(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 758 084**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2016 PCT/NL2016/050196**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16153344**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2016 E 16722417 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3271730**

(54) Título: **Marcador novedoso para diabetes gestacional**

(30) Prioridad:

20.03.2015 NL 2014501

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2020

(73) Titular/es:

IQ PRODUCTS B.V. (100.0%)
Rozenburglaan 13a
9737 DL Groningen, NL

(72) Inventor/es:

SCHUITEMAKER, JOOST HENRIC NICOLAAS y
CREMERS, THOMAS IVO FRANCISCUS HUBERT

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Marcador novedoso para diabetes gestacional

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos métodos de tipificación de un sujeto femenino como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional. En particular, la presente invención se refiere al uso de niveles de expresión de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) para tipificar un sujeto.

2. Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus comprende un grupo de enfermedades metabólicas complejas las cuales se caracterizan por hiperglucemia (crónica) debido a defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambas. Se conocen varios tipos de diabetes mellitus los cuales comparten síntomas comunes, pero tienen diferentes causas subyacentes, que van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas hasta defectos genéticos en la acción de la insulina. Por consiguiente, esta enfermedad se clasifica como diabetes tipo 1 (T1D), diabetes tipo 2 (T2D), diabetes mellitus gestacional (GDM) y otros tipos de diabetes (Ashcroft y Rorsman. Cell 2012; 148:1160-1171; Taylor y Agius. Biochem J 1988; 250:625-640; Kelly y otros, Mol Pathol 2003; 56:1-10).

La GDM se define como la intolerancia a la glucosa que se identifica por primera vez durante el embarazo y en la mayoría de los casos se resuelve después del parto. Sin embargo, la GDM es un problema de salud importante que afecta alrededor del 1-10 % de todos los embarazos mientras su incidencia se incrementa aún más (Lapolla y otros, Nutr Metab Cardiovasc Dis 2009; 19:674-682). Adicionalmente, la GDM se asocia con serias complicaciones para los bebés y las madres y resulta en un mayor riesgo de T2D después del embarazo (Gilmartin y otros, Rev Obstet Gynecol 2008; 1:129-134; Coustan, Clin Chem 2013; 59:1310-1321; Reece y otros, Lancet 2009; 373:1789-1797). Teniendo en cuenta el incremento de la incidencia de la GDM, su predicción temprana durante el embarazo es de primordial importancia. La GDM se diagnostica actualmente a través de un chequeo prenatal, en lugar de por los síntomas reportados. Para permitir la predicción temprana de la GDM, se requiere, por lo tanto, un método de examen fácil basado en un biomarcador robusto. Aunque se conocen varios biomarcadores para la predicción de T1D y T2D (Salomaa y otros, PLoS One 2010; 5:e10100; Wang-Sattler y otros, Mol Syst Biol 2012; 8:615; Rathcke y Vestergaard, Cardiovasc Diabetol 2009; 8:61; Sattar y otros, Diabetes 2004; 53:2855-2860; Vozarova y otros, Diabetes 2002; 51:1889-1895; Riaz y otros, J Pharm Biomed Anal 2010; 51:1103-1107; Shin y otros, Diabetes Care 2001; 24:733-737; Lee , Cell 2013; 153:413-425), solo se han descrito unos pocos biomarcadores potenciales para la predicción de la GDM (Chan y otros, Reprod Sci 2007; 14:169-174; Zhang y otros, Peptides 2014; 54:186-189). Por tanto, se necesitan urgentemente nuevos biomarcadores de GDM detectables en sangre. El examen temprano para determinar el riesgo de desarrollar GDM o cualquier otro problema relacionado con el embarazo limitará el riesgo potencial de un resultado adverso del embarazo, podría limitar los problemas después del embarazo y permitir un mejor uso de los recursos de atención médica.

3. Resumen de la invención

La invención por lo tanto proporciona un método de tipificación de un sujeto femenino embarazado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, el método que comprende a) proporcionar una muestra biológica del sujeto; b) determinar un nivel de expresión de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) en dicha muestra; c) comparar el nivel de expresión de sFRP4 determinado con un nivel de expresión de sFRP4 en una muestra de referencia; y d) tipificar a dicho sujeto como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional si el nivel de expresión de sFRP4 se incrementa en la muestra del sujeto, cuando se compara con la muestra de referencia. Dicha muestra de referencia se obtiene preferentemente de un sujeto femenino que no desarrolló diabetes gestacional durante el embarazo.

Con respecto a este nuevo biomarcador, es interesante observar que varios estudios recientes han indicado que la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) es un candidato prometedor en el pronóstico de T2D (Hoffmann, Cardiovasc Diabetol 2014; 13:155; Mahdi y otros, Cell Metab 2012; 16:625-633; Taneera y otros, Cell Metab 2012; 16:122-134; Ebert y otros, Diabet Med 2014; 31:1014-1017). La causa precisa de la GDM es aún desconocida. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que la GDM es una forma completamente diferente de diabetes que se caracteriza por una combinación de varios tipos de patologías y con más de una causa potencial, que varía desde un origen hormonal hasta un componente autoinmune. (Huang, Endocrinology 2009; 150:1618-1626; Ramos-Roman, Horm Metab Res 2011; 43:593-600; Collares y otros, Mol Biol Rep 2013; 40:5351-5358; Evangelista y otros, BMC Med Genomics 2014; 7:28; Mahmoud, Am J Reprod Immunol 2005; 53 21-29; Oztekin, Med Hypotheses 2007; 69:526-530; Steinborn y otros, Am J Reprod Immunol 2006; 56:124-134).

A diferencia de la diabetes tipo 1 y 2, las cuales son condiciones crónicas incurables, la GDM es una condición reversible y los niveles de glucosa en sangre retornan a los niveles normales en la mayoría de los casos dentro de unos días después del parto.

Mahmoud y otros (Mahmoud y otros, Am J Reprod Immunol 2005; 53:21-29) reveló que la GDM tiene un componente autoinmune. Ellos muestran un sistema inmune desequilibrado en mujeres embarazadas con GDM en comparación con

los embarazos saludables. Esto también se confirma en el nivel de transcriptoma [(Collares y otros, Mol Biol Rep 2013; 40:5351-5358; Evangelista y otros, BMC Med Genomics 2014; 7:28)]. Özer Oztekin y colaboradores correlacionaron estos cambios en el sistema inmune con la presencia del antígeno leucocitario Humano G (HLA-G) (Özer Oztekin, Medical Hypotheses 2007: 69:526-530). Posiblemente, la GDM puede activarse mediante una carga antigénica la cual es el propio feto. Curiosamente, la expresión de HLA-G por el feto confiere protección contra el sistema inmune materno mediante la regulación negativa de la actividad de las células T citotóxicas hacia los antígenos del trofoblasto. Se ha sugerido que este deterioro de la actividad de las células T citotóxicas maternas también puede proteger las células islote del tejido pancreático.

