

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 010**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08832513 .9**
96 Fecha de presentación: **16.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2205978**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

54 Título: **Valoración de riesgo cardíaco congestivo en pacientes tratados o que potencialmente van a ser tratados con un agonista del receptor gamma activador de proliferador de peroxisoma o una tiazolidinodiona**

30 Prioridad:
17.09.2007 US 973113 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.04.2012

73 Titular/es:
**BG MEDICINE, INC.
601 N. LINCOLN STREET
WALTHAM, MA 02451, US**

72 Inventor/es:
**MCBURNEY, Robert, Nicholas;
WANG, Shunguang;
PLASTERER, Tom y
MUNTENDAM, Pieter**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 378 010 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

Valoración de riesgo cardíaco congestivo en pacientes tratados o que potencialmente van a ser tratados con un agonista del receptor gamma activador de proliferador de peroxisoma o una tiazolidinodiona.

CAMPO DE LA INVENCION¶

La presente invención se refiere a métodos para evaluar el riesgo cardíaco congestivo en un paciente. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos para evaluar el riesgo cardíaco congestivo en un paciente que se está tratando o es idóneo para tratar, con un agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma (PPAR- γ) o una tiazolidinodiona (TZD).

ANTECEDENTES

La diabetes sacarina es una causa principal de morbilidad y mortalidad. La glucosa en sangre crónicamente elevada conduce a complicaciones debilitantes: nefropatía, requiriendo con frecuencia diálisis o trasplante renal; neuropatía periférica; retinopatía que conduce a ceguera; ulceración de las piernas y pies, conduciendo a amputación; enfermedad del hígado graso, a veces progresando a cirrosis y vulnerabilidad a arteriopatía coronaria e infarto agudo de miocardio.

La diabetes sacarina de tipo 2 (T2DM) es la forma más común de diabetes teniendo en cuenta aproximadamente 90% de los casos de diabetes y afectando al 10-20% de aquéllos de más de 45 años en muchos países desarrollados. Se caracteriza por defectos en la acción de la insulina dando como resultado una absorción disminuida de la glucosa por el músculo y la grasa y una producción de glucosa hepática aumentada y por anomalías en el patrón normal de la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Una serie de tiazolidinodionas (las TZD) han sido homologadas como agentes antidiabéticos orales. Las TZD son ligandos selectivos del receptor γ activador de proliferador de peroxisoma (PPAR- γ) del factor de transcripción nuclear que mejora el control glucémico por aumento de la sensibilidad a la insulina. Millones de personas en el mundo usan medicamentos que contienen TZD para tratar su diabetes de Tipo 2. Sin embargo, se ha asociado un riesgo significativo de insuficiencia cardíaca congestiva con el uso de medicamentos que contienen TZD. Los informes post-comercialización continuados de insuficiencia cardíaca han impulsado a la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) a aumentar la importancia de esta preocupación por la seguridad en las etiquetas para fármacos que contienen TZD. (Alerta 8/2007 de la FDA (pioglitazona HCl) y Alerta de la FDA 8/14/2007 (rosiglitazona); página web de la FDA de EE.UU.).

Lok et al, Journal of the American College of Cardiology, 49, N° 9 (2.007), pA98, describen que la galectina-3 es un marcador que predice la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable.

Giles et al, Journal of the American College of Cardiology, 49, N° 9 (2.007), p66A describen que las tiazolidinodionas son agentes sensibles a la insulina seguros utilizables para tratar pacientes de diabetes de tipo 2 con insuficiencia cardíaca.

Friedmann et al, Journal of the American College of Cardiology, 49, N° 9 (2.007), p66A describen que la pioglitazona redujo los casos cardiovasculares principales en pacientes con diabetes de tipo 2 y enfermedad cardiovascular significativa quienes están en riesgo de padecer insuficiencia cardíaca.

Nesto Richard et al, Circulation, 108, N° 23 (2.003), págs. 2.941-2.948, describen que la tiazolidinodiona presenta un efecto beneficioso en los factores de riesgo cardiovascular y que por lo tanto son agentes atractivos en pacientes con diabetes de tipo 2 que están en alto riesgo de enfermedad cardiovascular, tal como insuficiencia cardíaca congestiva.

Hotta et al, The Journal of Biological Chemistry, 276, N° 36 (2.001), págs. 34.089-34.097, describen que la expresión de la galectina-12 es inducida por las tiazolidinodionas.

Debido a la importancia de los agonistas de PPAR- γ y las TZD como agentes antidiabéticos, permanece la necesidad de desarrollar métodos para el diagnóstico eficaz de la insuficiencia cardíaca en pacientes que cuentan con estos medicamentos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para evaluar un riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva en un paciente que se está tratando con un agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma (PPAR- γ) o una tiazolidinodiona (TZD) por detección o control de la concentración de uno o más marcadores asociados a la insuficiencia cardíaca. Como resultado, la presente invención permite que los pacientes usen con más seguridad agonistas de PPAR- γ y compuestos de tiazolidinodiona como agentes terapéuticos. De acuerdo con esto, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para evaluar el riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva en un paciente al que se está administrando tiazolidinodiona, comprendiendo el método:

detectar la presencia o ausencia de una concentración aumentada de galectina-3 en una muestra de fluido sanguíneo de un paciente que se está tratando con tiazolidinodiona, en el que la presencia de una concentración aumentada de galectina-3 en el tiempo indica un riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva aumentada en el paciente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar a un candidato para tratamiento con una tiazolidinodiona, comprendiendo el método:

medir una concentración de galectina-3 en una muestra de fluido sanguíneo de un paciente con una afección tratable con una tiazolidinodiona; comparar la concentración medida de galectina-3 con una concentración de galectina-3 de referencia, en la que la concentración de galectina-3 de referencia procede de concentraciones de galectina-3 en otros pacientes con la afección y es indicativo de riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes con la afección y recomendar que se restrinja o interrumpa la administración de tiazolidinodiona si la concentración medida de galectina-3 excede de la concentración de galectina-3 de referencia. El resultado de la comparación se usa para evaluar si la concentración de galectina-3 medida es indicativa de un riesgo cardíaco congestivo aumentado en el paciente.

La invención incluye evaluar a un paciente (por ejemplo, un paciente de diabetes) que incluye medir un cambio en el tiempo en concentración de galectina-3 en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero o plasma) del paciente que se está tratando con una tiazolidinodiona (por ejemplo, rosiglitazona) y comparar el cambio medido con cambios en la concentración de galectina-3 observados en otros pacientes tratados con tiazolidinodiona para los que el estado cardíaco congestivo es conocido o es determinable. El resultado de la comparación se usa para evaluar si el cambio medido en la concentración de galectina-3 es indicativo de un riesgo cardíaco congestivo aumentado en el paciente. El método puede incluir comparar una concentración de galectina-3 durante el curso del tratamiento con la tiazolidinodiona con una concentración de galectina-3 más temprana durante el curso del tratamiento. El método también puede incluir comparar niveles de galectina-3 medidos en diversos momentos durante el curso del tratamiento para desarrollar una historia del tratamiento de concentraciones de galectina-3.

La invención también incluye evaluar al paciente detectando la presencia o ausencia de una concentración de galectina-3 aumentada en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero o plasma) de un paciente que se esté tratando con una tiazolidinodiona (por ejemplo, rosiglitazona). La presencia de una concentración de galectina-3 aumentada en el tiempo es indicativa de un riesgo cardíaco congestivo aumentado en el paciente. El método puede incluir comparar una concentración de galectina-3 durante el curso del tratamiento con la tiazolidinodiona con una concentración de galectina-3 más temprana durante el curso del tratamiento. El método también puede incluir comparar niveles de galectina-3 en diversos momentos durante el curso del tratamiento para desarrollar una historia del tratamiento de concentraciones de galectina-3.

Los resultados de la valoración del riesgo se pueden usar para informe de decisiones futuras que impliquen el tratamiento del paciente. Por ejemplo, si un paciente parece tener un riesgo cardíaco congestivo aumentado, basado en la concentración de galectina-3 del paciente o un cambio en la concentración de galectina-3 del paciente, se puede interrumpir la administración de la tiazolidinodiona, limitar o restringir, tal como por reducción de la dosis o la frecuencia de administración. Se puede cambiar al paciente a una medicación diferente, tal como diferente tiazolidinodiona o no una tiazolidinodiona tal como gliburida o metformina. Alternativamente, si el paciente no parece tener un riesgo cardíaco congestivo sustancialmente aumentado, la administración de la tiazolidinodiona puede continuar, prolongarse o aumentarse (por ejemplo, en dosis o frecuencia, si aún no se ha alcanzado la dosis o la frecuencia admisible).

