

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 384**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2016 PCT/IB2016/050583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16132244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2016 E 16706260 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3259368**

54 Título: **Métodos para diagnosticar la enfermedad valvular crónica**

30 Prioridad:

17.02.2015 US 201562117189 P

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

17.04.2020

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

LI, QINGHONG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 754 384 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

Métodos para diagnosticar la enfermedad valvular crónica

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Campo de la invención

10 La invención se refiere de manera general a la utilización de microARN (miARN) asociado a la enfermedad valvular crónica para el diagnóstico y la predicción de la enfermedad valvular crónica en un cánido.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las enfermedades cardíacas son uno de los trastornos más comunes en perros. La enfermedad valvular crónica (EVC), también conocida como enfermedad mitral degenerativa (EMD) afecta a aproximadamente 9% de todos los perros, incrementándose con la edad de manera que la incidencia acumulada global es superior a 40%. La EVC se caracteriza por una degeneración y deformación progresivas de las válvulas auriculoventriculares, más comúnmente las válvulas mitrales, dando como resultado la insuficiencia precoz de la válvula mitral. Esto, a su vez, conduce a la aparición de un murmullo cardíaco sistólico debido a la regurgitación mitral, en la que el cierre inadecuado de la válvula mitral provoca que el reflujo de sangre hacia la aurícula izquierda. Los perros afectados finalmente desarrollan sobrecarga de volumen auriculoventricular izquierdo, edema pulmonar, dilatación auricular y arritmias supraventriculares.

25 Aunque el tratamiento quirúrgico o médico de las válvulas afectadas resulta posible, los propietarios de las mascotas prefieren la intervención nutricional. La detección y tratamiento precoces son imperativos; sin embargo, la detección puede resultar difícil debido a la ausencia de síntomas. Una solicitud de patente n° (PCT/US201344011) (publicada como WO 2014/196957) describe métodos para diagnosticar la EVC utilizando genes y metabolitos expresados diferencialmente. Sin embargo, los métodos de expresión génica requieren la recolección de tejidos cardíacos, lo que se considera invasivo. Además, el ARNm no es muy estable y puede resultar difícil de manipular experimentalmente. 30 Además, la medición de metabolitos del suero sanguíneo puede resultar difícil dependiendo de la naturaleza y estabilidad bioquímicas de los compuestos. Hulanicka et al. (BMC Veterinary Research 2014, 10:205) describe miARN plasmáticos como biomarcadores potenciales de enfermedad valvular degenerativa crónica en perros de raza Dachshund.

35 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de diagnóstico y predicción de la EVC en animales para proporcionar el nivel más apropiado y eficaz de tratamiento.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

40 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una utilización in vitro del miARN para el diagnóstico y la predicción de la enfermedad valvular crónica en cánidos.

45 Este y otros objetivos se consiguen utilizando microARN (miARN) que comprende miR-103, miR-98, let-7c, let-7b, miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b y combinaciones de los mismos, para el diagnóstico de la enfermedad valvular crónica en un cánido. La utilización preferentemente comprende las etapas de analizar una muestra biológica obtenida de un cánido para una cantidad de un miARN asociado a enfermedad valvular crónica, en la que el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-103, miR-98, let-7c, let-7b, miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b, y combinaciones de los mismos, comparando la cantidad de miARN identificada en la muestra obtenida del cánido con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra procedente de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar la enfermedad valvular crónica en el cánido en el caso de que el miARN observado en la muestra del cánido se exprese diferencialmente en la muestra del animal del control.

55 Otros objetivos, y objetivos, características y ventajas adicionales de la presente invención, resultarán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

60 El término "animal" se refiere a cualquier animal susceptible de sufrir o que sufre enfermedad valvular crónica, incluyendo seres humanos, aves, animales bovinos, equinos, felinos, caprinos, lobos, murinos, ovinos o porcinos.

65 El término "miARN" o "biomarcador" se refiere a una molécula pequeña de cadena sencilla de ARN no codificante, incluyendo las que contienen aproximadamente 21 a 25 nucleótidos, los niveles o intensidades de las cuales se miden en una muestra biológica, que pueden utilizarse como marcadores para diagnosticar un estado de enfermedad.

La expresión “expresión diferencial” o “expresado diferencialmente” se refiere a una expresión de miARN incrementada o regulada positivamente o se refiere a una expresión de miARN reducida o regulada negativamente según se detecta por la ausencia, presencia o cambio en la cantidad de miARN en una muestra.

