

MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR ENFERMEDAD VALVULAR CRÓNICA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 62/117189 presentada el 17 de febrero de 2015, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Campo de la Invención

La invención se refiere, generalmente, a métodos para diagnosticar y predecir la enfermedad valvular crónica y, particularmente, a métodos para diagnosticar y predecir la enfermedad valvular crónica por medio de la medición del microARN (miARN) asociado con enfermedad valvular crónica.

15

Descripción de la Técnica Relacionada

La enfermedad cardíaca es uno de los trastornos más comunes en los perros. La enfermedad valvular crónica (CVD, por sus siglas en inglés), conocida, además, como enfermedad degenerativa de la válvula mitral (DMVD, por sus siglas en inglés), afecta, aproximadamente, a 9 % de los perros y aumenta con la edad, de modo que la incidencia acumulativa total es mayor que 40 %. La CVD se caracteriza por una degeneración y deformación progresivas de las válvulas auriculoventriculares, más comúnmente, las válvulas mitrales, que resultan en una insuficiencia anticipada de la válvula mitral. Esto, a su vez, conduce a la aparición de un soplo cardíaco sistólico debido a la regurgitación mitral, en donde el cierre inadecuado de la válvula mitral hace que la sangre regrese a la aurícula izquierda. Los perros afectados desarrollan, finalmente, una sobrecarga del volumen auriculoventricular, edema pulmonar, dilatación auricular y arritmias supraventriculares.

20

25

30

35

Si bien el tratamiento quirúrgico o médico de las válvulas afectadas es posible, los dueños de mascotas prefieren la intervención nutricional. Una detección y un tratamiento oportunos son imperativos; sin embargo, la detección puede resultar difícil debido a la ausencia de síntomas. Una solicitud de patente (PCT/US201344011) describe métodos para diagnosticar CVD por medio del uso de genes y metabolitos expresados diferencialmente. Sin embargo, los métodos de expresión génica requieren la recolección de tejidos cardíacos, la cual se considera invasiva. Además, el ARNm no es muy estable y puede ser difícil de manejar experimentalmente. Además, la medición

de metabolitos en el suero sanguíneo puede ser difícil dependiendo de la naturaleza y estabilidad bioquímicas de los compuestos.

Por lo tanto, subsiste la necesidad de diagnosticar y predecir la CVD en animales para proporcionar el nivel de tratamiento más apropiado y eficaz.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar métodos para diagnosticar y predecir la enfermedad valvular crónica en animales.

10

Este y otros objetivos se logran con el uso de métodos para diagnosticar y predecir la enfermedad valvular crónica en un animal, que implican obtener una muestra del animal; analizar una cantidad de un miARN asociado con enfermedad valvular crónica en la muestra; comparar la cantidad del miARN identificado en la muestra con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no padecen de enfermedad valvular crónica; y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal si el miARN encontrado en la muestra del animal se expresa diferencialmente en la muestra del animal de control.

15

Otros objetivos, características, y ventajas adicionales de la presente invención serán fácilmente evidentes para las personas con experiencia en la técnica.

20

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

25

El término “animal” se refiere a cualquier animal susceptible de padecer o que padece de enfermedad valvular crónica, que incluye seres humanos, animales aviares, bovinos, caninos, equinos, felinos, caprinos, lupinos, murinos, ovinos o porcinos.

30

Los términos “miARN” o “biomarcador” significan una molécula de ARN pequeño no codificante monocatenario, que incluye los que contienen aproximadamente 21-25 nucleótidos, cuyos niveles o intensidades se miden en una muestra biológica, que se puede usar como marcadores para diagnosticar un estado de enfermedad.

35

El término “expresión diferencial” o “expresado diferencialmente” significa la expresión de miARN aumentada o regulada al alza o significa la expresión de miARN disminuida o regulada a la baja según se detecte por la ausencia, presencia o cambio en la cantidad de miARN en una muestra.

El término “animal de control comparable” significa un animal de la misma especie y tipo o un animal individual evaluado en dos momentos diferentes.

El término “cantidad correspondiente” significa una cantidad de un miARN de un animal de control comparable que se corresponde con el miARN de un animal con diagnóstico de enfermedad valvular crónica, en donde el miARN está asociado con enfermedad valvular crónica.