Similarmente, la invención proporciona un método para evaluar a un candidato (por ejemplo, un paciente de diabetes) para tratamiento con una tiazolidinodiona (por ejemplo, rosiglitazona). El método incluye medir una concentración de galectina-3 en un fluido corporal de un paciente con una afección tratable con una tiazolidinodiona y comparar la concentración de galectina-3 medida con una concentración de galectina-3 de referencia. La concentración de galectina-3 de referencia puede proceder de concentraciones observadas de galectina-3 en otros pacientes con la afección y es indicativo de riesgo cardíaco congestivo en pacientes con la afección. El tratamiento con tiazolidinodiona se puede restringir o rehusar si la concentración en galectina-3 medida excede de la concentración de galectina-3 de referencia.

En otro aspecto la invención se refiere a un método para evaluar el riesgo cardíaco congestivo en un paciente al que se está administrando un agonista de receptor y activador de proliferador de peroxisoma, comprendiendo el método:

detectar la presencia o ausencia de una concentración de galectina-3 aumentada en una muestra de fluido corporal de un paciente que se está tratando con un agonista de receptor y activador de proliferador de

peroxisoma,

en el que la presencia de una concentración de galectina-3 aumentada en el tiempo es indicativo de un riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva aumentada en el paciente.

5 La invención incluye evaluar a un paciente (por ejemplo, un paciente de diabetes) que incluye medir un cambio en el tiempo en concentración de galectina-3 en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero o plasma) del paciente que está tratando con un agonista PPAR- γ y comparar el cambio medido con cambios en la concentración de galectina-3 observados en otros pacientes tratados con el agonista PPAR- γ para los cuales la afección cardíaca congestiva es conocida o es determinable. El resultado de la comparación se usa para evaluar si el cambio medido en la
10 concentración de galectina-3 es indicativo de un riesgo cardíaco congestivo aumentado en el paciente. El método puede incluir comparar una concentración de galectina-3 durante el curso del tratamiento con el agonista PPAR- γ con una concentración de galectina-3 más temprana durante el curso del tratamiento. El método también puede incluir comparar los niveles de galectina-3 medidos en diferentes momentos durante el curso del tratamiento para desarrollar una historia del tratamiento de concentraciones de galectina-3.

15 Preferiblemente, el agonista de receptor γ y activador de proliferador de peroxisoma es una tiazolidinodiona.

La invención incluye evaluar al paciente por detección de la presencia o ausencia de una concentración de galectina-3 aumentada en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero o plasma) de un paciente que se esté tratando con un
20 agonista PPAR- γ . La presencia de una concentración de galectina-3 aumentada en el tiempo es indicativa de un riesgo cardíaco congestivo aumentado en el paciente. El método puede incluir comparar una concentración de galectina-3 durante el curso del tratamiento con el agonista PPAR- γ con una concentración de galectina-3 más temprana durante el curso del tratamiento. El método también puede incluir comparar los niveles de galectina-3 en diferentes momentos durante el curso del tratamiento para desarrollar una historia del tratamiento de
25 concentraciones de galectina-3.

Los resultados de la valoración del riesgo se pueden usar en informe para decisiones futuras que impliquen tratamiento del paciente. Por ejemplo, si un paciente parece tener un riesgo cardíaco congestivo aumentado, basado en la concentración de galectina-3 del paciente o un cambio en la concentración de galectina-3 del paciente, la
30 administración del agonista PPAR- γ se puede interrumpir, limitar o restringir, tal como por reducción de la dosis o la frecuencia de administración. Se puede cambiar al paciente a una medicación diferente, tal como un agonista PPAR- γ diferente. Alternativamente, si el paciente no parece tener un riesgo cardíaco congestivo sustancialmente aumentado, la administración del agonista PPAR- γ se puede continuar, prolongar o aumentar (por ejemplo, en dosis o frecuencia, si aún no se ha alcanzado la dosis o frecuencia admisible).

35 Similarmente, la invención proporciona un método para evaluar un candidato (por ejemplo, un paciente de diabetes) para tratamiento con un agonista PPAR- γ . El método incluye medir una concentración de galectina-3 en un fluido corporal de un paciente con una afección tratable con un agonista PPAR- γ y comparar la concentración de galectina-3 medida con una concentración de galectina-3 de referencia. La concentración de galectina-3 de referencia puede proceder de concentraciones observadas de galectina-3 en otros pacientes con la afección y es indicativo de riesgo
40 cardíaco congestivo en pacientes que tengan la afección. El tratamiento con agonista PPAR- γ puede restringirse o rechazarse si la concentración de galectina-3 medida excede de la concentración de galectina-3 de referencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45 Los solicitantes han inventado un método para evaluar riesgos cardíacos congestivos en pacientes tratados con un agonista de receptor γ y activador de proliferador de peroxisoma (PPAR- γ) o una tiazolidinodiona (TZD). Los fármacos a base de TZD se usan para tratar diabetes de tipo II y otras enfermedades, tales como liposarcoma y enfermedad de ovario policístico. Recientemente, los estudios clínicos han sugerido que la administración de TZD puede causar o empeorar la insuficiencia cardíaca en ciertos pacientes. Por la evaluación del riesgo de un paciente individual a
50 desarrollar o agravar una afección cardíaca, se pueden tomar decisiones apropiadas teniendo en cuenta las opciones de tratamiento del paciente.

Los solicitantes han desarrollado métodos que permiten el uso de niveles de proteína galectina-3 circulantes como un indicador de los riesgos cardíacos congestivos en pacientes que se están tratando o pacientes idóneos para ser
55 tratados, con un agonista PPAR- γ o un TZD. Las concentraciones elevadas de galectina-3 en fluidos corporales, cuando se compara con niveles de galectina-3 observados en individuos sanos, se han relacionado con el desarrollo de CHF (van Kimmenade et al., J. Am. Coll. Cardiol., 48: 1.217-24 (2.006)). La investigación de los solicitantes ha revelado, sin embargo, que la comparación de los niveles de galectina-3 en un paciente de diabetes que se está tratando con un agonista PPAR- γ o un TZD con los niveles de galectina-3 observados en individuos sanos es poco
60 probable que sea informativa. Primero, los solicitantes han descubierto que la propia diabetes conduce a un aumento significativo en la expresión de galectina-3. Si los niveles de galectina-3 se elevan con frecuencia en pacientes de diabetes como resultado de la diabetes, detectar un nivel elevado de galectina-3 en un paciente de diabetes comparado con un individuo sano no sería sorprendente y no sería necesariamente informativo de la afección del corazón del paciente. Segundo, los solicitantes han descubierto también que la administración de un agonista PPAR-
65 γ o un TZD puede reducir la expresión de galectina-3. En combinación, el aumento dependiente de la diabetes en la

expresión de galectina-3 y la disminución dependiente de agonista PPAR- γ o TZD en la expresión de galectina-3 complicaría un esfuerzo para extraer conclusiones significativas basadas en comparaciones con individuos sanos.

Habiendo descubierto estos efectos competitivos sobre la expresión de galectina-3, los Solicitantes han desarrollado nuevos métodos para usar niveles de galectina-3 como un indicador de riesgo cardíaco congestivo. Mientras que una comparación de niveles de galectina-3 con los de pacientes sanos puede no ser informativa, una comparación de niveles de galectina-3 con los de pacientes comparables (por ejemplo, pacientes con la misma enfermedad o afección, quizá tratada con el mismo agonista PPAR- γ o TZD) puede revelar información importante sobre el estado o riesgo del corazón del paciente.

Así, en algunas realizaciones, se evalúa en un paciente que toma un agonista PPAR- γ o un TZD un riesgo de corazón congestivo midiendo el nivel de galectina-3 (y/u otros marcadores de insuficiencia cardíaca) en el paciente y comparando la concentración de galectina-3 medida con una concentración de galectina-3 que se ha detectado en otros pacientes que se están tratando con el agonista PPAR- γ o TZD para los cuales se conoce la afección de corazón congestivo. Los otros pacientes se pueden equiparar por edad, género o las enfermedades que se están tratando. Las concentraciones de galectina-3 en el paciente que se está tratando también se pueden medir en el tiempo y compararse con cambios temporales en la concentración de galectina-3 observados en otros pacientes tratados de manera similar, cuya afección del corazón congestivo es conocida. Los cambios en los niveles de galectina-3 que resultan de la insuficiencia cardíaca se pueden distinguir de ese modo de la presencia de una enfermedad particular (por ejemplo, diabetes) o de cambios en niveles de galectina-3 que resultan de tratamiento con el agonista PPAR- γ o el TZD. Así si el paciente que se está tratando presenta niveles de galectina-3 o cambios en los niveles de galectina-3 similares a otros pacientes que se sabe que tienen un corazón congestivo, entonces el paciente que se está tratando puede estar en riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva.