Este escenario se respalda mediante los hallazgos de Steinborn y otros. (Steinborn y otros, Am J Reprod Immunol 2006; 56:124-134), el cual demostró un incremento en los anticuerpos HLA-II en la circulación materna. También se piensa que cuando los receptores de insulina no funcionan correctamente causan la GDM. Esto se debe probablemente a factores relacionados con el embarazo tales como la presencia de lactógeno placentario humano que interfiere con los receptores de insulina susceptibles (Huang y otros, Endocrinology. 2009; 150:1618-265). Esto a su vez provoca niveles de azúcar en sangre inapropiadamente elevados. El lactógeno placentario no se presenta en el sistema en otros períodos distintos al embarazo (Ramos-Román, Horm Metab Res 2001; 43:593-600).

Se han descrito otros factores en la diabetes tipo dos que no tienen valor en la GDM. Schally y otros (Schaller y otros, Eur J Clin Invest 2010; 40:339-343) han publicado, por ejemplo, la YKL-40 descrita anteriormente para el tipo dos como que no tiene relación en los mecanismos de la GDM. También para las transaminasas hepáticas, como la transferaza Gamma-glutamil, la transaminasa alanina y la transaminasa aspartato, se publicó que no predicen la GDM en contraste con la diabetes tipo 2 (Tan y otros, Clinical Biochemistry 2012; 45:1192-1196). Por lo tanto, a pesar del vínculo entre la GDM y la T2D, una asociación entre la sFRP4 y la GDM no es obvia.

La sFRP4 es una citocina recientemente identificada de aproximadamente 40 kDa y pertenece a la familia de las proteínas secretadas relacionadas con frizzled (Bergmann y Sypniewska, Clin Biochem 2014; 47:529-532). Estas proteínas secretadas relacionadas con frizzled actúan como moduladores de las vías de señalización Wnt. Además de su papel como antagonista de Wnt, la sFRP4 se ha implicado en la inhibición de la angiogénesis, la supresión tumoral y la preeclampsia (Bergmann y Sypniewska, Clin Biochem 2014; 47:529-532). Por otra parte, se mostró que esta proteína desempeña un papel en la regulación de la resistencia a la glucosa mediante el control de la secreción de insulina de las células islote (Mahdi y otros, Cell Metab 2012; 16:625-633).

Actualmente se muestra que se presenta una mayor concentración de la sFRP4 en el suero de mujeres embarazadas que desarrollarán la GDM, en comparación con las muestras de suero de controles saludables, mujeres que no desarrollarán la GDM u otro problema relacionado con el embarazo. Estos datos muestran que esta proteína tiene un valor clínico potencial como biomarcador para la predicción de la GDM durante el principio del embarazo.

La muestra biológica es preferentemente un fluido corporal, preferentemente sangre, que incluye plasma y/o suero.

La muestra biológica se obtiene preferentemente antes de las 20 semanas de gestación, más preferida antes de las 18 semanas de gestación, más preferida antes de las 16 semanas de gestación, más preferida antes de las 14 semanas de gestación, más preferida antes de las 12 semanas de gestación. Dicha muestra biológica se obtiene preferentemente de una mamífera embarazada durante la primera mitad de la gestación, preferentemente durante el primer y tercer período de gestación. En humanos, dicha muestra biológica se obtiene preferentemente de una mujer embarazada durante el primer trimestre de gestación.

Un nivel de expresión de la sFRP4 se determina preferentemente mediante un biosensor, preferentemente mediante el uso de un cartucho desechable. Se determina un nivel de expresión preferido de la proteína sFRP4, preferentemente mediante la Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Un plan de alimentación dietética y/o actividad física para usar en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de la invención.

La Metformina, una sulfonilurea, una tiazolidindiona, un inhibidor de DPP-4, un agonista del receptor de GLP-1, y/o un inhibidor de SGLT2, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de la invención.

La insulina para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de la invención.

La invención proporciona además el uso de un kit para evaluar la susceptibilidad de un sujeto femenino embarazado a la diabetes gestacional, dicho kit que comprende un dispositivo para recoger una muestra de prueba de un paciente y reactivos para medir la expresión de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) en dicha muestra, en donde los reactivos son para PCR en tiempo real o una prueba inmunoquímica.

Dichos reactivos para medir la expresión de la sFRP4 incluyen preferentemente un receptáculo que se reviste con un anticuerpo específico para la sFRP4, preferentemente una placa de microtitulación que se reviste con un anticuerpo específico para la sFRP4. Dicho receptáculo que se reviste con un anticuerpo específico para la sFRP4 se usa preferentemente en un Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La invención proporciona además el uso de un kit de acuerdo con la invención, para tipificar un sujeto femenino como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional.

La invención proporciona además el uso de un anticuerpo específico para la sFRP4 en un método in vitro para determinar un riesgo de un sujeto femenino de desarrollar diabetes gestacional.

4. Leyenda para las figuras

La Figura 1: concentración de la sFRP4 a la edad de gestación de 80 días (95 % CI 79 - 82 días). *= p<0,05.

5. Descripción detallada de la invención

5.1 Definiciones

El término "diabetes gestacional", o diabetes mellitus gestacional, (GDM), como se usa en la presente descripción, se refiere a una condición en la cual una mujer sin diabetes diagnosticada previamente exhibe altos niveles de glucosa en sangre durante el embarazo, especialmente durante su tercer trimestre. Un sujeto que padece de diabetes gestacional tiene valores de glucosa en suero o plasma por encima de 130 mg por dL (7,2 mmol por L), o incluso por encima de 140 mg por dL (7,8 mmol por L).

El término "sujeto femenino", como se usa en la presente descripción, se refiere a una hembra mamífera, preferentemente una hembra humana.

El término "muestra biológica", como se usa en la presente descripción, se refiere a un fluido corporal o una muestra de tejido tal como, por ejemplo, cabello, piel, o una muestra de biopsia, de un sujeto femenino embarazado. Dicho fluido corporal se selecciona preferentemente de fluido cerebroespinal, saliva, sudor, esputo, linfa, orina, esputo, secreciones vaginales, transpiración, hisopos bucales, y sangre, que incluye plasma sanguíneo y suero sanguíneo. El plasma se prepara mediante la eliminación de los glóbulos rojos y blancos de la sangre, por ejemplo, mediante centrifugación, de manera que se evita la coagulación de la sangre mediante el uso de, por ejemplo, heparina, citrato o EDTA. El suero se prepara mediante la formación de un coágulo de sangre, y la eliminación del coágulo mediante el uso de, por ejemplo, una centrífuga. Una muestra biológica preferida es o comprende suero.