El término “animales de compañía” se refiere a animales domesticados, tales como perros, gatos, aves, conejos, conejillos de Indias, hurones, hámsteres, ratones, jerbos, caballos de silla, vacas, cabras, ovejas, burros, cerdos, y especies más exóticas mantenidas por los seres humanos para compañía, entretenimiento, apoyo psicológico, exhibiciones públicas, y todas las otras funciones que los seres humanos necesiten compartir con animales de otras especies. En un aspecto, el animal de compañía puede referirse a un perro o un gato. En un aspecto específico, el animal de compañía puede referirse a un perro.

El término “diagnosticar” significa determinar si un animal padece de enfermedad valvular crónica o predecir si el animal es susceptible de desarrollarla.

El término “estadio temprano” significa insuficiencia cardíaca (HF, por sus siglas en inglés) de estadio B con agrandamiento cardíaco leve a moderado, pero sin signos clínicos de insuficiencia cardíaca (HF), basado en las directrices para el diagnóstico de HF del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM, por sus siglas en inglés).

El término “estadio final” significa HF en estadio C con signos clínicos de HF moderada basado en las directrices de ACVIM.

Como se usan en la presente descripción, los intervalos se usan de manera abreviada, para evitar enumerar y describir todos y cada valor dentro del intervalo. Puede seleccionarse cualquier valor adecuado dentro del intervalo, cuando sea adecuado, como el valor mayor, el valor menor o el final del intervalo.

Como se usa en la presente descripción, la forma singular de una palabra incluye el plural, y viceversa, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Así, las referencias “un”, “una” y “el(la)” incluyen, generalmente, los plurales de los respectivos términos. Por ejemplo, la referencia a “un método” incluye una pluralidad de esos “métodos”. Igualmente, las palabras “comprenden”, “comprende” y “que comprende” deben interpretarse inclusivamente en lugar de exclusivamente. De la misma manera, los términos “incluyen”, “que incluye” y “o” todos deben interpretarse que son inclusivos, a menos que tal construcción se prohíba claramente a partir del contexto.

Los métodos y composiciones y otras ventajas descritas en la presente descripción no se limitan a una metodología, protocolos, y reactivos descritos en la presente descripción porque, como apreciará la persona con experiencia, pueden variar. Además, la terminología usada en la presente descripción tiene por objeto describir solo las modalidades particulares, y no tiene previsto limitar ni limita el alcance de lo que se describe o reivindica.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos, términos de la técnica y acrónimos usados en la presente descripción tienen los significados comúnmente entendidos por una persona con experiencia en la técnica en el(los) campo(s) de la invención, o en el(los) campo(s) en los que se usa el término.

Todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, artículos técnicos y/o académicos, y otras referencias mencionadas o referidas en la presente descripción se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia en la medida que la ley lo permita. La descripción de esas referencias se destina meramente a resumir las declaraciones hechas en estas. No se acepta que ninguna de tales patentes, solicitudes de patente, publicaciones o referencias o cualquier porción de estas sea relevante, material o técnica anterior. El derecho a cambiar la exactitud y pertinencia de cualquier afirmación de tales patentes, solicitudes de patente, publicaciones, y otras referencias como relevante, material o técnica anterior se reserva específicamente.

La invención

Los inventores de la presente invención han descubierto que el miARN descrito en la presente descripción puede estar presente en la muestra biológica de un animal y que la cantidad del miARN en la muestra puede servir como indicador bioquímico para diagnosticar enfermedad valvular crónica al indicar o predecir el umbral de la enfermedad valvular crónica. Como tal, el presente descubrimiento permite a los veterinarios y otros clínicos realizar pruebas para determinar estos “biomarcadores” en una muestra y determinar si el animal es susceptible de padecer o padece de enfermedad valvular crónica y si existe la necesidad de un diagnóstico o tratamiento adicional. Al establecerse la necesidad de diagnósticos o tratamientos adicionales, es posible justificar el costo y riesgo de esos diagnósticos o tratamientos adicionales.

De conformidad con lo anterior, la invención proporciona métodos para diagnosticar enfermedad valvular crónica en un animal. Los métodos comprenden obtener una muestra biológica del animal, analizar una cantidad de un microARN (miARN) asociado con enfermedad valvular crónica en la muestra, comparar la

cantidad del miARN identificado en la muestra con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no padecen de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal si la cantidad del miARN encontrado en la muestra del animal se expresa diferencialmente en la muestra del animal de control.