Alternativamente, se puede medir una concentración de galectina-3 en un paciente que toma un agonista PPAR- γ o un TZD y se puede comparar la concentración de galectina-3 con una concentración previa de galectina-3 medida en el paciente. Un aumento en concentración de galectina-3 en relación con una o más concentraciones previas de galectina-3 en el paciente es un indicio de que el paciente tiene riesgo de corazón congestivo. Los niveles de marcador se pueden controlar con el tiempo, tal como en muestras obtenidas a partir de un paciente a intervalos anuales, semianuales, bimensuales, mensuales, cada tres semanas, cada dos semanas, semanales, diarios y a variables.

El tratamiento con un agonista PPAR- γ o un TZD se puede modificar o terminar si se determina que el paciente tiene un riesgo aumentado de corazón congestivo. Por ejemplo, se puede disminuir la cantidad administrada de agonista PPAR- γ o TZD o se puede reducir la frecuencia de administración hasta que se reduce el riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva a un nivel aceptable.

Se puede usar análisis multimarcador para mejorar la precisión de diagnóstico y control. Por ejemplo, se pueden usar concentraciones en sangre de galectina-3 (Gal-3) y péptido natriurético cerebral (BNP, por sus siglas en inglés) para diagnosticar insuficiencia cardíaca y predecir el resultado a largo plazo de la insuficiencia cardíaca (van Kimmenade et al., J. Am. Coll. Cardiol., 48: 1.217-24 (2.006); Sharma et al., Circulation, 110: 3.121-28 (2.004); Lok et al., Eur. Heart J., 28: 141, Abstract 1.035 (2.007)). El BNP y su escisión equivalente proBNP amino-terminal (NT-proBNP) se elevan en el músculo cardíaco y en la sangre durante la insuficiencia cardíaca como resultado de altas presiones de llenado de las cámaras del corazón y el estiramiento de las fibras del músculo cardíaco. Otros marcadores secundarios que se podían usar para diagnosticar insuficiencia cardíaca pueden incluir marcadores cardíacos no polipeptídicos tales como esfingolípido, esfingosina, esfingosina-1-fosfato, dihidroesfingosina y esfingosilfosforilcolina (véase la patente de EE.UU. N° 6.534.322). Cuando se miden los niveles de los marcadores anteriores, se pueden incorporar correcciones para la edad y el género para mejorar la precisión del diagnóstico.

Detección de Marcador:

La presente invención proporciona métodos para detectar y controlar la insuficiencia cardíaca en pacientes que toman medicamentos que contienen un agonista PPAR- γ o un TZD midiendo los niveles de uno o más marcadores (por ejemplo, Gal-3, BNP, NT-proBNP). Muchos métodos para detectar una proteína de interés, con o sin cuantificación, son conocidos y se pueden usar en la práctica de la presente invención. Se describen a continuación ejemplos de tales ensayos y pueden incluir, por ejemplo, inmunoensayos, métodos cromatográficos y espectroscopía de masas. Tales ensayos se pueden realizar en cualquier muestra biológica, incluyendo, entre otros, sangre, plasma y suero. De acuerdo con esto, se pueden usar múltiples ensayos para detectar Gal-3 o BNP y se pueden analizar muestras a partir de una o más fuentes.

Se pueden detectar o cuantificar marcadores en una muestra con ayuda de uno o más métodos de separación. Por ejemplo, los métodos de separación adecuados pueden incluir un método de espectrometría de masas, tal como espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)ⁿ (todas por sus siglas en inglés) (n es un número entero mayor que cero), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI-TOF-MS), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser de superficie (SELDI-TOF-MS), desorción/ionización sobre silicio (DIOS),

espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), con cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (APCI-MS), APCI-MS/MS, APCI-(MS)ⁿ o espectrometría de masas con fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS), APPI-MS/MS y APPI-(MS)ⁿ. Otros métodos de espectrometría de masas pueden incluir, entre otros, espectrometría de masas de transformada de fourier (FTMS, por sus siglas en inglés) y trampa iónica. Las técnicas espectrométricas que se pueden usar también incluyen espectroscopía de resonancia y espectroscopía óptica.

Otros métodos de separación adecuados incluyen cromatografía de columna, de partición por extracción química, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida hidrófoba (de fase inversa), electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida, con enfoque isoelectrónico (PAGE), electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) u otras técnicas cromatográficas tales como cromatografía de gases o líquidos de capa fina o cualquier combinación de las mismas. En una realización, a muestra biológica que se ensaya se puede fraccionar previamente a la aplicación del método de separación.

Se pueden detectar o cuantificar marcadores por métodos que no requieren separación física de los propios marcadores. Por ejemplo, se puede usar espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) para resolver un perfil de un marcador a partir de una mezcla compleja de moléculas. Un uso análogo de RMN para clasificar tumores se describe en Hagberg, NMR Biomed. 11: 148-56 (1.998), por ejemplo.

Un marcador en una muestra también se puede detectar o cuantificar, por ejemplo, por combinación del marcador con un resto de unión capaz de unir específicamente el marcador. El resto de unión puede incluir, por ejemplo, un miembro de un par ligando-receptor, es decir, un par de moléculas capaces de tener una interacción de unión específica. El resto de unión puede incluir también, por ejemplo, un miembro de un par de unión específico, tal como anticuerpo-antígeno, enzima-sustrato, ácido nucleico-ácido nucleico, proteína-ácido nucleico, proteína-proteína u otros pares de unión específicos conocidos en la técnica. Se puede diseñar que las proteínas de unión presenten afinidad mejorada por un objetivo. Opcionalmente, el resto de unión puede estar ligado con un marcador detectable, tal como un marcador de partículas enzimáticas, fluorescentes, radioactivas, fosforescentes o coloreadas. Se puede detectar el complejo marcado, por ejemplo, visualmente o con la ayuda de un espectrofotómetro u otro detector o se pueden cuantificar.

Los marcadores medidos en la presente invención se pueden detectar usando un inmunoensayo. Por ejemplo, un estuche de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar Gal-3 está comercialmente disponible (Bender Medsystems, Viena, Austria). Además, se pueden obtener comercialmente anticuerpos que se unen a BNP. Ejemplos de anticuerpos comercialmente disponibles que se unen a BNP son anticuerpo policlonal anti-humano BNP de conejo (Biodesign International), anticuerpo policlonal de 1-20 aminoácidos anti-BNP de conejo (Biodesign International), anticuerpo monoclonal anti-humano BNP (Immundiagnostik) y anticuerpo policlonal de 1-10 aminoácidos anti-humano BNP de conejo (Immundiagnostik).

Un inmunoensayo se puede realizar poniendo en contacto una muestra de un individuo que se va a ensayar con un anticuerpo apropiado en condiciones de manera que pueda tener lugar la unión inmuno-específica si está presente el marcador y detectar o medir la cantidad de toda unión inmuno-específica mediante el anticuerpo. Se puede usar cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo, sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como métodos Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), ensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

En un inmunoensayo sándwich, generalmente se usan dos anticuerpos capaces de unir un marcador, por ejemplo, uno inmovilizado sobre un soporte sólido y uno libre en disolución y marcado con un compuesto químico detectable. Ejemplos de marcas químicas que se pueden usar para el segundo anticuerpo incluyen radioisótopos, compuestos fluorescentes y enzimas u otras moléculas que generan productos coloreados o activos electroquímicamente cuando se exponen a un agente reaccionante o sustrato enzimático. Cuando una muestra que contiene el marcador se pone en el sistema, el marcador se une a los dos, el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo marcado, para formar un complejo inmunitario "sándwich" sobre la superficie del soporte. El marcador complejado se detecta quitando por lavado los componentes de la muestra no unidos y el anticuerpo marcado en exceso y midiendo la cantidad de anticuerpo marcado complejado con el marcador sobre la superficie del soporte. Alternativamente, el anticuerpo libre en disolución, que puede estar marcado con un resto químico, por ejemplo, un hapteno, se puede detectar mediante un tercer anticuerpo marcado con un resto detectable que se une al anticuerpo libre o, por ejemplo, el hapteno acoplado al mismo.

Tanto los procedimientos de inmunoensayo sándwich como inmunohistoquímico sobre tejidos son altamente específicos y muy sensibles, siempre que se usen marcas con buenos límites de detección. Una revisión detallada de diseño de ensayo inmunológico, teoría y protocolos se pueden encontrar en numerosos textos en la técnica, incluyendo Butt, W. R., Practical Immunology, ed. Marcel Dekker, Nueva York (1.984) y Harlow et al. Antibodies, A Laboratory Approach, ed. Cold Spring Harbor Laboratory (1.988).