El término "proteína secretada relacionada con frizzled 4" o sFRP4, como se usa en la presente descripción, se refiere a un gen que codifica aproximadamente 346 aminoácidos con un peso molecular previsto de 39,9 kDa y un peso molecular real de aproximadamente 50-55 kDa. La sFRP4 pertenece a una familia de cinco sFRP que se caracterizan por un péptido de señal de secreción en el término N, el cual es seguido por un ~ dominio de aminoácido rico en cisteína 120 (CRD). La expresión de la sFRP4 puede detectarse en diversos tejidos normales, incluidos endometrio, ovario, riñón, corazón, cerebro, glándula mamaria, cuello uterino, páncreas, estómago, colon, pulmón, músculo esquelético, testículo, ojo, hueso, próstata, e hígado. La sFRP4 humana se representa mediante el número de acceso UniProt Q6FHJ7, el cual se codifica mediante el número de acceso de transcripción RefSeq NM_003014.

El término "biosensor", o "sensor biológico", como se usa en la presente descripción, se refiere a un dispositivo sensor en el cual una señal derivada biológicamente se acopla a un transductor, lo que permite la cuantificación de la señal derivada biológicamente. La señal que se genera cuando el sensor interactúa con un analito, en este caso un producto de expresión de la sFRP4, preferentemente la proteína sFRP4, puede ser eléctrica, óptica o térmica. Se convierte por medio de un transductor adecuado en un parámetro eléctrico medible tal como una corriente o voltaje.

El término "producto de expresión de la sFRP4", como se usa en la presente descripción, se refiere a un RNA o a un producto de expresión de proteína de la sFRP4. Los términos "producto de expresión", "RNA" y "proteína" se refieren a los productos de longitud completa, así como también a los productos de expresión de descomposición tales como los productos de proteína y RNA de descomposición.

El término "Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)", como se usa en la presente descripción, se refiere a una prueba basada en placa que se diseña para detectar y cuantificar antígenos tales como la sFRP4. En un ELISA de competencia, las cantidades conocidas de un antígeno se inmovilizan en una superficie. Se adiciona una muestra que comprende cantidades desconocidas de la sFRP4, y la sFRP4 forma posteriormente un complejo con un anticuerpo que se conjuga preferentemente, directa o indirectamente, a un marcador detectable tal como un marcador colorimétrico, un marcador fluorescente, un marcador radioactivo o un marcador quimioluminiscente, o una enzima A continuación del lavado, la detección del anticuerpo que forma un complejo con la sFRP4 inmovilizada se logra mediante la evaluación del marcador conjugado o actividad enzimática a través de la incubación con un sustrato para producir un producto medible. La cantidad de marcador o actividad enzimática es inversamente proporcional a la cantidad de la sFRP4 en la muestra.

Un ensayo preferido es un ELISA sándwich, en el cual un receptáculo se reviste con un anticuerpo específico para la sFRP4, denominado "anticuerpo de captura", y la detección de la sFRP4 unida se logra con un segundo anticuerpo, denominado "anticuerpo de detección". Se prefiere que los anticuerpos de captura y detección no interfieran entre sí y puedan unirse simultáneamente a la sFRP4. Dicho segundo anticuerpo se conjuga directa o indirectamente preferentemente a un marcador detectable tal como un marcador colorimétrico, un marcador fluorescente, un marcador radioactivo, o un marcador quimioluminiscente, o una enzima La detección de la cantidad de anticuerpo conjugado con enzima se realiza preferentemente mediante la incubación con un sustrato para producir un producto medible. Como alternativa, se prefieren los ensayos turbidimétricos, especialmente para los ELISA de competencia.

El término "conjugado directamente con un marcador detectable", como se usa en la presente descripción, se refiere al marcado del propio anticuerpo con un marcador detectable.

El término "conjugado indirectamente con un marcador detectable", como se usa en la presente descripción, se refiere al marcado indirecto de un anticuerpo, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo marcado con biotina y un marcador detectable que se une a estreptavidina, o mediante el uso de un anticuerpo adicional que se dirige contra el anticuerpo marcado indirectamente y cuyo anticuerpo además se marca con un marcador detectable.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una inmunoglobulina policlonal o monoclonal completa, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE y similares, o a un fragmento de inmunoglobulina, por ejemplo, regiones CDR aisladas; moléculas de Fv de cadena simple ("scFv"), en donde un dominio VH y un dominio VL se vinculan mediante un vínculo peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un dominio vinculante, diacuerpo (Hollinger y otros, 1993. PNAS USA 90: 6444-6448), F(ab)2, F(ab')2, Fab, Fab' y similares, o una mezcla de los mismos. Se conocen los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos los cuales se unen específicamente a una amplia variedad de ligandos, y muchos de estos se describen en las patentes. Además, el término "anticuerpo" incluye moléculas similares a anticuerpos artificiales o miméticos de anticuerpos tales como APTAMERS (Que-Gewirth y Sullenger, 2007. GENE Therapy 14, 283-291); moléculas AFFIBODY® (Nord y otros, 1995. Prot Eng 8: 601-608), ANTICALINS® (Skerra, 2008. FEBS J. 275: 2677-2683), y AVIMERS® (Silverman y otros, 2005. Nat Biotechnol 23: 1556-1561). El término anticuerpo también incluye otras moléculas proteicas que se unen a la sFRP4 que incluyen, por ejemplo, Wingless 7a o una parte de la sFRP4 vinculante de la misma.

El término "plan de alimentación dietética", como se usa en la presente descripción, se refiere a una dieta que es rica en fibra, con una variedad de frutas y verduras, y baja en azúcar y grasa, especialmente grasas saturadas.

El término "actividad física", como se usa en la presente descripción, se refiere a la actividad física ligera o moderada, que incluye caminar, senderismo, subir escaleras, nadar o tomar una clase de aeróbicos acuáticos, bailar, y andar en bicicleta al aire libre o en una bicicleta estacionaria en el interior, que ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre. Especialmente la actividad muscular puede ayudar a reducir y/o prevenir la glucosa alta en sangre.

El término "muestra de referencia", como se usa en la presente descripción, se refiere preferentemente a una muestra de un sujeto femenino que no desarrolló diabetes gestacional durante el embarazo. Un experto comprenderá que el término muestra de referencia también puede referirse al nivel de expresión de la sFRP4 que se determina en un sujeto femenino que no desarrolló diabetes gestacional durante el embarazo, o al nivel promedio de expresión de la sFRP4 que se determina en un grupo de sujetos femeninos que no desarrollaron diabetes gestacional durante el embarazo. Se prefiere que dicho grupo de sujetos femeninos incluya más de 10 sujetos, más preferidos más de 20 sujetos, más preferidos más de 30 sujetos. Estos sujetos tienen preferentemente las mismas características físicas, por ejemplo, edad, peso, edad gestacional y BMI que el sujeto femenino del cual debe determinarse el nivel de expresión de la sFRP4. En una modalidad, dicha muestra de referencia se refiere a una concentración de la sFRP4 en suero o plasma de 130 ± 12 ng/ml de error estándar de la media (SEM), según se determina con un kit ELISA para la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (SFRP4) (de Cloud-Clone Corp., Houston, TX).

