para determinar si debe aplicarse un régimen médico a un sujeto. Preferiblemente, la muestra de prueba se selecciona del grupo constituido por: suero, plasma. Más preferiblemente, la muestra de prueba es suero.

El experto en la técnica conoce el término “diagnóstico”. Diagnosticar se entiende como tomar conciencia de un

estado médico particular, síndrome, complicación o riesgo.

El término “sujeto” usado en el presente documento y según la presente invención se refiere a un individuo sano, un individuo aparentemente sano, o un individuo que padece un síndrome (paciente). El sujeto puede ser un individuo tanto masculino como femenino; particularmente el paciente padece IC.

En la presente invención, la expresión “régimen médico” debe entenderse como que abarca tanto terapias farmacológicas (tales como inhibidores de la ECA, betabloqueantes, bloqueantes de receptor de angiotensina, antagonistas de aldosterona y digoxina, entre otros) así como otras decisiones clínicas tomadas por el cardiólogo encargado de, por ejemplo, decisiones de hospitalización o alta, o hábitos alimenticios o sociales indicados por el doctor tales como ingesta de sal o actividad física.

En la presente invención, la expresión “opcionalmente en consideración del resultado de un examen del paciente por un cardiólogo” en lo que respecta al método del segundo aspecto de la invención, abarca cualquier prueba de examen clínico útil para proporcionar pruebas de insuficiencia cardíaca, tal como electrocardiografía, ecocardiografía y radiografía de tórax, entre otros.

En una realización preferida del primer aspecto, el método comprende las etapas de:

(a) medir, *in vitro*, la cantidad de sAXL en la muestra de prueba; y

(b) determinar si la cantidad determinada en la etapa (a) se encuentra dentro de un intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC,

en el que, si la cantidad de sAXL en la muestra de prueba es mayor que el límite superior del intervalo de referencia de sAXL, es indicativo de que el paciente padece o tiene un mal pronóstico de síndrome de IC.

En una realización preferida del método de los aspectos primero, segundo y tercero de la invención se determina la cantidad de proteína sAXL presente en la muestra.

Con el fin de llevar a cabo la detección de proteína puede usarse un anticuerpo o un fragmento del mismo con la capacidad de unirse a sAXL.

En la presente invención, el término “anticuerpo o un fragmento del mismo con la capacidad de unirse a sAXL” debe entenderse como cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma capaz de unirse al antígeno definido por sAXL. Incluye anticuerpos monoclonales y policlonales. El término “fragmento del mismo” abarca cualquier parte de un anticuerpo que tiene el tamaño y la conformación adecuados para unirse a un epítipo de sAXL. Los fragmentos adecuados incluyen F(ab), F(ab') y Fv. Un “epítipo” es la parte del antígeno que se reconoce por el sistema inmunitario (células B, células T o anticuerpos). Anticuerpos adecuados pueden ser los mencionados en el ejemplo a continuación, tales como AF154 (R&D systems), que se deriva de una AXL Glu33Pro440 recombinante humana derivada de línea celular de mieloma de ratón NS0 (nº de registro AAA61243); y PAB2998 (Abnova).

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo para detectar sAXL se incluye en un kit. El kit puede comprender adicionalmente medios (aditivos, disolventes) para visualizar las interacciones antígeno-anticuerpo (tiras reactivas, reactivos quimioluminiscentes, reactivos turbidimétricos, etc.). Se divulgan en los ejemplos aditivos, disolventes y reactivos adecuados para visualizar la interacción antígeno-anticuerpo.

En otra realización preferida, los métodos de los aspectos primero, segundo y tercero de la invención son métodos de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de competición. En esta realización la medición *in vitro* de la cantidad de sAXL (o bien en el grupo de sujetos usado para determinar el intervalo de referencia de concentración de sAXL o bien la muestra de prueba) se realiza usando un anticuerpo de captura frente a sAXL, preferiblemente un anticuerpo de captura policlonal frente a sAXL.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprender” y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, reactivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprender” y sus variaciones abarcan el término “constituido por”. Resultarán evidentes objetos, ventajas y características adicionales de la invención para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

## Ejemplos

1. Inclusión de pacientes y recogida de datos clínicos

Este fue un estudio prospectivo de pacientes con IC con etiologías isquémica, idiopática, valvular y otras que

5 pertenecen a las clases funcionales I, II, III o IV según la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA). Estos pacientes se sometieron a examen de historia y ecocardiografía. Se introdujeron para el análisis datos clínicos tales como tiempo de evolución de IC, número de metros andados en la prueba de paseo de 6 minutos, factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, dislipidemia, diabetes mellitus y tabaquismo) y medicación, junto con parámetros de dilatación ventricular medidos mediante ecocardiografía, tales como diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo (LVESD), diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (LVESD) y EF ("fracción de expulsión") como parámetro de la función sistólica.