En una modalidad, un método para diagnosticar enfermedad valvular crónica en un animal puede comprender obtener una muestra biológica del animal, analizar una cantidad de un miARN asociado con enfermedad valvular crónica en la muestra, comparar la cantidad del miARN identificado en la muestra con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no padecen de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal si la cantidad del miARN encontrado en la muestra del animal es mayor que la cantidad del miARN presente en la muestra del animal de control.

En otra modalidad, un método para diagnosticar enfermedad valvular crónica en un animal puede comprender obtener una muestra biológica del animal, analizar una cantidad de un miARN asociado con enfermedad valvular crónica en la muestra, comparar la cantidad del miARN identificado en la muestra con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no padecen de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal si la cantidad del miARN encontrado en la muestra del animal es menor que la cantidad del miARN presente en la muestra del animal de control.

En varias modalidades, puede evaluarse el miARN en uno o más animales de control comparables, que no son el animal que se está evaluando para determinar enfermedad valvular crónica y que se determinó que no padecen de enfermedad valvular crónica, y los resultados de tales evaluaciones se usan como valores iniciales para compararlos con los resultados de un animal en el que se está evaluando el miARN. En algunas modalidades, los valores iniciales del miARN pueden determinarse mediante la evaluación de muchos animales de control comparables.

En otra modalidad, la cantidad de miARN puede determinarse en un animal en varias ocasiones a lo largo de la vida del animal, y pueden usarse los resultados para determinar si el animal es susceptible de padecer o padece enfermedad valvular crónica, *p. ej.*, si la cantidad del miARN aumenta o disminuye a medida que el animal envejece, es posible diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o padece enfermedad valvular crónica. En algunas modalidades, puede evaluarse el

animal periódicamente, y pueden registrarse los resultados del miARN. Después, si una evaluación posterior muestra que la cantidad del miARN aumentó o disminuyó desde la(s) última(s) evaluación(es), es posible diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o padece enfermedad valvular crónica. En algunos aspectos, los cambios
 5 específicos en los miARN pueden correlacionarse con un estadio temprano o avanzado de enfermedad valvular crónica.

Cualquier muestra que sea de origen biológico puede resultar útil en la presente invención. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, sangre (suero/plasma), líquido cefalorraquídeo (CSF, por sus siglas en inglés), orina, materia
 10 fecal, aliento, saliva o biopsia de cualquier tejido. En una modalidad, la muestra puede ser una muestra de suero. Si bien en la presente descripción se usa el término "suero", las personas con experiencia en la técnica apreciarán que puede usarse, además, plasma o sangre entera o una subfracción de la sangre entera.

La expresión disminuida o aumentada puede medirse en el nivel de
 15 miARN con el uso de métodos ampliamente conocidos en la técnica para cuantificar polinucleótidos, tales como, por ejemplo, PCR (que incluye, pero no se limita a, RT-PCR y qPCR), secuenciación, transferencia de tipo Northern, micromatriz u otros métodos de hibridación.

Si bien el uso de un miARN es suficiente para diagnosticar enfermedad
 20 valvular crónica, la invención abarca el uso de uno o más, dos o más, tres o más o cuatro o más de tal miARN. El miARN puede evaluarse y usarse en un diagnóstico en cualquier combinación. Por consiguiente, los presentes métodos pueden incluir diagnosticar CVD basados en un miARN de regulación al alza y un miARN de regulación a la baja.

En una modalidad, el diagnóstico puede basarse en determinar si la
 25 cantidad del miARN encontrado en la muestra del animal es mayor en comparación con la cantidad del miARN presente en la muestra del animal de control. En un aspecto, el miARN puede incluir miR-103, miR-98, let-7c o let-7b.

En una modalidad, el diagnóstico puede basarse en determinar si la
 30 cantidad del miARN encontrado en la muestra del animal es menor en comparación con la cantidad del miARN presente en la muestra del animal de control. En un aspecto, el miARN puede incluir miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b o miR-487b.

El miARN expresado diferencialmente puede ser estadísticamente
 35 significativo según se ejemplifica en la presente descripción. En algunos aspectos, la significación estadística puede incluir un $p < 0,05$, $p < 0,01$ o incluso $p < 0,001$.