5 La expresión “animal de control comparable” se refiere a un animal de la misma especie o tipo o un animal individual evaluado en dos tiempos diferentes.

10 La expresión “cantidad correspondiente” se refiere a una cantidad de un miARN de un animal de control comparable que se corresponde al miARN de un animal en el que se ha diagnosticado enfermedad valvular crónica, en el que el miARN se asocia a enfermedad valvular crónica.

15 La expresión “animales de compañía” se refiere a animales domesticados, tales como perros, gatos, aves, conejos, cobayas, hurones, hámsters, ratones, jerbos, caballos de paseo, vacas, cabras, ovejas, burros, cerdos y especies más exóticas criadas por seres humanos para compañía, ocio, apoyo psicológico, exhibición extrovertida y todas las demás funciones que el ser humano necesita compartir con animales de otras especies. En un aspecto, animal de compañía puede referirse a un perro o a un gato. En un aspecto específico, animal de compañía puede referirse a un perro.

20 El término “diagnosticar” se refiere a determinar si un animal está sufriendo de, o se predice que el animal es susceptible de sufrir de, enfermedad valvular crónica.

25 La expresión “estadio temprano” se refiere a insuficiencia cardiaca (IC) de estadio B con agrandamiento cardiaco leve a moderado, aunque sin signos clínicos de insuficiencia cardiaca (IC) según las directrices para el diagnóstico de la IC de la American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM).

La expresión “estadio terminal” se refiere a IC de estadio C con signos clínicos de IC moderada según las directrices de la ACVIM.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, los intervalos se utilizan en la presente memoria en forma abreviada a fin de evitar el listado y descripción de todos y cada uno de los valores dentro de los intervalos. Puede seleccionarse cualquier valor apropiado dentro del intervalo, en caso apropiado, como el valor superior, valor inferior o extremo del intervalo.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, la forma singular de un término incluye el plural, y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, las referencias a “un” o “una” y “el” o “la” son generalmente inclusivas de los plurales de los términos respectivos. Por ejemplo, la referencia a “un método” incluye una pluralidad de tales “métodos”. De manera similar, los términos “comprende” y “que comprende” deben interpretarse de manera inclusiva y no excluyente. De manera similar, los términos “incluye”, “que incluye” y “o” deben interpretarse todos como inclusivos, a menos que dicha construcción resulta claramente prohibida por el contexto.

40 Los métodos y composiciones y otros avances dados a conocer en la presente memoria no se encuentran limitados a metodologías, protocolos y reactivos particulares indicados en la presente memoria debido a que, tal como apreciará el experto en la materia, pueden variar. Además, la terminología utilizada en la presente memoria es para el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende limitar, y no limita, el alcance de lo dado a conocer o de lo reivindicado.

50 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos, términos del campo y acrónimos utilizados en la presente memoria presentan los significados entendidos habitualmente por el experto ordinario en la materia en el campo o campos de la invención, o en el campo o campos en que se utilizan los términos.

55 El comentario de las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, artículos técnicos y/o académicos, y otras referencias citadas o señaladas en la presente memoria pretende meramente resumir las afirmaciones realizadas en los mismos. No se realiza admisión alguna de que cualquiera de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones o referencias, o cualquier parte de los mismos, sea relevante, material o técnica anterior. Se reserva específicamente el derecho de comprobar la exactitud y pertinencia de cualquier afirmación de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones y otras referencias como relevante, material o técnica anterior

La invención

60 Los presentes inventores han encontrado que el miARN indicado en la presente memoria puede encontrarse presente en la muestra biológica de un animal canino y que la cantidad del miARN en la muestra puede servir de indicador bioquímico para el diagnóstico de la enfermedad valvular crónica al indicar o predecir el umbral para la enfermedad valvular crónica. De esta manera, el presente resultado encontrado permite al veterinario y otros profesionales clínicos llevar a cabo ensayos para estos “biomarcadores” en una muestra y determinar si el animal es susceptible de sufrir de enfermedad valvular crónica y si existe una necesidad de un diagnóstico o tratamiento adicional. Tras establecer la

necesidad de un diagnóstico o tratamiento adicional, puede justificarse el coste y riesgo de tal diagnóstico o tratamiento adicional.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la invención proporciona un microARN (miARN) que comprende miR-103, miR-98, let-7c, let-7b, miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b y combinaciones de los mismos, para el diagnóstico de la enfermedad valvular crónica en un animal canino. En una realización, la utilización puede comprender el análisis de una muestra biológica obtenida del animal canino para una cantidad de un microARN (miARN) asociada a enfermedad valvular crónica, comparando la cantidad del miARN identificado en la muestra obtenida del animal canino con una cantidad correspondiente de miARN presente en la muestra procedente de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de miARN observada en la muestra del animal canino se exprese diferencialmente en la muestra del animal de control, en el que el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-103, miR-8, let-7c, let-7b, miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b y combinaciones de los mismos.