5.2 Métodos de diagnóstico

La presente invención se dirige a la sFRP4 para su uso como biomarcador para la predicción de la GDM durante el principio del embarazo. Se muestra que un aumento en la concentración de la sFRP4 en suero de mujeres embarazadas, sanas que no muestran signos de diabetes, en comparación con la concentración de la sFRP4 en suero de mujeres que coinciden con la misma edad, edad gestacional, peso e BMI, es indicativo de mujeres que desarrollarán la GDM más tarde durante el embarazo. La detección temprana de mujeres en riesgo de desarrollar la GDM, y la intervención terapéutica oportuna, son cruciales para mejorar el resultado de los pacientes que son probables a padecer la GDM. La detección temprana permitirá el inicio temprano de una terapia específica que se dirige a normalizar los niveles de glucosa en esas mujeres.

Recientemente, el gen SFRP4 fue identificado en un estudio genético de sistemas como uno de los genes que se asocian con la disfunción del islote pancreático (Taneera y otros, 2012. Cell Metab 16: 122-134). Además, se informó que la sFRP4 se sobreexpresa en las células islote pancreáticas de pacientes con TD2, mientras su incremento de las concentraciones circulatorias perjudica la secreción de insulina de las células β y por lo tanto reduce la tolerancia a la glucosa (Mahdi y otros, 2012. Cell Metab 16: 625-633). Esto apunta hacia un papel directo de la sFRP4 en el control de la secreción de

insulina de las células islote. Además de su efecto en el metabolismo de la glucosa, los niveles elevados de la sFRP4 también afectan el metabolismo de los triglicéridos en pacientes con TD2 (Hoffmann y otros, 2014. Cardiovasc Diabetol 13: 155). A pesar de un vínculo claro entre la sFRP4 y la T2D, no se reporta con anterioridad una asociación entre la sFRP4 y la GDM y no es evidente de manera inmediata debido a que la causa de la GDM es aún poco clara. En contraste con el vínculo a menudo sugerido entre la GDM y la T2D, se propone un origen hormonal así como también un componente autoinmune (Huang y otros, 2009. Endocrinology 150: 1618-1626; Ramos-Roman, 2011. Horm Metab Res 43: 593-600; Collares y otros, 2013. Mol Biol Rep 40: 5351-5358; Evangelista y otros, 2014. BMC Med Genomics 7: 28; Mahmoud y otros, 2005. Am J Reprod Immunol 53: 21-29; Oztekin, 2007. Med Hypotheses 69: 526-530; Steinborn y otros, 2006. Am J Reprod Immunol 56: 124-134). Esto sugiere que la GDM es una forma completamente diferente de diabetes con más de una causa potencial y una combinación de varios tipos de patologías, las cuales se diagnostican todas como GDM.

El uso de la sFRP4 como biomarcador para la predicción de la GDM durante el principio del embarazo es independiente del BMI (ver Tabla 3). Sin embargo, se encontró que un BMI mayor, tal como por encima de 25 (sobrepeso) o por encima de 30 (obesidad), incrementa el valor predictivo del marcador. Por lo tanto, el sujeto femenino embarazado tiene preferentemente un BMI por encima de 20, preferentemente por encima de 25, preferentemente por encima de 30.

Los métodos para obtener una muestra biológica, preferentemente un fluido corporal, de un sujeto femenino, preferentemente una hembra humana, se conocen en la técnica. Los métodos preferentes incluyen la provisión de una muestra de sangre, preferentemente suero.

Se prefiere además que la muestra comprenda productos de expresión de RNA y/o productos de expresión de proteínas. Tal muestra biológica puede obtenerse de numerosas maneras, como se conoce por un experto. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser recién preparada a partir de un fluido corporal, preferentemente suero, en el momento de la recolección, o puede prepararse a partir de muestras que se almacenan a -70 °C hasta su procesamiento para la preparación de la muestra. Alternativamente, dicho fluido corporal puede almacenarse bajo condiciones que conserven la calidad de la proteína o RNA. Ejemplos de estas condiciones conservantes son la fijación que usa por ejemplo inserción de formalina y parafina, inhibidores de RNase tales como RNAsin® (Pharmingen) o RNasecure® (Ambion), soluciones acuosas tales como RNAlater® (Assuragen; US06204375), acumulación ácida Hepes-Glutamic por medio del Efecto de Protección de Solvente Orgánico (HOPE; DE 10021390) y RCL2 (Alphelys; WO04083369), y soluciones no acuosas tales como el Fijador Molecular Universal (Sakura Finetek USA Inc.; US7138226).

Se prefiere que el nivel de expresión de la sFRP4 se normalice. La normalización se refiere a un método para ajustar o corregir una desviación sistemática en las mediciones. La desviación sistémica resulta en una variación por diferencias en el rendimiento general, por ejemplo, entre placas ELISA, que puede deberse, por ejemplo, a inconsistencias en la fabricación, inmovilización, y variación entre las muestras, que pueden deberse, por ejemplo, a variaciones en la pureza. La desviación sistémica también puede introducirse durante el manejo de una muestra.

Los métodos convencionales para la normalización de los datos de expresión se basan en la detección de productos de expresión de genes tales como la deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato, la transferrina y la albúmina, de las cuales el nivel de expresión se considera constante en una muestra dada e independiente de la etapa de desarrollo o historia de dicha muestra.

El RNA puede aislarse de una muestra biológica mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a Trizol (Invitrogen; Carlsbad, California), RNAqueous® (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Tx), Qiazol® (Qiagen, Hilden, Alemania), Agilent Total RNA Isolation Lits (Agilent; Santa Clara, California), RNA-Bee® (Tel-Test. Friendswood, Texas), y Maxwell ™ 16 Total RNA Purification Kit (Promega; Madison, Wisconsin). Un procedimiento de aislamiento de RNA preferido implica el uso de Qiazol® (Qiagen, Hilden, Alemania). El RNA puede extraerse de una muestra completa o de una porción de una muestra que se genera mediante, por ejemplo, sección o disección con láser.

El nivel de expresión de RNA de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Los métodos para determinar los niveles de RNA de los genes se conocen por un experto e incluyen, pero no se limitan a, transferencia de Northern, reacción cuantitativa en cadena de la Polimerasa (qPCR), también denominada PCR en tiempo real (rtPCR), análisis de secuencias de DNA y secuenciación de RNA. El término qPCR se refiere a un método que permite la amplificación de secuencias de DNA relativamente cortas (generalmente de 100 a 1 000 pares de bases). Para esto, el mRNA se convierte en DNA complementario (cDNA) mediante el uso de una transcriptasa inversa. El cDNA se amplifica posteriormente mediante PCR con la ayuda de uno o más iniciadores que hibridan específicamente para el cDNA de la sFRP4. La cantidad de producto que se amplifica puede cuantificarse mediante el uso de, por ejemplo, TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), Molecular Beacons, Scorpions® y SYBR® Green (Molecular Probes). La amplificación cuantitativa basada en la secuencia de ácido nucleico (qNASBA) puede usarse como una alternativa para qPCR.