En varias modalidades, el animal puede ser un ser humano o un animal de compañía. En un aspecto, el animal de compañía puede ser un canino, tal como un perro, o un felino, tal como un gato. En un aspecto específico, el animal puede ser un canino.

5

Ejemplos

La invención puede ilustrarse, además, mediante los siguientes ejemplos, aunque se entenderá que estos ejemplos se incluyen meramente con propósitos de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera.

10

Ejemplo 1

15

20

25

Los miARN se identificaron mediante un estudio de generación de perfiles de expresión diferencial que comparó muestras de suero con enfermedad y normal. Los perros se clasificaron como corazón saludable o CVD mediante ecocardiografía realizada o evaluada por un cardiólogo veterinario certificado por el consejo profesional, examen patológico del corazón o ambos. Los perros se clasificaron en uno de los tres grupos basado en el estadio de la insuficiencia cardíaca (HF) según el esquema de estadios del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM)/Colegio Europeo de Medicina Interna Veterinaria (ECVIM, por sus siglas en inglés): grupo A (estadio A, en riesgo, pero no afectados, 6 perros), grupo B (estadio B, con agrandamiento cardíaco leve a moderado, pero sin signos clínicos de insuficiencia cardíaca, 6 perros), o grupo C (estadio C, con signos clínicos de insuficiencia cardíaca moderada, 6 perros) (Tabla 1). Estos tres grupos de perros se casaron por edad, tamaño corporal y sexo. Se recolectó suero sanguíneo de cada grupo de perros, y se almacenó a -80 °C hasta usarse.

30

35

Tabla 1 Muestras de suero usadas en el estudio de miARN

Grupo	Número	Clasificación del estadio de la enfermedad
A	6	Estadio A de ACVIM. En riesgo, pero no afectado.
B	6	Estadio B de ACVIM. Agrandamiento cardíaco leve a moderado, pero sin signos clínicos de HF.
C	6	Estadio C de ACVIM. Signos clínicos de HF moderada.

Las muestras se enviaron a Qiagen para extraer el miARN y realizar la cuantificación por PCR mediante el uso del sistema de matrices de miARN para PCR miScript® de Qiagen. Se analizó un total de 277 miARN caninos conocidos. El análisis de los datos se realizó con el uso de ANOVA (análisis de varianza). Los valores P por ANOVA se ajustaron para múltiples pruebas, y el índice de descubrimientos falsos (FDR, por sus siglas en inglés) se calculó con el uso del método de Benjamini y Hochberb. Se calculó el cambio múltiplo en la expresión entre los grupos B vs. A (FC_BvA) y entre los grupos C vs. A (FC_CvA). Los miARN expresados diferencialmente se seleccionaron con el uso del umbral de FDR<0,05. Se seleccionó un total de 11 miARN (Tabla 2).

Tabla 2 miARN expresados diferencialmente

miARN	P ^a	FDR ^b	FC ^c _BvA	FC ^c _CvA
miR-302d	0,0010	0,0378	-2,7	-3,51
miR-380	0,0001	0,0119	-2,48	-4,76
miR-874	0,0016	0,0434	-2,37	-3,69
miR-582	0,0000	0,0004	-2,28	-4,71
miR-490	0,0005	0,0261	-2,24	-4,03
miR-329b	0,0019	0,0490	-1,96	-2,36
miR-487b	0,0012	0,0427	-1,45	-3,08
miR-103	0,0002	0,0140	1,29	3,81
miR-98	0,0014	0,0428	2,15	4,07
let-7c	0,0003	0,0218	2,28	4,67
let-7b	0,0006	0,0269	2,38	4,03

^aValores P nominales por ANOVA; ^bíndice de descubrimientos falsos; ^ccambios múltiples los números positivos indican una regulación al alza con respecto a las muestras de control; los números negativos indican una regulación a la baja con respecto a las muestras de control.

En la memoria descriptiva se describieron modalidades típicas preferidas de la invención. Aunque se usan términos específicos, se usan en un sentido genérico y descriptivo solamente y no con propósitos de limitación. El alcance de la invención se describe en las reivindicaciones. Obviamente, muchas modificaciones y variaciones de la invención son posibles a la luz de las enseñanzas anteriores. Debe entenderse, por lo tanto, que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede llevarse a la práctica de cualquier otra manera que como se describe específicamente.