10 El comité ético de la institución afiliada aprobó el protocolo y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio.

15 Los pacientes se excluyeron si estaban afectados por otras enfermedades fibroproliferativas tales como; insuficiencia renal, cirrosis, osteopatía metabólica, hipertiroidismo, fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica y degeneración macular.

20 Todos los sujetos seleccionados para determinar el intervalo de referencia de sAXL (a continuación en el presente documento también denominados "sujetos control") no tienen insuficiencia cardíaca. Un subgrupo de estos sujetos no presentó ningún síntoma de insuficiencia cardíaca y un cardiólogo evaluó clínicamente otro subgrupo de estos sujetos para descartar IC.

## 2. Recogida de muestras de suero

Se recogieron muestras de sangre de una vena antecubital de 188 pacientes con IC y de 66 controles.

25 Se mantuvieron las muestras de suero para el análisis de sAXL a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos después de la extracción de sangre, para dejar que el coágulo se forme y se centrifugaron a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 1800 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante, se tomaron alícuotas y se mantuvieron a -80°C hasta el análisis.

30 Para medir los niveles en circulación de péptido natriurético cerebral (BNP) se recogió sangre completa en un tubo enfriado con el anticoagulante EDTA. Se puso en hielo la muestra inmediatamente después de la extracción de sangre y se centrifugó a RCF de 1800 x g durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante, se tomaron alícuotas y se mantuvieron a -80°C hasta el análisis.

## 3. Recogida y análisis de datos

35 Se calcularon estadísticas con el software SPSS, versión 18.0 (SPSS Institute Inc, Cary, NC, EEUU). Se aplicó la prueba de Mann-Whitney no paramétrica para comparar los valores de sAXL entre controles y pacientes con IC. Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis no paramétrica para analizar en busca de diferencias de sAXL entre clases funcionales en pacientes con IC. Se usó el coeficiente de correlación de Spearman para analizar en busca de asociación supuesta entre los niveles de sAXL y BNP en circulación. Los valores numéricos en el texto son valores medios de sAXL  $\pm$  error estándar de la media. En todos los casos se consideró que un valor de  $p < 0,05$  era estadísticamente significativo.

45 En este estudio se diseñó un método de ELISA para cuantificar los niveles de AXL soluble en suero. Para la determinación de sAXL, se usó el anticuerpo policlonal AF154 (R&D systems) como anticuerpo de captura, y se usó el anticuerpo BAF154 biotinilado (R&D systems) como anticuerpo de detección.

50 Se recubrieron placas de múltiples pocillos (96 pocillos, Rubilabor) con el anticuerpo de captura AF154 a una concentración de 2,0  $\mu\text{g/ml}$  en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, pH 7,2, filtrada a través de un poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ). Se sella la placa y se deja durante la noche a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS con Tween20 al 0,05%) y entonces se bloquearon las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS que contenía BSA al 1% (Sigma).

55 Se diluyeron las muestras de suero 200 veces en PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1% (BSA). Se creó una curva patrón mediante dilución en serie de una proteína sAXL purificada producida mediante expresión recombinante de la parte extracelular de AXL obtenida de R&D systems (154-AL-100). Se usó un control negativo sin muestra de suero y se usaron muestras de plasma reunido en cada placa. Después de la adición de las muestras, se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS con Tween20 al 0,05%). Entonces, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del BAF154, diluido en PBS que contenía BSA al 1% a una concentración de 50 ng/ml y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se repitieron las etapas de aspiración/lavado y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP (Sigma) a cada pocillo. Se cubre la placa y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se repiten las etapas de aspiración/lavado y se añadió una disolución de tetrametil-bencidina (forma de cinética lenta; Sigma) al pocillo. Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico a

concentración 1 M. Se determinó la absorbancia de los pocillos con un lector de placas automático a 450 nm.

4. Resultados:

5 En la figura 1 se muestra que los niveles de sAXL en suero de pacientes con IC es estadísticamente mayor ( $88,5 \pm 2,55$  ng/ml, n=188) que en el suero de sujetos control ( $59,4 \pm 3,4$  ng/ml, n=66,  $p < 0,001^*$ , prueba de Mann-Whitney). Esto es indicativo de que sAXL es un buen marcador de diagnóstico de síndrome de IC.