En general, las consideraciones de diseño del inmunoensayo incluyen la preparación de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales) con especificidad de unión suficientemente alta para que el objetivo forme un complejo que se pueda distinguir de manera fiable a partir de productos de interacciones no específicas. Como se usa en la presente memoria, la terminología "anticuerpo" se entiende que significa unir proteínas, por ejemplo, anticuerpos u otras proteínas que comprenden un dominio de unión de tipo región variable de inmunoglobulina, con las afinidades de unión apropiadas y especificidades para el objetivo. Cuanto mayor es la especificidad de unión de anticuerpo, menor la concentración de objetivo que se puede detectar. Como se usa en la presente memoria, las terminologías "unión específica" o "unir específicamente" se entiende que significan que el resto de unión, por ejemplo, una proteína de unión, presenta una afinidad de unión para el objetivo mayor que aproximadamente $10^5 M^{-1}$, más preferiblemente mayor que aproximadamente $10^7 M^{-1}$.

Los anticuerpos para un marcador de objetivo aislado que son útiles en ensayos para detectar insuficiencia cardíaca en un individuo se pueden generar usando procedimientos inmunológicos estándar bien conocidos y descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Practical Immunology*, *supra*. En pocas palabras, se usa un marcador aislado para poner anticuerpos en un hospedador xenogénico, tal como un ratón, cabra u otro mamífero adecuado. El marcador se combina con un adyuvante adecuado capaz de mejorar la producción de anticuerpos en el hospedador y se inyecta en el hospedador, por ejemplo, por administración intraperitoneal. Se puede usar cualquier adyuvante adecuado para estimular la respuesta inmunitaria del hospedador. Un adyuvante usado comúnmente es el adyuvante completo de Freund (una emulsión que comprende células microbianas muertas y secadas y disponibles en, por ejemplo, Calbiochem Corp., San Diego o Gibco, Grand Island, NY). En el caso de que se deseen múltiples inyecciones de antígeno, las posteriores inyecciones pueden comprender el antígeno junto con un adyuvante incompleto (por ejemplo, emulsión sin células). Se pueden aislar anticuerpos policlonales del hospedador que produce anticuerpos por extracción de suero que contiene anticuerpos de la proteína de interés. Se pueden producir anticuerpos monoclonales aislando células hospedadoras que producen el anticuerpo deseado, fusionando estas células con células de mieloma usando procedimientos estándar conocidos en la técnica inmunológica e investigando células de híbrido (hibridomas) que reaccionen específicamente con el objetivo y tengan la afinidad de unión deseada.

También se pueden producir de manera biosintética dominios de unión de anticuerpos y manipular la secuencia de aminoácidos del dominio de unión para mejorar la afinidad de unión con un epítipo preferido en el objetivo. Las metodologías de anticuerpos específicas se entienden y se describen en la bibliografía. Una descripción más detallada de su preparación se puede encontrar, por ejemplo, en *Practical Immunology*, (*supra*).

Además, los sitios de unión de anticuerpo biosintético de ingeniería sintética, también conocidos en la técnica como BABS o sFv, se pueden usar para determinar si una muestra contiene un marcador. Métodos para preparar y usar BABS que comprenden: (i) dímeros V_H-V_L sintéticos asociados mediante enlaces no covalentes o unidos a disulfuro, (ii) sitios de unión de una sola cadena V_H-V_L unidos mediante enlaces covalentes, (iii) dominios V_H o V_L individuales o (iv) sitios de unión a anticuerpo de una sola cadena se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos.: 5.091.513; 5.132.405; 4.704.692 y 4.946.778. Además, BABS con la especificidad requerida para el marcador puede proceder de clonación de anticuerpos de fago de bibliotecas de genes combinatorias (véase, por ejemplo, Clackson et al. *Nature* 352: 624-628 (1.991)). En pocas palabras, en los fagos, expresándose cada uno en sus superficies de revestimiento BABS con regiones variables de inmunoglobulinas codificadas por secuencias de genes de la región variable procedentes de ratones preinmunizados con un marcador aislado o un fragmento del mismo, se investiga la actividad de unión frente al marcador inmovilizado. Los fagos que se unen al marcador inmovilizado se recogen y se secuencian el gen que codifica las BABS. Las secuencias de ácidos nucleicos resultantes que codifican las BABS de interés se pueden expresar entonces en sistemas de expresión convencionales para producir la proteína BABS.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Modelos Animales de Diabetes y Administración de agonistas PPAR- γ y los TZD

Se desarrolló el diseño experimental completo para caracterizar huellas de biomarcadores para tres medicinas usadas en el tratamiento de la Diabetes Sacarina de Tipo 2 (T2DM) – maleato de rosiglitazona (Rosi), gliburida (Gly) y metformina (Met). Para cumplir este objetivo, se evaluó la respuesta al fármaco en dos modelos de ratones experimentales de T2DM.

Un modelo de ratón fue el modelo de obesidad inducida por a dieta (HFD) en que se pusieron ratones C57BL/6 a dieta de alto contenido en grasa. Esta cepa de ratones es genéticamente susceptible a obesidad inducida por la dieta, hiperglucemia e hiperinsulinemia (Surwit et al. *Diabetes*. 37: 1.163-7 (1.988)). Cuando se pusieron a dieta de alto contenido en carbohidratos simples, de alto contenido en grasa (58% kcal de grasa) durante 8-12 semanas, estos animales desarrollaron obesidad, hiperglucemia suave e hiperinsulinemia. Estos ratones también desarrollaron un fenotipo característico de dislipidemia, incluyendo colesterol elevado, triglicéridos y ácidos grasos libres.

El otro modelo de ratón fue el modelo de ratón db/db (DB) de T2DM. El ratón db/db es un modelo genético ampliamente usado de T2DM caracterizado por hiperglucemia moderada a grave e hiperinsulinemia (Hummel et al.

Science. 153: 1.127-8 (1.966)). Estos ratones presentan una mutación espontánea en el receptor de leptina, *lepr*, y transducción de la señal mediada por leptina anormal, que da como resultado comer en exceso de manera crónica. La insulina elevada en plasma aparece entre 10-14 días, la obesidad es destacada a las 3-4 semanas de edad y la hiperglucemia es evidente a las 4-8 semanas de edad. Los triglicéridos en suero (TG) y los ácidos grasos libres (FFA) también están elevados. Se usaron ratones db/db en el fondo de C57BL.

Se usaron ratones C57BL/6 de cepa natural como controles no diabéticos para los ratones HFD. Se usaron ratones db/+ como controles no diabéticos para los ratones DB. Los ratones de control recibieron las mismas dosis de fármaco en estudio que los ratones modelo de la enfermedad. Se usaron ratones macho para todos los estudios.

Consideraciones del Tamaño de las Muestras:

En estudios piloto, los cálculos del tamaño de la muestra para la plataforma de transcriptómica se realizaron en ratones db/db. Para evaluar el poder para detectar la expresión diferencial entre genes relevantes biológicamente, se recopiló una lista de 78 genes relacionados metabólicamente para T2DM de la bibliografía. El análisis de tejido hepático para animales db/+ y db/db demostró que usando un error de tipo I de 0,05, de cambio de veces de 2 y potencia de 0,8, eran suficientes 10 animales por grupo para identificar 61,5% de las 78 transcripciones seleccionadas como expresadas de manera diferencial. De este análisis, se determinó que 10 animales por grupo de tratamiento identificarían de manera adecuada biomarcadores de interés.

Protocolo de Animales:

Estudios DB06 y DB07

Se pidieron ratones db/db y db/+ de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) y llegaron con 4 semanas de edad. Se encerraron los ratones en grupos de cinco en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12-horas y a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 1 semana de cuarentena, se aclimataron los ratones a las condiciones de estudio durante 3 semanas. Se mantuvo a los ratones con pienso para roedores estándar (Purina 5001; TestDiet, Richmond, IN). Todos los ratones tuvieron libre acceso al agua durante todo el experimento. A las 7 semanas de edad, se recogió una muestra de sangre y se asignaron los ratones a uno de los grupos de los grupos de tratamiento basándose en niveles promedio de glucosa en plasma. Se administró por vía oral a los ratones vehículo (metilcelulosa al 0,5%) o Rosi (10 mg/kg) en vehículo o Gly (10 mg/kg) en vehículo o Met (75 mg/kg) en vehículo durante 14 días empezando a las 8 semanas de edad. Todos los tratamientos se dieron vía alimentación oral forzada (10 ml/kg) y se realizó la dosificación dos veces/día a aproximadamente 8 de la mañana y 3 de la tarde.