Los métodos alternativos para la cuantificación de los niveles de expresión de RNA incluyen análisis de secuencias de DNA y secuenciación de última generación. Para el análisis de secuencias de DNA, se prepara una mezcla de hibridación mediante extracción y marcado de RNA. El RNA extraído se convierte preferentemente en una muestra marcada que comprende DNA complementario (cDNA) o cRNA mediante el uso de una enzima de transcriptasa inversa y nucleótidos marcados. Un marcado preferido introduce nucleótidos marcados con fluorescencia tales como, pero no limitados a,

cianina-3-CTP o cianina-5-CTP. Los ejemplos de métodos de marcado se conocen en la técnica e incluyen el Kit de Marcado Fluorescente con Baja Entrada de RNA (Agilent Technologies), el Kit MessageAmp (Ambion) y el Kit de Marcado de Secuencias de DNA (Stratagene).

Los métodos de la invención para determinar un nivel de expresión de RNA de la sFRP4 comprenden preferentemente la provisión de una sonda o un iniciador marcado que hibrida específicamente con una región de ácido nucleico objetivo que se presenta en el mRNA de la sFRP4 o en el cDNA o cRNA que se deriva del mRNA de la sFRP4. Dicha sonda o iniciador marcado hibrida específicamente de manera preferidos con un producto amplificado que se genera mediante el uso de un primer y segundo iniciadores que hibridan específicamente con una región en el mRNA de la sFRP4 o en el cDNA o cRNA que se deriva del mRNA de la sFRP4. Los métodos comprenden además detectar un producto de hibridación que comprende la sonda o iniciador marcado y el mRNA de la sFRP4 o una parte relevante del mismo, o en el cDNA o cRNA que se deriva del mRNA de la sFRP4.

El término "hibridar específicamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a un iniciador y/o una sonda que es capaz de hibridar específicamente bajo condiciones de hibridación estrictas con un patrón de ácido nucleico objetivo que se obtiene o deriva del mRNA de la sFRP4. La longitud del iniciador o sonda es preferentemente más de 15 bases, pero menos de 100 bases, preferentemente entre 16 y 30 bases. En general, un iniciador o sonda puede hibridarse con un patrón de ácido nucleico objetivo cuando el porcentaje de identidad de secuencia de la molécula es al menos 90 % sobre sustancialmente toda la longitud, más preferido al menos 91 %, más preferido al menos 92 % , más preferido al menos 93 %, más preferido al menos 94 %, más preferido al menos 95 %, más preferido al menos 96 %, más preferido al menos 97 %, más preferido al menos 98 %, más preferido al menos 99 %, más preferido 100 % idéntico a un ácido nucleico que se obtiene o deriva de dicho patrón de ácido nucleico objetivo sobre sustancialmente toda la longitud del iniciador o sonda. El término "sustancialmente toda la longitud" se usa para indicar que la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales, por ejemplo, en los extremos 5' y/o 3' que no se presentan en el gen o la región descritos anteriormente en la presente descripción.

El primer y segundo iniciadores actúan preferentemente juntos para amplificar una región en el mRNA de la sFRP4 o en el cDNA o cRNA que se deriva del mRNA de la sFRP4. Dichos primer y segundo iniciadores se proporcionan preferentemente en una cámara de reacción. Dicha cámara de reacción preferentemente comprende además un acumulador, dNTP y/o polimerasa de DNA, preferentemente en forma liofilizada. Dicho nivel de expresión de RNA de la sFRP4 se determina preferentemente mediante técnicas de prueba multiplex, que incluyen PCR multiplex y multiplexación basada en gota, lo que permite la detección simultánea de niveles de expresión de la sFRP4 y de, por ejemplo, genes de normalización tales como transferrina y albúmina.

Una muestra preferida comprende productos de expresión de proteínas de la sFRP4. Los métodos y medios para la extracción de proteínas de una variedad de muestras se conocen en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a la lisis de tejidos y/o células con un detergente suave tal como el ácido desoxicólico y/o agentes caotrópicos tales como el yoduro de sodio y la urea.

Como proteína secretada, el nivel de expresión de la sFRP4 en un fluido corporal tal como sangre, que incluye plasma sanguíneo y suero sanguíneo, se determina preferentemente de manera directa en dicha muestra, sin aislamiento y/o extracción de proteínas.

Puede determinarse un nivel de expresión de la sFRP4 mediante electroforesis de gel poliacrilamido, que incluye electroforesis de gel bidimensional, tecnología de identificación de proteínas multidimensional, ELISA, inmunoensayos basados en gotas, inmuno PCR mediante el uso, por ejemplo, de un kit de conjugación de anticuerpos y oligonucleótidos Thunder-Link® (Innova Biosciences, Cambridge, Reino Unido), resonancia de plasmón superficial, cromatografía líquida espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-TOF).

El nivel de expresión de la sFRP4 se determina preferentemente mediante el uso de un anticuerpo monoclonal y/o policlonal dirigido contra la sFRP4, que emplea preferentemente un Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Un ELISA preferido es un ELISA de competencia o un ELISA sándwich. Un ELISA más preferido es un ELISA sándwich, en el cual el antígeno (sFRP4) se inmoviliza en una superficie mediante un anticuerpo de captura que se une específicamente a la sFRP4, y se usa un anticuerpo de detección que se conjuga a una enzima para detectar la sFRP4 inmovilizada. Dicho anticuerpo de captura y anticuerpo de detección reconocen y se unen preferentemente a epítopos distintos en la sFRP4. Los kits ELISA preferidos incluyen el kit ELISA para la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) (Cloud-Clone Corp., Houston, EE.UU.), la proteína secretada relacionada con frizzled 4 Human, el kit ELISA sFRP4 (MyBioSource, Inc., San Diego, EE.UU.), y el Kit Elisa sFRP4 Human, (United States Biological, Swampscott, EE.UU.).

El nivel de expresión de la sFRP4 se determina preferentemente mediante un biosensor, preferentemente mediante el uso de un cartucho desechable. Un biosensor preferido proporciona métodos y medios para detectar un nivel de expresión de la sFRP4, que incluye preferentemente anticuerpos que se unen específicamente a la sFRP4. Un biosensor preferido comprende un lector portátil reutilizable capaz de una simple operación del pulsador para el análisis automatizado de muestras, y cartuchos desechables rentables, preferentemente cartuchos desechables de sensores microfluídicos, que

se han preparado para proporcionar una cuantificación óptima de múltiples agentes clínicamente relevantes, incluyendo la sFRP4. Un biosensor preferido es un dispositivo de prueba de flujo lateral, preferentemente un dispositivo de flujo lateral que permite determinar la cantidad de la sFRP4 en una muestra, por ejemplo, en base a la acumulación de sustancias cuantificables tales como partículas magnéticas. Dicho biosensor preferible permite el diagnóstico en el punto de atención (POC).