En una realización, la utilización para el diagnóstico de enfermedad valvular crónica en un animal canino puede comprender el análisis de una muestra biológica obtenida del animal canino para una cantidad de un miARN asociada a enfermedad valvular crónica, comparando la cantidad del miARN identificado en la muestra obtenida del animal canino con una cantidad correspondiente de miARN presente en la muestra procedente de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de miARN observada en la muestra del animal canino sea superior a la cantidad de miARN presente en la muestra del animal de control, en el que el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-103, miR-8, let-7c, let-7b y combinaciones de los mismos.

En otra realización, la utilización para el diagnóstico de enfermedad valvular crónica en un animal canino puede comprender el análisis de una muestra biológica obtenida del animal canino para una cantidad de un miARN asociada a enfermedad valvular crónica, comparando la cantidad del miARN identificado en la muestra obtenida del animal canino con una cantidad correspondiente de miARN presente en la muestra procedente de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de miARN observada en la muestra del animal canino sea inferior a la cantidad de miARN presente en la muestra del animal de control, en el que el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b y combinaciones de los mismos.

En diversas realizaciones, uno o más animales de control comparables que no son el animal bajo evaluación para enfermedad valvular crónica y que se ha determinado que no sufren de enfermedad valvular crónica, pueden evaluarse para el miARN y los resultados de dichas evaluaciones utilizarse como valor de línea base para la comparación con los resultados de un animal bajo evaluación para el miARN. En algunas realizaciones, el valor de línea base para el miARN puede determinarse mediante la evaluación de numerosos animales de control comparables.

En otra realización, la cantidad de miARN puede determinarse para un animal en diversos tiempos durante la vida del animal y los resultados pueden utilizarse para determinar si el animal es susceptible de sufrir o sufre de enfermedad valvular crónica, p.ej., en el caso de que la cantidad de miARN se incremente o se reduzca a medida que envejece el animal, puede diagnosticarse que el animal es susceptible de sufrir o que sufre de enfermedad valvular crónica. En algunas realizaciones, el animal puede evaluarse periódicamente y pueden registrarse los resultados para el miARN. A continuación, si una evaluación posterior muestra que la cantidad del miARN se ha incrementado o se ha reducido desde la última evaluación o evaluaciones, puede diagnosticarse que el animal es susceptible de sufrir o que sufre enfermedad valvular crónica. En algunos aspectos, pueden correlacionarse cambios específicos en los miARN con un estadio temprano o un estadio terminal de la enfermedad valvular crónica.

Cualquier muestra que sea de origen biológico puede resultar útil en la presente invención. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, sangre (suero/plasma), líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, heces, aliento, saliva o la biopsia de cualquier tejido. En una realización, la muestra puede ser una muestra de suero. Aunque en la presente memoria se utiliza el término "suero", el experto en la materia reconocerá que también puede utilizarse plasma, sangre completa o una subfracción de sangre completa.

La expresión reducida o incrementada puede medirse al nivel del miARN utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos por el experto en la materia para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, PCR (incluyendo, aunque sin limitación, RT-PCR y qPCR), secuenciación, transferencia northern, micromatrices u otros métodos de hibridación.

Aunque la utilización de un miARN resulta suficiente para el diagnóstico de la enfermedad valvular crónica, la utilización de uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más de dichos miARN se encuentra comprendida dentro de la invención. El miARN puede evaluarse y utilizarse para el diagnóstico en cualquier combinación. De esta manera, la presente invención puede incluir el diagnóstico de la EVC basándose en la regulación positiva del miARN y en la regulación negativa del miARN.

En una realización, el diagnóstico puede basarse en la determinación si la cantidad de miARN observada en la muestra del animal es superior a 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 realización, el diagnóstico puede basarse en la determinación si la cantidad de miARN observada en la muestra del animal es inferior a 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 significativo, tal como se ejemplifica en la presente memoria. En algunos aspectos, la significación estadística puede incluir una $p < 0,05$, $p < 0,01$ o incluso $p < 0,001$.

Según la invención, el animal es un animal canino, tal como un perro.