Durante el periodo de tratamiento, se midió a diario el peso corporal la mañana previa a la dosificación. Se midió semanalmente la absorción de alimento empezando una semana antes del comienzo del estudio. Se evaluó la absorción de alimento dando una cantidad de alimento pesada previamente al comienzo de cada semana y restando el alimento restante al final de la semana.

El Día 14, se sometió a eutanasia a los ratones por dislocación cervical. Los tejidos (hígado, grasa subcutánea inguinal y músculo gastrocnemio) se recogieron y se prepararon para histología y análisis transcriptómico. Se registraron los pesos de hígado, grasa subcutánea, corazón y riñón. Para análisis histológico, se recogió una pequeña sección de cada tejido en formalina al 10% y se transfirió a etanol al 70% después de 24 h. En pocas palabras, para análisis transcriptómico, se enjuagó cada tejido con 2,0 a 5,0 ml de RNALater® (Ambion, Inc., Austin, TX) y se congeló en hielo seco y se transfirió para almacenamiento a más largo plazo a -80°C .

Estudios HFD06 y HFD07

Se pidieron ratones C57BL/6 macho de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) y llegaron con 4 semanas de edad. Se encerraron los ratones en grupos de cinco en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12-horas (h) y a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de una semana de cuarentena, se pusieron los ratones a dieta, o de HFD al 58% (D12331; Research Diets Inc., Nueva Brunswick, NJ) o de contenido en grasa estándar al 11% (D12329). Se mantuvieron los ratones en sus respectivas dietas durante la duración de los experimentos. Todos los ratones tuvieron libre acceso al agua durante todo el experimento.

Después de 7 semanas a dieta, se recogió una muestra de sangre y se asignaron los ratones a uno de cuatro grupos de tratamiento basándose en niveles promedio de glucosa en plasma. Se administró a los ratones por vía oral vehículo (metilcelulosa al 0,5%) o Rosi (10 mg/kg) en vehículo o Gly (10 mg/kg) en vehículo o Met (75 mg/kg) en vehículo durante 14 días empezando a las 8 semanas de edad. Todos los tratamientos se administraron por vía alimentación oral forzada (10 ml/kg) y la dosificación se realizó dos veces/día a aproximadamente las 8 de la mañana y las 3 de la tarde. Todos los tratamientos se administraron por vía alimentación oral forzada (10 ml/kg) y la dosificación se realizó dos veces/día a aproximadamente las 8 de la mañana y las 3 de la tarde.

Durante el periodo de tratamiento, se midió a diario el peso corporal la mañana previa a la dosificación. Se midió semanalmente la absorción de alimento empezando una semana antes del comienzo del estudio. Se evaluó la absorción de alimento dando una cantidad de alimento pesada previamente al comienzo de cada semana y restando el alimento restante al final de la semana.

El día 14, se sometió a los ratones a eutanasia por dislocación cervical. Los tejidos (hígado, grasa subcutánea inguinal y músculo gastrocnemio) se recogieron y se prepararon para histología y análisis transcriptómico. Se registraron los pesos de hígado, grasa subcutánea, corazón y riñón. Para análisis histológico, se recogió una pequeña sección de cada tejido en formalina al 10% y se transfirió a etanol al 70% después de 24 h. En pocas palabras, para análisis transcriptómico, se enjuagó cada tejido con 2,0 a 5,0 ml de PNA Later® (Ambion, Inc., Austin, TX) y se congeló en hielo seco y se transfirió para almacenamiento a más largo plazo a -80°C.

Valoraciones de Salud y Seguridad:

Se controló la salud general de los ratones en estudio diariamente mediante personal de investigación. Las valoraciones de la salud incluyeron observaciones visuales y mediciones diarias de peso corporal. Si en algún momento durante el estudio, los ratones mostraban síntomas de comportamiento de tensión o náuseas, tal como aletargamiento grave, postura encorvada, movimientos estereotípicos, respiración anormal o pérdida de peso extrema, se sometían a eutanasia de inmediato por inhalación de dióxido de carbono (CO₂).

Ejemplo 2: Perfil Transcripcional de Gal-3 y BNP en modelos de ratón T2DM

El análisis transcripcional (TA) de genes y las Etiquetas de Secuencias Expresadas (EST, por sus siglas en inglés) proporcionan información valiosa sobre procesos biológicos. Affymetrix GeneChip® Technology (Affymetrix, Santa Clara, CA) se puede usar para analizar cambios globales en la expresión de los genes. En resumen, esta tecnología usa ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de un estado experimental para obtener ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y por último, ácido ribonucleico complementario (ARNc) para hibridación para series GeneChips®. GeneChips® contienen sondas de ácidos nucleicos para cientos de secuencias que están unidas a una superficie sólida. Se usó la tecnología Affymetrix GeneChip® para ensayar cambios transcripcionales en tres tejidos (hígado, grasa subcutánea, músculo gastrocnemio) en los estudios preclínicos en animales en el Ejemplo 1. Se hibridaron muestras a la Serie Genoma de Ratón 430A de GeneChip®. Se obtuvieron niveles de intensidad de ARNm relativos para > 22.000 conjuntos de sondas usando Affymetrix Microarray Suite® versión 5.0 (MAS 5.0, Affymetrix Microarray Suite, Santa Clara, CA).

Los tejidos recogidos para análisis transcripcional incluían hígado, grasa subcutánea y músculo gastrocnemio el Día 14 de los estudios preclínicos en animales en el Ejemplo 1.

Preparación de la Muestra:

En el momento de la disección, se recogió un lóbulo de hígado (100 a 200 mg), una sección de grasa subcutánea (100 a 350 mg) y un músculo gastrocnemio (100 a 200 mg), se picaron finamente (1 a 3 mm) y se pusieron en 5 a 10 volúmenes de RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Crawfordsville, IN). Se usó RNeasy Lysis Buffer, una disolución de sulfato de amonio, para evitar la degradación de ARN durante los procedimientos experimentales. Las muestras se almacenaron en hielo seco y se transfirieron a un congelador a -80°C hasta tratamiento adicional.

Extracción de ARN:

Se pesó tejido de stocks de RNeasy Lysis Buffer, se transfirió a reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se homogeneizó usando el sistema MixAMill (Retsch, Haan, Alemania). Se centrifugó agua sin RNasa, cloroformo y el homogenizado de Trizol-tejido en un tubo Phase Lock Gel™ (PLG) (VWR International, West Chester, PA). Se recuperó sobrenadante acuoso claro de la capa superior del PLG, transferido a Minicolumnas RNeasy® (Qiagen Inc., Valencia, CA) y se trató según las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNase I como se recomendaba.

Se evaluó la integridad de ARN por relaciones de Densidad Óptica (DO) (Spetramax, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) y calidad ribosómica como se mide mediante los chips de ARN Agilent BioAnalyzer™ y software (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA).

Marcado de la Muestra:

Se usaron cinco microgramos de ARNm para cada muestra. Se llevó a cabo síntesis de ADNc (Invitrogen Carlsbad, CA) y nucleótidos biotinilados que incorporan transcripción *in vitro* (Enzo Biochem Inc., Farmingdale, NY) según procedimientos de operación estándar recomendados por Affymetrix. Se evaluó la calidad de marcado mediante los rendimientos de ARNc e integridad cuando se controla por chips de ARN y software de Agilent BioAnalyzer.

Adquisición de Datos:

Se cargaron cócteles de hibridación que contenían 10 µg de ARNc de muestras representativas sobre Serie Genoma de Ratón 430A GeneChip® y se hibridaron durante la noche. Se lavaron y se escanearon GeneChips® usando estaciones fluídicas y escáneres Affymetrix®. Se capturaron datos de intensidad mediante Sistema de Operación por Ordenador Genechip® (GCOS, por sus siglas en inglés) usando el algoritmo, MAS 5.0.

Tratamiento de Datos y Control de Calidad:

Se completó una inspección visual inicial de cada chip que comprobó el color uniforme, manchas o arañazos inesperados y alineación de rejilla apropiada. El control de calidad técnico (CC) de todos los datos de la microserie se realizó usando el software de análisis MAS 5.0. Además, se usó el software S-Plus® (Insightful Corp., Seattle, WA) y Simca-P™ (Umetrics, Umeå, Suecia) para realizar cálculos de correlación y proporcionar una visión general de los datos.

Para todos los datos transcriptómicos, los datos tratados se transformaron en logarítmicos (base 10) antes del análisis de los datos.

Los resultados indicados en las Tablas 1 y 2 son de un enfoque específico en los cambios en los ARNm para Galectina-3 (Gal-3) y Péptido Natriurético de Cerebro (BNP).