Dicho nivel de expresión de la sFRP4 en una muestra biológica de un sujeto femenino se compara preferentemente con el nivel de expresión de la sFRP4 en un control, donde el nivel de expresión en dicho control representa preferentemente el nivel promedio de expresión determinado en sujetos femeninos que no sufrieron de diabetes gestacional durante el embarazo. Un incremento en el nivel de expresión de la sFRP4 en la muestra del sujeto femenino indica que el sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar diabetes gestacional en el segundo o tercer trimestre del embarazo. Los expertos en la técnica verán fácilmente que dicho nivel de control puede representar alternativamente el nivel de expresión encontrado en sujetos femeninos que sufrieron diabetes gestacional durante el embarazo. En ese caso, una disminución en el nivel de expresión de la sFRP4 en la muestra del sujeto femenino indica que el sujeto tiene un riesgo reducido de desarrollar diabetes gestacional en el segundo o tercer trimestre del embarazo.

Como alternativa, la concentración de la sFRP4 puede determinarse en la muestra del sujeto, preferentemente en una muestra de suero del sujeto. Una concentración de la sFRP4 en suero por encima de 130 pg/ml al final del primer trimestre, según se determina con el Kit ELISA para la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) (Cloud-Clone Corp., Houston, EE.UU.), se asocia con casi unas cuatro veces (OR 3,75) mayor riesgo de desarrollar la GDM más tarde en el embarazo, cuando se compara con un sujeto que tiene una concentración de la sFRP4 en suero por debajo de 130 pg/ml al final del tercer trimestre.

La invención proporciona además un método de tipificación de un sujeto femenino como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, que comprende

i) obtener una muestra biológica del sujeto;

ii) aplicar a la muestra un anticuerpo específico para la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4), en donde la presencia de la sFRP4 crea un complejo anticuerpo-sFRP4;

iii) aplicar un agente de detección que detecta el complejo anticuerpo-sFRP4;

iv) determinar la cantidad de complejo anticuerpo-sFRP4 detectado y comparar dicha cantidad determinada con la cantidad del complejo anticuerpo-sFRP4 que se presenta en una muestra de referencia; y

v) tipificar dicho sujeto como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, si el nivel de expresión de la sFRP4 se incrementa en la muestra del sujeto, cuando se compara con la muestra de referencia.

La invención proporciona además un método que comprende i) obtener una muestra biológica de un sujeto femenino embarazado que comprende; ii) aplicar a la muestra un anticuerpo específico para la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4), en donde la presencia de la sFRP4 crea un complejo anticuerpo-sFRP4; iii) aplicar un agente de detección que detecta el complejo anticuerpo-sFRP4; iv) determinar la cantidad del complejo anticuerpo-sFRP4 detectado. La invención proporciona además un kit para evaluar la susceptibilidad de un sujeto femenino embarazado a la diabetes gestacional, dicho kit que comprende un dispositivo para recoger una muestra de prueba de un paciente y reactivos para medir la expresión de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) en dicha muestra.

Dicho dispositivo para recoger una muestra biológica de un sujeto femenino embarazado comprende preferentemente un receptáculo para recoger un fluido corporal del paciente, preferentemente para recoger sangre del sujeto y, si se requiere, una aguja para transferir sangre directamente desde una vena al recipiente. Dicho receptáculo es preferentemente un tubo, tal como un tubo separador de suero. Dicho receptáculo comprende preferentemente partículas, tales como partículas de material de vidrio poroso amorfo, o partículas de sílice micronizadas, para mejorar la activación de coagular de las muestras de sangre. La muestra de sangre puede entonces centrifugarse, lo que permite remover el suero limpio para analizarlo. Dichas partículas pueden incluir partículas similares a plaquetas que se unen a fragmentos de anticuerpos humanos que reconocen y se unen a la fibrina.

Los reactivos para determinar un nivel de expresión de la sFRP4 en un kit de acuerdo con la invención son preferentemente reactivos para PCR en tiempo real o reactivos para una prueba inmunoquímica.

Dichos reactivos para PCR en tiempo real incluyen preferentemente reactivos para extracción de ácido nucleico, preferentemente RNA, de la muestra biológica, y/o reactivos para rtPCR, que incluye iniciadores y sonda para transcripción inversa, amplificación y detección de una parte del producto de expresión de mRNA de la sFRP4.

Los reactivos para determinar un nivel de expresión de la sFRP4 incluyen preferentemente un receptáculo, preferentemente una placa de microtitulación o un cartucho desechable, que se reviste con un primer anticuerpo específico

para la sFRP4. Un receptáculo preferido es una placa de microtitulación, que incluye una placa de microtitulación de 6 pocillos, una placa de microtitulación de 12 pocillos, una placa de microtitulación de 24 pocillos, una placa de microtitulación de 48 pocillos, una placa de microtitulación de 96 pocillos, y una placa de microtitulación de 284 pocillos. Dichos reactivos incluyen preferentemente además un segundo anticuerpo que se une a la sFRP4. Dicho segundo anticuerpo se marca preferentemente con un marcador detectable. El término "marcador detectable", como se usa en la presente descripción, se refiere a un marcador detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (como se usa comúnmente en ELISA), biotina, o haptenos y proteínas para las cuales se encuentran disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Dicho segundo anticuerpo preferentemente no compite o no compite sustancialmente con el primer anticuerpo para unirse a la sFRP4. En ese caso, la cantidad de marcador detectable que se detecta en el receptáculo, si es necesario después de repetidos los pasos de lavado como se conoce por un experto, se usa como una medida para el nivel de expresión de la sFRP4 en el fluido biológico del sujeto. Si se requiere, pueden usarse cantidades conocidas de la proteína sFRP4, o de una parte de la proteína que es reactiva con el primer y segundo anticuerpos, para proporcionar una curva de calibración, de manera que las cantidades de marcador detectable que se detectan en las cantidades conocidas de la proteína sFRP4 se usan para determinar un nivel de expresión de la sFRP4 en el fluido biológico del sujeto. Dicha curva de calibración puede determinarse en paralelo, o en reacciones separadas.

La invención proporciona además un uso de un kit de acuerdo con la invención, para tipificar un sujeto femenino como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional.

La invención proporciona además un anticuerpo específico para la sFRP4 para su uso en un método para determinar un riesgo de un sujeto femenino de desarrollar diabetes gestacional.