Ejemplos

La invención puede ilustrarse adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, aunque se entenderá que estos ejemplos se incluyen meramente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Ejemplo 1

Se identificaron los miARN mediante un estudio de perfilado diferencial de la expresión, comparando muestras de suero de animales enfermos y de animales normales. Se clasificaron los perros como animales con corazón sano o EVC mediante ecocardiografía realizada o evaluada por un cardiólogo veterinario acreditado, examen patológico del corazón, o ambos. Los perros fueron clasificados en tres grupos según el estadio de la insuficiencia cardiaca (IC) aplicando el esquema de estadificación de la American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)/European College of Veterinary Internal Medicine (ECVIM): grupo A (estadio A, en riesgo pero no afectado, 6 perros), grupo B (estadio B, con agrandamiento cardiaco leve a moderado pero sin signos clínicos de insuficiencia cardiaca, 6 perros) o grupo C (estadio C, con signos clínicos de insuficiencia cardiaca moderada, 6 perros) (Tabla 1). Estos tres grupos de perros presentaban edades, tamaños corporales y sexos comparables. Se recolectó el suero sanguíneo de cada grupo de perros y se almacenó a -80°C hasta la utilización.

Tabla 1 Muestras de suero utilizadas en el estudio de miARN

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

Las muestras se sometieron a Qiagen para la extracción del miARN y la cuantificación mediante PCR utilizando el sistema de matrices de PCR de miARN miScript® de Qiagen. Se sometió a ensayo un total de 277 miARN caninos conocidos. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando un ANOVA (análisis de la varianza). Los valores de P de la ANOVA se ajustaron para ensayos múltiples y se calculó la tasa de descubrimientos falsos (FDR, por sus siglas en inglés) utilizando el método de Benjamini y Hochberg. Se calcularon los factores de cambio de la expresión entre los grupos B vs. A (FC_{BvA}) y entre los grupos C vs. A (FC_{CvA}). Se seleccionaron los miARN expresados diferencialmente utilizando el umbral de $\text{FDR} < 0,05$. 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 de P nominales de la ANOVA; ^btasa de descubrimientos falsos; ^clos factores de cambio positivos indican la regulación positiva respecto a las muestras de control; los números negativos indican la regulación negativa respecto a las muestras de control.

5 En la especificación, se han dado a conocer realizaciones preferentes típicas de la invención. Aunque se utilizan términos específicos, se utilizan en un sentido genérico y descriptivo exclusivamente y no con fines limitativos. El alcance de la invención se define en las reivindicaciones. Evidentemente resultan posibles muchas modificaciones y variaciones de la invención a la luz de las enseñanzas anteriormente proporcionadas. Por lo tanto, debe entenderse que dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de maneras diferentes a las indicadas específicamente.

10

REIVINDICACIONES

1. Utilización in vitro de microARN (miARN) seleccionado del grupo que comprende miR-103, miR-98, let-7c, let-7b, miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b y combinaciones de los mismos, para el diagnóstico de la enfermedad valvular crónica en un animal canino.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el diagnóstico de enfermedad valvular crónica en un animal canino comprende las etapas de:
- a. analizar una muestra biológica obtenida del animal canino para una cantidad de un microARN (miARN) asociado a enfermedad valvular crónica;
 - b. comparar la cantidad del miARN identificado en la muestra obtenida del animal canino con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y
 - c. diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de miARN observada en la muestra del animal canino sea superior a la cantidad del miARN presente en la muestra del animal de control,
- en la que el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-103, miR-98, let-7c, let-7b y combinaciones de los mismos.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el diagnóstico de enfermedad valvular crónica en un animal canino comprende las etapas de:
- a. analizar una muestra biológica obtenida del animal canino para una cantidad de un microARN (miARN) asociado a enfermedad valvular crónica;
 - b. comparar la cantidad del miARN identificado en la muestra obtenida del animal canino con una cantidad correspondiente del miARN presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y
 - c. diagnosticar enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de miARN observada en la muestra del animal canino sea inferior a la cantidad del miARN presente en la muestra del animal de control,
- en la que el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b, miR-487b, y combinaciones de los mismos.
4. Utilización según la reivindicación 2 o 3, en la que la muestra es una muestra de suero.
5. Utilización según la reivindicación 2 o 3, en la que el diagnóstico se basa en la determinación de las cantidades de dos o más miARN asociadas a enfermedad valvular crónica.
6. Utilización según la reivindicación 2 o 3, en la que el diagnóstico se basa en la determinación de las cantidades de tres o más miARN asociadas a enfermedad valvular crónica.