Métodos de Análisis de los Datos:

La estrategia de análisis de los datos total asumida en este estudio incluyó: a) realizar análisis de los datos univariante (UVDA), que incluye propuestas estadísticas estándar tales como análisis de la varianza (ANOVA) aplicado a analitos individuales por separado; b) realizar MVDA, que emplea un solo análisis estadístico que se aplica a analitos individuales conjuntamente; c) realizar análisis de correlación para identificar biomarcadores que se correlacionen con criterios principales de valoración, tales como glucosa, insulina y HbA1c; d) ensayar diferentes herramientas de análisis de rutas para probar y combinar resultados individuales en una comprensión de la ruta biológica más extensa y e) realizar diversos análisis estadísticos integrados en la muestra/tejido para identificar huellas comunes a través de plataformas y muestras. En general, todas estas propuestas se utilizaron dentro de cada conjunto de datos de la plataforma; sin embargo, debido a las ligeras diferencias en los datos de las plataformas, por ejemplo, mejor anotación de algunos datos de las plataformas que otros, no todos los análisis se realizaron en cada plataforma.

En las secciones a continuación, se describen consideraciones generales para análisis de datos relevantes para el estudio actual, seguido por detalles para cada una de las propuestas estadísticas y de análisis utilizadas.

Población de Análisis:

La "Población de Análisis" consistió en todos los ratones que no fueron excluidos debido a las razones enunciadas a continuación y tuvieron datos de una o más plataformas. La "Población de Análisis" fue la única población usada en el análisis de los datos. Se retiró un ratón del estudio debido a la muerte de un ratón, una brusca disminución en el peso corporal o un aspecto moribundo.

Comparaciones del Tratamiento:

Se hicieron comparaciones entre los ratones en cada fármaco y los ratones en vehículo o entre los ratones db/db y los db/+ o entre los ratones HFD y no HFD para identificar diferencias significativas relacionadas con la acción del fármaco y la enfermedad, respectivamente.

Biomarcadores de la Enfermedad:

Los biomarcadores de la enfermedad están relacionados con el fenotipo de la enfermedad (por ejemplo, db/db-específico) y se desarrollaron por comparación de los ratones db/db con vehículo a los ratones db+ tratados con vehículo o los ratones HFD tratados con vehículo a los ratones no HFD tratados con vehículo.

Biomarcadores de Efecto del Fármaco:

Se definieron biomarcadores de fármaco específicos de db/db como aquéllos que cambiaron significativamente por tratamiento con fármacos y se desarrollaron por comparación de los ratones db/db tratados con fármaco con los ratones db/db tratados con vehículo.

Se definieron biomarcadores de fármacos específicos de HFD como aquéllos que cambiaron de manera significativa por tratamiento con fármacos y se desarrollaron por comparación de los ratones HFD tratados con fármaco con los ratones no HFD tratados con vehículo.

Biomarcadores de Enfermedad y Fármaco:

Se definieron biomarcadores de enfermedad y fármacos como aquéllos que se vieron afectados de manera significativa tanto por el fármaco como por la enfermedad y se denominaron "biomarcadores de enfermedad y de fármacos".

Se definieron biomarcadores de fármaco por enfermedad como los biomarcadores que presentaban una interacción significativa fármaco-x-enfermedad y se denominaron "biomarcadores de fármaco por enfermedad".

Detección de Valores Atípicos:

En este estudio, se utilizó un método de detección de valores atípicos estadísticos para datos transcriptómicos de la plataforma en un intento por asegurar datos de alta integridad. Fue necesaria una aproximación estadística debido a se generaron varios cientos de puntos de datos en la plataforma transcriptómica y era imposible inspeccionar visualmente todos los puntos de datos para errores. Así, se utilizó una aproximación conservadora para retirar valores atípicos extremos que podían afectar de manera negativa a la capacidad para detectar trascendencia estadística. En este estudio, se utilizaron métodos de detección de valores atípicos univariante para identificar valores atípicos extremos.

Detección de Valores Atípicos Univariante:

Se usaron representaciones gráficas de cajas para definir valores atípicos extremos en los grupos de estudio que se tenían que excluir de los análisis. Se analizaron cohortes por separado para detección de valores atípicos. Todos los puntos de datos que hacían 2 veces los intervalos intercuartiles o por debajo del 25° percentil o por encima del 75° percentil se estimaron valores atípicos extremos.

Datos que Faltan:

Los valores de los datos que faltan fueron tratados “como tales” y no se realizó imputación.

Las razones para los datos que faltan incluían:

- Valores atípicos eliminados
- Ejemplar de muestra deficiente
- Muestras que no se recogieron
- Desalineación de picos o ruido químico en el espectro
- Valores por debajo del límite de detección
- Fallo del ensayo o datos que fallaron el CC técnico
- Se excluyeron del análisis los picos con 50% o más de valores que faltan en al menos uno de los diversos grupos enfermedad por fármaco

Criterios de Filtración de Biomarcadores:

Debido a que se realizaron muchos cientos de ensayos estadísticos, ensayar múltiples hipótesis (es decir, posibilidad aumentada de resultados positivos falsos) fue una cuestión importante. Por ejemplo, si se fueran a realizar simplemente ensayos de hipótesis independientes no corregidos al nivel del 5% tradicional, entonces se esperarían $10.000 \times 0,05 = 500$ falsos positivos si se ensayaran 10.000 biomarcadores y ninguno se expresara de manera diferencial verdaderamente. Por lo tanto, a la terminación del UVDA y MVDA, se usaron diversos límites estadísticos y criterios de filtración de biomarcadores para reducir el número de biomarcadores y ayudar a controlar el número de falsos positivos. Los tipos de límites estadísticos se describen a continuación y los límites específicos usados en los diversos análisis se indican en sus respectivas secciones.

Límites del Valor-P:

Para todos los ensayos estadísticos estándar, se generaron valores p para cada biomarcador y cada comparación de tratamiento. Como se describió en el ejemplo anterior, cuando se realizan muchos cientos o miles de ensayos estadísticos, un nivel α de 0,05 sin ningún ajuste para múltiples comparaciones puede conducir a un gran número de falsos positivos. Sin embargo, como una extensión del ejemplo anterior, reducir el límite del valor p de 0,05 a 0,001 reduce los falsos positivos esperados de 500 a 10 si se ensayaban 10.000 biomarcadores y ninguno se expresaba de manera diferencial verdaderamente. Además, debido a que se encontró que el valor FDR de 0,1, en algunos casos, era similar a un límite del valor p de 0,05, se usaron límites de valores p bajos para reducir además las listas de biomarcadores para interpretación biológica. En todos los casos, se usaron límites de valores p junto con valores FDR en un intento por entender mejor la relación entre valores p y valores FDR y por controlar los falsos positivos.

Proporción de Descubrimiento Falso:

Se evaluaron aproximaciones de FDR (Benjamini and Hochberg, J. R. Statist Soc. B. 57: 289-300 (1.995)) para controlar el número promedio de falsos positivos en la lista de biomarcadores seleccionados. En vez de controlar la proporción de errores de tipo familia, que se muy conservador controlando falsos positivos en todos los biomarcadores, FDR controla el porcentaje de falsos positivos sólo en el número de biomarcadores seleccionados. Para análisis de biomarcadores integrados se aplicó un límite de FDR de 25% ($FDR \leq 0,25$).

Veces de Cambio de la Mediana:

El VCM, que representa la cantidad de la mediana de cambio en un grupo comparado con otro, se usó para ayudar a reducir las listas de biomarcadores y controlar falsos positivos. Los límites de VCM representan un tipo de criterios de filtración biológica y representa las mínimas veces de cambio requeridas para indicar relevancia biológica. Para la mayoría de las listas de plataformas, el límite para relevancia biológica se fijó en un cambio de 1,2 veces ($VCM \geq 1,2$).

Límite de la Intensidad:

Se utilizó un límite de intensidad para los datos transcriptómicos, debido a que se sabe que los niveles de la intensidad usando software MAS 5.0 son menos precisos en el pequeño intervalo de expresión. Para ajustarse a esta limitación y ayudar a controlar de número de falsos positivos, se aplicó un criterio de intensidad. Se calculó el valor del factor de escala de la mediana generado a partir de MOE 430A GeneChip®. Este número se multiplicó después por la intensidad de un MOE 430A GeneChip® no despreciado o un factor de 32. Los límites de intensidad para hígado, gastrocnemio y grasa subcutánea se generaron de manera independiente y se aplicaron después de que se generaran listas de biomarcadores univariante. Se aplicó filtración de la intensidad por eliminación de grupos en que la mediana de ambos grupos de comparación estaba por debajo del valor límite de la intensidad procedente de cada tejido. En los casos en que un grupo estaba por encima del límite de detección y el otro estaba por debajo, se incluyó y se generó el biomarcador.