10 En la figura 2 se muestran los valores medios de sAXL  $\pm 2x$  error estándar de la media para cada una de las cuatro clases distinguidas por la NYHA:

Clase I:  $65,4 \pm 26,7$  ng/ml (n=2);

15 Clase II:  $78,7 \pm 2,2$  ng/ml (n=98),

Clase III:  $108,4 \pm 7,1$  ng/ml (n=45), y

Clase IV:  $117,2 \pm 19$  ng/ml (n=5).

20 A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que los niveles de sAXL aumentan con las clases funcionales según la NYHA y, por tanto, con la gravedad del síndrome. La diferencia entre clases funcionales es estadísticamente significativa ( $p < 0,001^*$ , prueba de Kruskal Wallis).

25 Por tanto, puede concluirse que sAXL es un marcador de pronóstico de IC: cuanto mayor sea el valor de sAXL de un paciente en comparación con los niveles de sAXL en controles, peor será el pronóstico.

En la figura 3 se muestra una correlación significativa entre los niveles de sAXL y BNP en circulación en pacientes con IC (n= 156,  $p < 0,001$ , R= 0,304, prueba de Spearman).

30 Los niveles de sAXL se correlacionan con los niveles de BNP, el marcador de IC actual. Debido a esta correlación puede concluirse que sAXL es un marcador de diagnóstico y pronóstico de IC, que proporciona ventajas técnicas con respecto a las mediciones de BNP debido a su estabilidad en suero (en contraste con BNP, que es inestable).

35 **Referencias citadas en la solicitud**

Dickstein K *et al.*, "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)", 2008, Eur.Heart J., vol. 29, p. 2388-2442;

40 Hunt S. A. *et al.*, "ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Pattern of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Pattern of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society", 2005, Circulation; vol. 112, p. e154-e235.

45 Jessup M. *et al.*, "2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Pattern of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation", 2009, Circulation, vol. 119, p. 1977-2016.

Tang W. H. *et al.*, "National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure", 2007, Circulation; vol. 116, p. e99-109.

55 Wong M. *et al.*, "Severity of left ventricular remodeling defines outcomes and response to therapy in heart failure: Valsartan heart failure trial (Val-HeFT) echocardiographic data", 2004, J.Am.Coll.Cardiol.; vol. 43, p. 2022-2027.

60 Wu A. H. *et al.*, "Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure", 2003, Am. J. Cardiol., vol. 92, p. 628-631.

Documento WO 2008/060871 A1 (MAYO FOUNDATION [US]; BROZOVICH FRANK V [US]; OGUT OZGUR [US]; CHEN FR) 22 de mayo de 2008 (2008-05-22).

65 EKMAN C *ET AL*: "Plasma concentrations of Gas6 and soluble Axl correlate with disease and predict mortality in patients with critical limb ischemia", CLINICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC, US, CA, vol. 43, nº 10-11, 1 de

julio de 2010 (2010-07-01), páginas 873-876.