5.3 Métodos de tratamiento

La invención proporciona además un plan de alimentación dietética y/o actividad física para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de la invención.

El término "tratamiento", como se usa en la presente descripción, tiene como objetivo reducir el nivel de expresión y/o la actividad de la sFRP4, y/o establecer niveles de glucosa en sangre antes de comer de entre 70 y 130 mg/dl, y/o niveles de glucosa en sangre 2 horas después de comer por debajo de 180 mg/dl.

Un sujeto del cual el nivel de expresión de la sFRP4 no se incrementa cuando se compara con una referencia, y/o del cual la concentración de sFRP4 en suero o plasma se encuentra por debajo de 130 ± 12 ng/ml de error estándar de la media (SEM), según se determina con un kit ELISA para la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (SFRP4) (de Cloud-Clone Corp., Houston, TX), a las 20 semanas de gestación no tiene un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional y puede que no necesite tratamiento adicional.

La terapia de primera línea para mujeres con diabetes gestacional, o que se encuentran en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, es la modificación de la dieta, a menudo denominada terapia médica nutricional. Esto se hace mejor en consulta con un nutricionista experimentado, y debe tener en cuenta las preferencias culturales. La mayoría de los programas incluyen el conteo de carbohidratos, con recomendaciones específicas para comidas y meriendas. Las modificaciones en la terapia nutricional se realizan en base a las preferencias del paciente, la cantidad (o la falta) de aumento de peso, y el monitoreo de la glucosa. El ejercicio moderado también puede ayudar en el manejo de la diabetes gestacional. Aunque la terapia nutricional médica y el ejercicio son intervenciones seguras, prácticas y económicas, su impacto en los resultados de los pacientes no se ha demostrado de manera concluyente en largos RCT.

La farmacoterapia se indica cuando la terapia nutricional médica resulta en un control inadecuado de la glucosa, falta de aumento de peso esperado (como resultado de la restricción calórica), o cuando los pacientes se encuentran constantemente hambrientos. La farmacoterapia también se indica en el contexto de niveles elevados de glucosa en ayunas, debido a que la modificación de la dieta tiene poco efecto sobre estos niveles.

La terapia de segunda línea para mujeres con diabetes gestacional, o que se encuentran en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, comprende tratar a un sujeto en riesgo de desarrollar diabetes gestacional con un antagonista de la sFRP4, una metformina, una sulfonilurea, una tiazolidinediona, un agonista del receptor de GLP-1, y/o un inhibidor de SGLT2.

El término antagonista de la sFRP4, como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula que inhibe la actividad de la sFRP4 que incluye, pero no se limita a, Wingless 7a y, preferentemente, una parte de la sFRP4 vinculante de la misma, y/o un anticuerpo que se dirige contra la sFRP4. Los antagonistas adicionales incluyen ciclotiazida (6-cloro-3,4-dihidro-3- (2-norbornen-5-il) -2H-1,2-4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dióxido; Sigma-Aldrich), clopamida (4-cloro-N-(2,6-dimetilpiperidino)-3-sulfamoilbenzamida; Abcam) y perindopril ((2S, 3AS, 7as)-1-[(2S)-2-{[((2S)-1-etoxi-1-oxopentan-2-il]amino}propanoil]oácido octahidro-1H-indol-2-carboxílico; Sigma-Aldrich) (Bukhari y otros, 2014. Molecules 19, 10129-10136). La ciclotiazida se proporciona preferentemente en una dosis de entre 5 mg y 50 mg/día,

preferentemente a 10-20 mg/día. El perindopril se proporciona preferentemente en una dosis de entre 1 mg y 20 mg/día, preferentemente a 4-8 mg/día.

El término "metformina", como se usa en la presente descripción, se refiere a la diamida N, N-dimetilimidodicarbonimídica, la cual es un fármaco antidiabético oral en la clase de biguanida. Esta gana cada vez más aceptación como alternativa a la insulina en el tratamiento de la diabetes gestacional. La metformina trabaja mediante la supresión de la producción de glucosa del hígado. La metformina se proporciona preferentemente en una dosis de entre 100 mg y 3000 mg/día, preferentemente a 1000-2000 mg/día.

El término "sulfonilurea", como se usa en la presente descripción, se refiere a una clase de agentes hipoglucémicos que incrementan la secreción de insulina del páncreas. Los ejemplos de sulfonilureas son clorpropamida, tolbutamida, glipizida, gliburida y glimepirida. La sulfonilurea se proporciona preferentemente en una dosis de entre 1 mg y 20 mg/día, preferentemente a 5-10 mg/día.

El término "tiazolidinediona", o "glitazona", como se usa en la presente descripción, se refiere a una clase de agentes hipoglucémicos que actúan como agonistas de los receptores gamma activados por el proliferador de peroxisomas (PPARgamma), alterando de esta manera los niveles de expresión de varios genes implicados en el metabolismo de glucosa y lípidos y balance energético. Los ejemplos de tiazolidindiona incluyen rosiglitazona, pioglitazona, lobeglitazona, troglitazona, netoglitazona, rivoglitazona y ciglitazona. La tiazolidinediona se proporciona preferentemente en una dosis de entre 1 mg y 50 mg/día, preferentemente a 15-30 mg/día.

El término "agonista del receptor del péptido similar al glucagón 1" o "agonista del receptor de GLP-1", como se usa en la presente descripción, se refiere a una clase de agentes hipoglucémicos que estimula la liberación de insulina y reduce los niveles de glucagón. Los ejemplos de un agonista del receptor de GLP-1 incluyen exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, y taspoglutida. Un agonista del receptor de GLP-1 se proporciona preferentemente en una dosis de entre 1 microg y 50 microg/día, preferentemente a 5-10 microg/día.

El término "inhibidor de SGLT2" o "gliflozina", como se usa en la presente descripción, se refiere a una clase de agentes hipoglucémicos que bloquea la reabsorción de glucosa filtrada en los riñones, lo que conduce a la excreción de glucosa en la orina, reduciendo de esta manera los niveles de glucosa en sangre. Los ejemplos de un agonista del receptor de GLP-1 incluyen dapagliflozina, canagliflozina, ipragliflozina, tofogliflozina, empagliflozina, etabonato de remogliflozina, y ertugliflozina. La glifozina se proporciona preferentemente en una dosis de entre 1 mg y 500 mg/día, preferentemente a 5-100 mg/día.

La terapia de tercera línea para mujeres con diabetes gestacional comprende tratar un sujeto en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, comprende la terapia de insulina para mujeres cuyo nivel de glucosa en ayunas excede los 95 mg por dL, cuyo nivel de glucosa una hora después de comer excede 130 a 140 mg por dL, o cuyo nivel de glucosa dos horas después de comer excede 120 mg por dL (6,65 mmol por L). La insulina es la terapia farmacológica de primera línea para la diabetes gestacional. La mayoría de los regímenes de insulina incluyen insulinas de acción intermedia, tales como el isofano (NPH), y las insulinas de acción corta, tales como el recombinante regular (Humulin R) y los análogos de insulina aspart (Novolog) y lispro (Humalog).