Análisis Univariante:

Se realizaron UVDA estándar en todos los conjuntos de datos finalizados. La aproximación UVDA examinó diversos efectos principales (por ejemplo, fármaco, enfermedad) e interacciones (por ejemplo, fármaco por enfermedad). Para UVDA, se ensayaron individualmente los biomarcadores.

Análisis de Varianza:

UVDA primario se basaba en ANOVA. El modelo ANOVA incluía efectos principales (fármaco y enfermedad), interacción de dos factores (fármaco por enfermedad) y otros factores de bloqueo experimentales, por ejemplo, día de hibridación para datos transcriptómicos. Para biomarcadores medidos en el último momento del tiempo sólo: Se realizó ANOVA usando sólo los datos del Día 14.

Resultados:

Se evaluó la utilidad de Gal-3 y BNP como marcadores en diabéticos tratados con un agonista PPAR-γ o una TZD. Se midieron los niveles de expresión de Gal-3 en modelo de diabetes (db/db y HFD) y ratones normales. Se elevó el nivel de ARNm de Gal-3 en tejido adiposo en los animales modelo de la enfermedad a niveles mayores que 4 veces el nivel de ARNm de Gal-3 en tejido adiposo de animales normales (véase la Tabla 1). Asimismo, el nivel de ARNm de Gal-3 en tejido muscular también fue elevado en los animales modelo de la enfermedad a niveles mayores que dos veces el nivel de ARNm de Gal-3 en tejido muscular de animales normales (véase la Tabla 1). El nivel de ARNm de Gal-3 en tejido hepático de los animales modelo de la enfermedad no fue significativamente diferente o sólo fue modestamente significativamente diferente, del nivel de Gal-3 en tejido hepático de animales normales (véase la Tabla 1). Así, en total, la expresión de Gal-3 aparece significativamente aumentada en animales diabéticos.

También se evaluaron los niveles de expresión de Gal-3 en ratones enfermos y sanos que se habían tratado con rosiglitazona, gliburida o metformina. El tratamiento de animales T2DM con rosiglitazona causa una reducción significativa de los niveles de ARNm de Gal-3 en tejido tanto adiposo como muscular (véase la Tabla 1). Además, la rosiglitazona elevó modestamente los niveles de ARNm de Gal-3 en tejido hepático en animales modelo de la enfermedad. Así, mientras aumentan los niveles de ARNm de Gal-3 en los tejidos adiposo y muscular de animales enfermos, el tratamiento con rosiglitazona reduce los niveles de ARNm de Gal-3 en estos mismos tejidos.

Ni el tratamiento con gliburida ni con metformina de los modelos de ratones de T2DM tuvo efecto significativo sobre los niveles de ARNm de Gal-3 en tejido adiposo, muscular o hepático en estos animales (véase la Tabla 1).

Además, se evaluaron los niveles de expresión de BNP tanto en animales no tratados como en animales que se están tratando con agonista PPAR-γ o una TZD. Los niveles de ARNm de BNP en tejido adiposo, hepático y muscular de los animales enfermos no son significativamente diferentes de los niveles de ARNm de Gal-3 en los mismos tejidos de animales normales (véase la Tabla 2). Similarmente, el tratamiento de los animales modelo de la enfermedad con rosiglitazona no presenta un efecto significativo sobre los niveles de ARNm de BNP en los tejidos adiposo, hepático o muscular en esos animales, excepto una modesta elevación en tejido adiposo en un modelo animal (véase la Tabla 2). Como los niveles de BNP no se ven afectados en animales enfermos o como respuesta a tratamiento con agonistas PPAR-γ o una TZD, se pueden hacer comparaciones de niveles de BNP para evaluar la presencia o la progresión de insuficiencia cardíaca en diabéticos con niveles de BNP en no diabéticos o con niveles de BNP en diabéticos que se sabe que desarrollan insuficiencia cardíaca.

Tabla 1. Niveles de ARN de Galectina-3 en Modelos Animales T2DM de Ratón

Tipo de ARNm	Tipo de Tejido	Modelo Animal y Estudio	Comparación Estadística Grupo A/ Grupo B	Valor p de FDR	Valor p bruto	VCM	Dirección y Significación
Galectina-3	Adiposo	DB-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	<1,00E-8	2,38E-26	4,77	Aumenta Signif
Galectina-3	Adiposo	DB-06	Rosi/Enfermedad	3,60E-07	1,55E-08	0,55	Disminuye Signif
Galectina-3	Hígado	DB-06	Enfermedad/ Normal Vehicle	0,807	0,596	0,99	Disminuye NS
Galectina-3	Hígado	DB-06	Rosi/Enfermedad	0,135	0,026	1,33	Aumenta Signif
Galectina-3	Músculo	DB-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	<1,00E-8	5,26E-16	2,70	Aumenta Signif
Galectina-3	Músculo	DB-06	Rosi/Enfermedad	0,974	0,101	0,87	Disminuye Signif
Galectina-3	Adiposo	DB-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	<1,00E-8	4,32E-17	3,83	Aumenta Signif
Galectina-3	Adiposo	DB-07	Gliburida/ Enfermedad	0,854	0,331	1,10	Aumenta NS
Galectina-3	Adiposo	DB-07	Metformina/ Enfermedad	0,793	0,346	1,10	Aumenta NS
Galectina-3	Hígado	DB-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,772	0,611	0,94	Disminuye NS
Galectina-3	Hígado	DB-07	Gliburida/ Enfermedad	0,999	0,922	1,01	Aumenta NS
Galectina-3	Hígado	DB-07	Metformina/ Enfermedad	0,982	0,681	1,06	Aumenta NS
Galectina-3	Músculo	DB-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	<1,00E-8	6,76E-17	3,28	Aumenta Signif
Galectina-3	Músculo	DB-07	Gliburida/ Enfermedad	0,999	0,177	1,19	Aumenta NS

(continúa)

Tipo de ARNm	Tipo Tejido	Modelo Animal y Estudio	Comparación Estadística Grupo A/ Grupo B	Valor p FDR	Valor p bruto	VCM	Dirección y Significación
Galectina-3	Músculo	DB-07	Metformina/ Enfermedad	0,99	0,498	0,90	Disminuye NS
Galectina-3	Adiposo	HFD-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,220	0,020	1,36	Aumenta Signif
Galectina-3	Adiposo	HFD-06	Gliburida/ Enfermedad	0,999	0,922	1,04	Aumenta NS
Galectina-3	Adiposo	HFD-06	Metformina/ Enfermedad	0,877	0,401	1,08	Aumenta NS
Galectina-3	Hígado	HFD-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,173	0,018	0,75	Disminuye Signif
Galectina-3	Hígado	HFD-06	Gliburida/ Enfermedad	0,942	0,841	1,02	Aumenta NS
Galectina-3	Hígado	HFD-06	Metformina/ Enfermedad	0,998	0,656	1,08	Aumenta NS
Galectina-3	Músculo	HFD-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,894	0,458	1,27	Aumenta NS
Galectina-3	Músculo	HFD-06	Gliburida/ Enfermedad	0,999	0,641	0,87	Disminuye NS
Galectina-3	Músculo	HFD-06	Metformina/ Enfermedad	0,999	0,875	0,82	Disminuye NS
Galectina-3	Adiposo	HFD-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,204	0,049	1,38	Aumenta Signif
Galectina-3	Adiposo	HFD-07	Rosi/Enfermedad	0,024	0,004	0,64	Disminuye Signif
Galectina-3	Hígado	HFD-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,017	0,002	0,57	Disminuye Signif
Galectina-3	Hígado	HFD-07	Rosi/Enfermedad	0,972	0,532	1,07	Aumenta NS
Galectina-3	Músculo	HFD-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,999	0,681	1,04	Aumenta NS

(continúa)

Tipo de ARNm	Tipo de Tejido	Modelo Animal y Estudio	Comparación Estadística Grupo A/ Grupo B	Valor p de FDR	Valor p bruto	VCM	Dirección y Significación
Galectina-3	Músculo	HFD-07	Rosi/Enfermedad	0,999	0,050	0,80	Disminuye NS

Abreviaturas para las Tablas 1 y 2

DB06 = Estudio 06 con modelo de ratón (db/db) eliminado con receptor de leptina de Diabetes de Tipo 2
 DB07 = Estudio 07 con ratón db/db
 HFD06 = Estudio 06 con modelo de ratón con dieta con alto contenido en grasa de Diabetes de Tipo 2
 HFD07 = Estudio 07 con ratón con dieta con alto contenido en grasa
 FDR = Proporción de Descubrimientos Falsos (véase
 VCM = Veces de cambio de la mediana (proporción de valor de la mediana de ARNm de Galectina-3 en el Grupo A a valor de la mediana de ARNm de Galectina-3 en el Grupo B)
 Signif= Diferencia significativa entre los valores de la mediana del Grupo A y el Grupo B para ARNm de Galectina-3
 NS = Diferencia No Significativa basada en comparación estadística de valores de ARNm de Galectina-3 en el Grupo A y el Grupo B