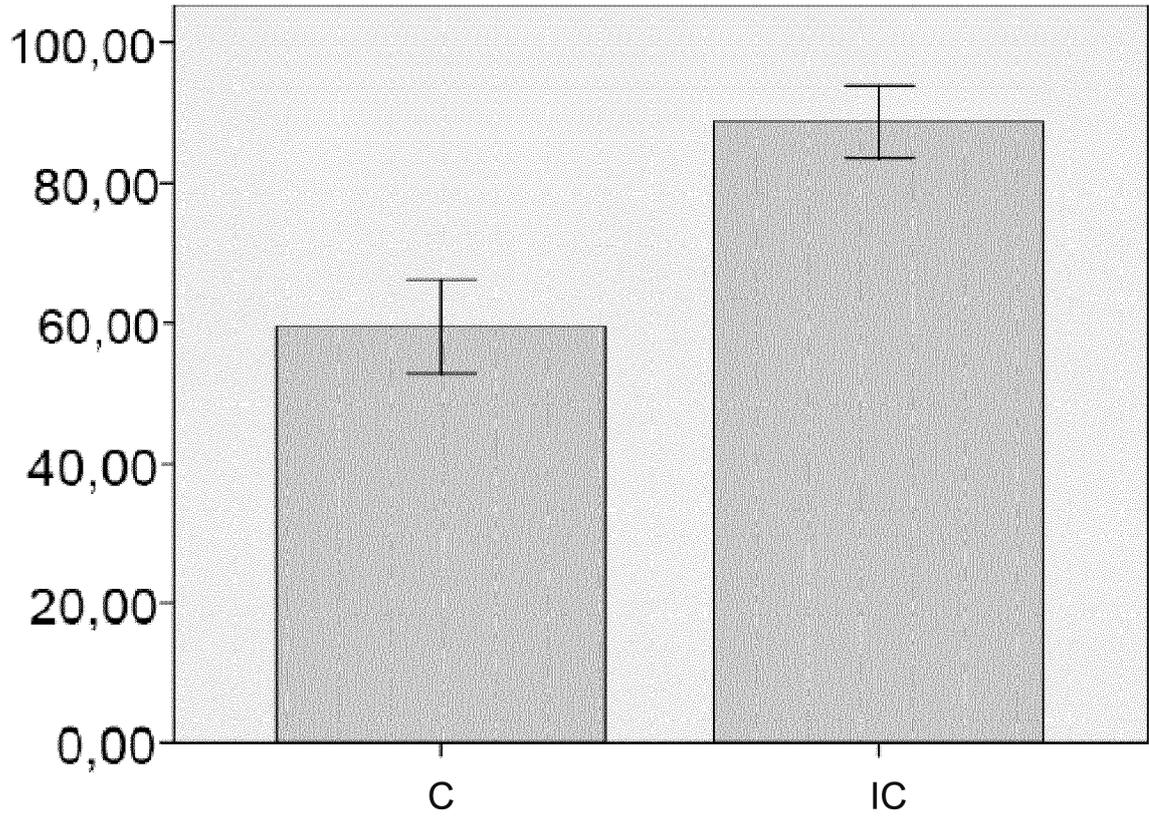
**REIVINDICACIONES**

1. Método para diagnosticar y/o pronosticar un síndrome de insuficiencia cardíaca (IC), comprendiendo dicho método la etapa de medir, *in vitro*, la cantidad de la forma soluble de AXL (sAXL) en una muestra de prueba.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de
  - (a) medir, *in vitro*, la cantidad de sAXL en la muestra de prueba; y
  - (b) determinar si la cantidad determinada en la etapa (a) se encuentra dentro de un intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC, en el que, si la cantidad de sAXL en la muestra de prueba es mayor que el límite superior del intervalo de referencia de sAXL, es indicativo de que el paciente padece o tiene un mal pronóstico de síndrome de IC.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina la cantidad de proteína de sAXL en la muestra de prueba.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de prueba se selecciona del grupo constituido por: suero y plasma.
5. Método para decidir o recomendar si iniciar un régimen médico de un sujeto que se sospecha que padece un síndrome de insuficiencia cardíaca, método que comprende las etapas de:
  - a) determinar, *in vitro*, la cantidad de sAXL en una muestra de prueba del sujeto; y
  - b) diagnosticar el síndrome de insuficiencia cardíaca si la sAXL es mayor que el límite superior del intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC; en el que:
    - i) si se diagnostica que el sujeto padece un síndrome de insuficiencia cardíaca, entonces se recomienda el inicio del régimen médico, y
    - ii) si se diagnostica que el paciente no padece el síndrome de insuficiencia cardíaca, se realiza el seguimiento de la función cardíaca opcionalmente en consideración del resultado de un examen del paciente por un cardiólogo.
6. Método para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente que ya tiene diagnóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca, comprendiendo el método las etapas de:
  - (a) medir la cantidad de sAXL *in vitro* en una muestra del paciente antes del régimen médico;
  - (b) medir la cantidad de sAXL *in vitro* en una muestra del paciente una vez comenzado el régimen médico; y
  - (c) comparar las cantidades medidas en las etapas (a) y (b), de tal modo que si la cantidad de sAXL medida en la etapa (b) es menor que la cantidad de sAXL medida en la etapa (a), es indicativo de que el régimen médico es eficaz en el tratamiento de IC;
 o, alternativamente, comprendiendo el método las etapas de:
  - (i) medir la cantidad de sAXL *in vitro* en una muestra del paciente una vez comenzado el régimen médico; y
  - (ii) determinar si la cantidad medida en la etapa (i) se encuentra dentro de un intervalo de referencia de concentración de sAXL obtenido de un grupo de sujetos que no tienen IC, en el que, si la cantidad de sAXL medida en la etapa (i) se encuentra dentro del intervalo de referencia de concentración de sAXL, es indicativo de que el régimen médico es eficaz en el tratamiento de IC.
7. Métodos según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en los que se determina la cantidad de proteína de sAXL en la muestra de prueba.
8. Métodos según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en los que la muestra de prueba se selecciona del grupo constituido por: suero y plasma.

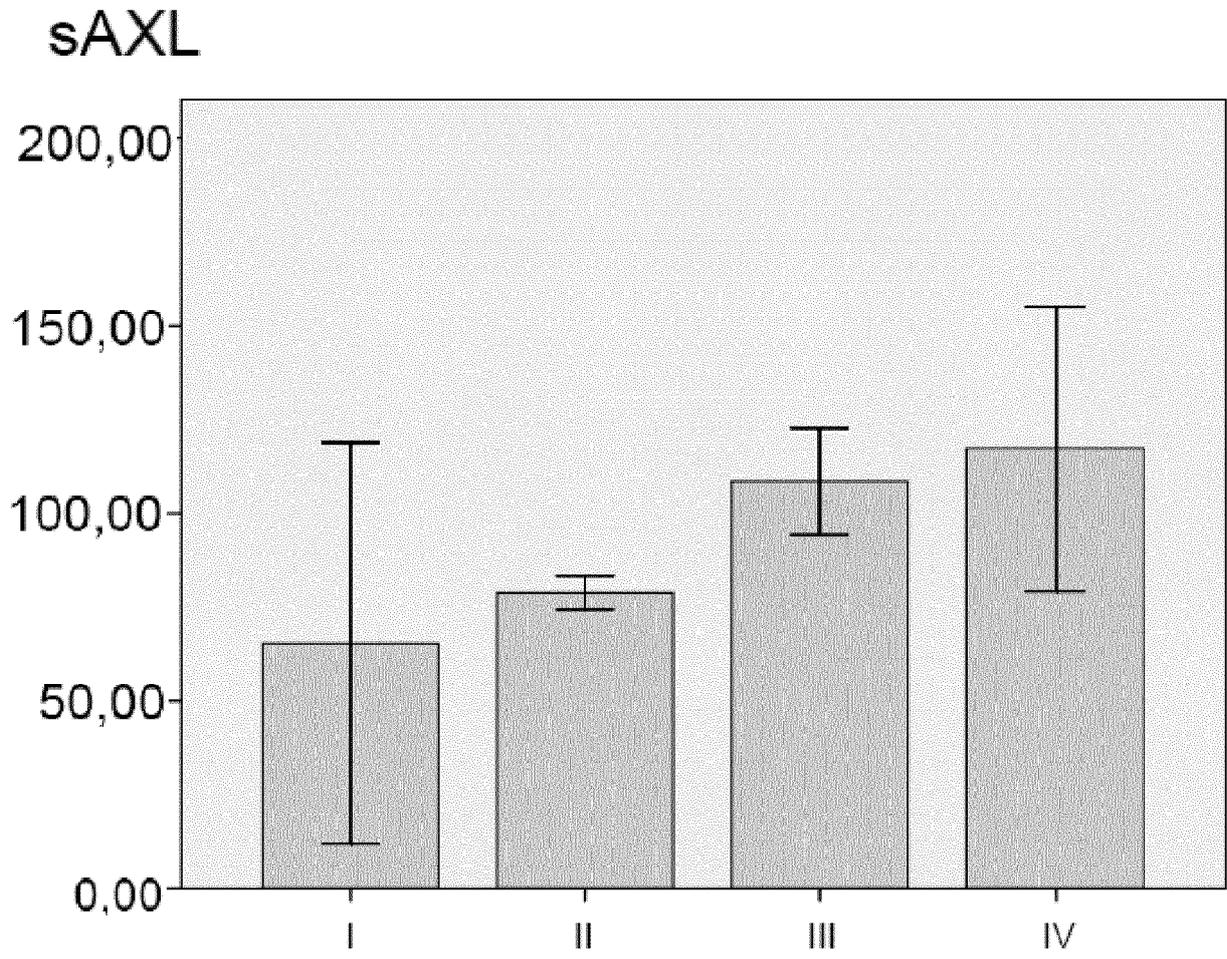
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que es un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de competición.
- 5 10. Método según la reivindicación 9, en el que la medición *in vitro* de la cantidad de sAXL se realiza usando un anticuerpo de captura frente a sAXL.
11. Uso de sAXL como un marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca.
- 10 12. Uso de medios para detectar la presencia de sAXL en una muestra aislada para el diagnóstico y/o pronóstico de síndrome de insuficiencia cardíaca en cualquiera de los métodos según las reivindicaciones 1 a 10.
- 15 13. Uso según la reivindicación 12, en el que los medios son un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a sAXL.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo forma parte de un kit.

**FIG. 1**

sAXL



**FIG. 2**



**FIG. 3**

sAXL