Tabla 2. ARNm de BNP Niveles en Modelos Animales T2DM de Ratón

Tipo de ARNm	Tipo Tejido	Modelo Animal y Estudio	Comparación Estadística Grupo A/ Grupo B	Valor p FDR	Valor p bruto	VCM	Dirección y Significación
BNP	Adiposo	DB-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,230	0,107	0,74	Disminuye NS
BNP	Adiposo	DB-06	Rosi/Enfermedad	0,368	0,184	1,13	Aumenta NS
BNP	Hígado	DB-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,350	0,128	0,67	Disminuye NS
BNP	Hígado	DB-06	Rosi/Enfermedad	0,793	0,559	1,68	Aumenta NS
BNP	Músculo	DB-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,928	0,776	1,43	Aumenta NS
BNP	Músculo	DB-06	Rosi/Enfermedad	1,000	0,234	0,58	Disminuye NS
BNP	Adiposo	DB-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,531	0,385	0,99	Disminuye NS
BNP	Adiposo	DB-07	Gliburida/ Enfermedad	0,790	0,198	1,02	Aumenta NS
BNP	Adiposo	DB-07	Metformina/ Enfermedad	0,991	0,957	0,87	Disminuye NS
BNP	Hígado	DB-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,298	0,128	1,04	Aumenta NS
BNP	Hígado	DB-07	Gliburida/ Enfermedad	1,000	0,406	0,85	Disminuye NS
BNP	Hígado	DB-07	Metformina/ Enfermedad	0,900	0,147	0,88	Disminuye NS

(continúa)

Tipo de ARNm	Tipo Tejido	Modelo Animal y Estudio	Comparación Estadística Grupo A/ Grupo B	Valor p FDR	Valor p bruto	VCM	Dirección y Significación
BNP	Músculo	DB-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,474	0,212	1,46	Aumenta NS
BNP	Músculo	DB-07	Gliburida/ Enfermedad	1,000	0,462	0,83	Disminuye NS
BNP	Músculo	DB-07	Metformina/ Enfermedad	1,000	0,464	1,09	Aumenta NS
BNP	Adiposo	HFD-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,927	0,680	0,94	Disminuye NS
BNP	Adiposo	HFD-06	Gliburida/ Enfermedad	1,000	0,673	1,16	Aumenta NS
BNP	Adiposo	HFD-06	Metformina/ Enfermedad	0,638	0,005	0,67	Disminuye NS
BNP	Hígado	HFD-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,804	0,490	1,08	Aumenta NS
BNP	Hígado	HFD-06	Gliburida/ Discasa	0,843	0,622	0,93	Disminuye NS
BNP	Hígado	HFD-06	Metformina/ Enfermedad	1,000	0,892	1,03	Aumenta NS
BNP	Músculo	HFD-06	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,967	0,784	0,52	Disminuye NS
BNP	Músculo	HFD-06	Gliburida/ Discasa	1,000*	0,031*	3,17	Aumenta NS
BNP	Músculo	HFD-06	Metformina/ Enfermedad	0,999	0,514	2,17	Aumenta NS
BNP	Adiposo	HFD-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,540	0,280	0,85	Disminuye NS
BNP	Adiposo	HFD-07	Rosi/Enfermedad	0,103	0,033	1,29	Aumenta Signif
BNP	Hígado	HFD-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	0,971	0,931	0,94	Disminuye NS
BNP	Hígado	HFD-07	Rosi/Enfermedad	0,978	0,595	0,77	Disminuye NS
BNP	Músculo	HFD-07	Enfermedad/ Vehículo Normal	1,000	0,366	1,23	Aumenta NS
BNP	Músculo	HFD-07	Rosi/Enfermedad	1,000	0,480	1,40	Aumenta NS

(continúa)

Tipo de ARNm	Tipo Tejido	Modelo Animal y Estudio	Comparación Estadística Grupo A/ Grupo B	Valor p FDR	Valor p bruto	VCM	Dirección y Significación
BNP	Músculo	Clinical	Rosi/Placebo	0,588	0,102	0,63	Disminuye NS
Véase la Tabla 1 para explicación de las abreviaturas.							

Ejemplo 3: Valoración de Riesgo Cardíaco Congestivo Usando Gal-3 como un Marcador

- 5 Se controlan riesgos cardíacos congestivos en un paciente de diabetes humano que experimenta tratamiento con rosiglitazona detectando niveles de proteína Gal-3 en la sangre. Se establecen los niveles de pretratamiento de Gal-3 para el paciente por detección de los niveles de Gal-3 en una muestra de sangre inicial. Se obtienen muestras adicionales de sangre del paciente en diversos momentos después de la iniciación del tratamiento. Se detectan los niveles de proteína Gal-3 en las muestras de sangre usando cualquier método conocido en la técnica, tal como
- 10 ELISA. Los niveles de proteína Gal-3 observados o una tendencia en los niveles de proteína Gal-3 observada durante el curso del tratamiento, se comparan con una concentración o tendencia procedente de los datos observados en pacientes de diabetes pasados tratados con rosiglitazona para determinar si los niveles de Gal-3 en el paciente indican un riesgo cardíaco congestivo particular en el paciente. Si se aumentan por ejemplo los niveles de Gal-3 durante el curso de tratamiento con rosiglitazona, se identifica que el paciente presenta un riesgo cardíaco
- 15 congestivo elevado comparado con otros pacientes tratados con rosiglitazona. Se interrumpe el tratamiento con rosiglitazona y se evalúan opciones terapéuticas alternativas para tratar o controlar la diabetes del paciente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva en un paciente al que se está administrando una tiazolidinodiona, comprendiendo el método:
 - detectar la presencia o ausencia de una concentración aumentada de galectina-3 en una muestra de fluido corporal de un paciente que se está tratando con una tiazolidinodiona, en el que la presencia de una concentración aumentada de galectina-3 con el tiempo es indicativa de un riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva aumentada en el paciente.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, que comprende comparar una concentración de galectina-3 durante el curso de tratamiento con la tiazolidinodiona con una concentración de galectina-3 más temprana durante el curso del tratamiento.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, que comprende comparar concentraciones de galectina-3 en diversos momentos durante el curso del tratamiento con la tiazolidinodiona, para permitir de ese modo el desarrollo de una historia de dichas concentraciones.
- 20 4. Un método para evaluar un candidato para el tratamiento con una tiazolidinodiona, comprendiendo el método:
 - medir una concentración de galectina-3 en una muestra de fluido corporal de un paciente con una afección tratable con una tiazolidinodiona;
 - comparar la concentración de galectina-3 medida con una concentración de galectina-3 de referencia, en la que la concentración de galectina-3 de referencia procede de concentraciones de galectina-3 en otros
 - 25 pacientes con la afección y es indicativo de riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes con la afección y
 - recomendar que se restrinja o interrumpa esa administración de la tiazolidinodiona si la concentración medida de galectina-3 excede la concentración de galectina-3 de referencia.
- 30 5. El método según la reivindicación 4, en el que el método comprende rechazar la administración de la tiazolidinodiona si la concentración medida de galectina-3 excede la concentración de galectina-3 de referencia.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la tiazolidinodiona es rosiglitazona.
- 35 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de fluido corporal comprende sangre, suero o plasma.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el paciente es un paciente de diabetes.
- 40 9. Un método para evaluar riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva en un paciente al que se está administrando un agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma, comprendiendo el método:
 - detectar la presencia o ausencia de una concentración aumentada de galectina-3 en una muestra de fluido
 - 45 corporal de un paciente que se está tratando con un agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma,
 - en el que la presencia de una concentración aumentada de galectina-3 con el tiempo es indicativa de un riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva aumentada en el paciente.
- 50 10. Un método según la reivindicación 9, que comprende comparar una concentración de galectina-3 durante el curso de tratamiento con el agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma, con una concentración de galectina-3 más temprana durante el curso del tratamiento.
- 55 11. El método según la reivindicación 10, que comprende comparar concentraciones de galectina-3 en diversos momentos durante el curso de tratamiento con el agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma, para permitir de ese modo del desarrollo de una historia de dichas concentraciones.
12. Un método según la reivindicación 9, en el que el agonista de receptor γ activador de proliferador de peroxisoma, es una tiazolidinodiona.
- 60 13. Un método según la reivindicación 12, en el que la tiazolidinodiona es rosiglitazona.
14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que la muestra de fluido corporal comprende sangre, suero o plasma.
- 65 15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que el paciente es un paciente de diabetes.