El término "terapia de insulina", como se usa en la presente descripción, se refiere a la inyección regular, es decir diaria o múltiples veces por día, de insulina y/o variantes de insulina. Las variantes de insulina incluyen la insulina de acción rápida, tal como la insulina aspart, la insulina lispro y la insulina glulisina, las cuales comienzan a trabajar aproximadamente 15 minutos después de la inyección; la insulina de acción corta, tal como la insulina neutra, la cual alcanza su punto máximo en aproximadamente 1 hora; la insulina de acción intermedia, tal como el isofano, la cual comienza a disminuir la glucosa en la sangre dentro de 1 a 2 horas después de la inyección; la insulina de acción prolongada, tal como la insulina detemir y la insulina glargina, las cuales comienzan a disminuir la glucosa en sangre entre 4 a 6 horas después de la inyección y tienen su efecto más fuerte entre 10 a 18 horas después de la inyección. La insulina premezclada, que comprende una mezcla de una insulina de acción intermedia o larga, con una insulina de acción rápida, a menudo se usa para pacientes que no pueden o no se encuentran dispuestos a usar insulina de bolo basal, o para pacientes que no cumplen con autocontrol y valoración de múltiples dosis de insulina.

Para propósitos de claridad y de una descripción concisa, se describen las características en la presente descripción como parte de los mismos aspectos o de aspectos separados y modalidades preferidas de los mismos, sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir modalidades que tienen combinaciones de todas o algunas de las características descritas.

La invención se ilustrará ahora mediante el siguiente ejemplo, el cual se proporciona a manera de ilustración y no de limitación y se entenderá que pueden hacerse muchas variaciones en los métodos descritos y las cantidades indicadas sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Sujetos

Con el fin de establecer el valor de los niveles sanguíneos maternos de la sFRP4 como marcador pronóstico para el desarrollo de la GDM se seleccionaron muestras de una base de datos del estudio. Esta base de datos contiene muestras extraídas de la vena antecubital en tubos de recolección de suero mediante flebotomía durante el primer trimestre del embarazo. De la base de datos, se seleccionaron muestras de suero de 50 mujeres embarazadas que desarrollaron GDM durante su embarazo y 100 mujeres con embarazos normales. Las características de referencia de ambos grupos de estudio se muestran en la Tabla 1, sin revelar diferencias significativas en la edad gestacional, el peso y el BMI al momento del muestreo. Ambos grupos de estudio, por lo tanto, pueden compararse bien en todos los parámetros.

Tabla 1. Características del paciente de embarazos no complicados y embarazos afectados por diabetes gestacional (GDM).

Variable		**Embarazos no complicados (n=96)**	**Diabetes gestacional (n=49)**
Edad materna (años)	media (SD)	34,3 (5,0)	34,3 (5,6)
Peso materno (kg)	media (SD)	76 (15,4)	78 (17,3)
BMI materno (kg/m2)	media (SD)	26,2 (5,0)	26,6 (5,6)
Gravidez	media (rango)	1,8 (0 - 8)	2,0 (0 - 6)
Paridad	media (rango)	1,2 (0 - 6)	1,5 (0 - 6)
Edad gestacional en la recolección de la muestra (días)	media (SD)	80,9 (6,1)	81,0 (6,1)
Edad gestacional en el parto (días)	media (SD)	279,8 (8,6)	279,0 (8,1)
Peso al nacer (g)	media (SD)	3 574 (433,8)	3 618 (516,1)
Percentil de peso al nacer	media (SD)	52,47 (26,80)	58,79 (27,77)
Grande para la edad gestacional (> 90 percentil)	N (%)	9 (9,4 %)	6 (12,5 %)

Análisis de la sFPR4

La concentración de la sFRP4 se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante (Cloud-Clone Corp., Houston, TX). En resumen; una placa de microtitulación proporcionada en el kit revestida previamente con un anticuerpo específico para la sFRP4 se incuba con los estándares diluidos apropiados y muestras de suero. Después de esta incubación inicial y aspiración de los pocillos se incuba el anticuerpo conjugado con biotina específico para la sFRP4. A continuación, se adiciona una avidina conjugada con Peroxidasa de Rábano y se incuba después de lavar la placa. Después de esta incubación y lavado completo de los pocillos se adiciona una solución de sustrato de 3,3',5,5' tetrametilbencidina. Los pocillos que contienen la sFRP4, el anticuerpo secundario conjugado con biotina y la avidina conjugada con HRP mostrarán un cambio de color. Este cambio de color tiene una correlación directa con la concentración de la sFRP4 presente en el pocillo. Después de la adición de ácido sulfúrico el cambio de color se detiene y se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm y 570 nm. Después se calculó la concentración de sFRP4 en las muestras mediante la comparación de la O.D de las muestras con la de la curva estándar.

Las muestras de suero fueron codificadas y evaluadas por el investigador, que no sabía si la muestra era de un individuo que desarrolló GDM o un control.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis U de Mann Whitney mediante el uso de GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) y MedCalc (MedCalc Software bvba, Ostende, Bélgica).

Resultados

En todas las muestras de suero materno la concentración de la sFRP4 se determinó mediante ELISA. Cinco muestras tuvieron que excluirse de la evaluación debido al hecho de que los valores se encontraban por debajo del límite de detección de la prueba (62,5 pg/ml). Los valores de GDM 49 y muestras de control 96 podrían incluirse en la evaluación. Esto reveló una mediana comparable de 91,2 ng/ml frente a 93,0 ng/ml para las muestras de suero de GDM y suero de embarazos sanos, respectivamente. Aunque la mediana fue comparable, la diferencia en la concentración de la sFRP4 en suero entre los dos grupos fue significativa (valor P = 0,030, prueba de Mann Whitney). Tomar en cuenta el BMI de las mujeres embarazadas influenció esta importancia. Multiplicar la concentración de la sFRP4 con el BMI resultó en un cambio del valor p a 0,0209 (prueba de Mann Whitney). De manera importante, los resultados muestran que una concentración de la sFRP4 en suero por encima de 130 ng/ml al final del primer trimestre se asocia con un riesgo (OR) casi cuatro veces (3,75) mayor de desarrollar GDM más tarde en el embarazo. Donde se conoce que el BMI solo tiene un OR de 2,1 para sobrepeso y 2,4 para mujeres obesas (Kim SY, y otros Am J Public Health, 2010; 100:1047-1052).

Tabla 2. Estadísticas de la concentración de la sFRP4 en suero materno (GDM, N = 49) y los grupos de control (embarazo saludable, N = 96) al final del primer trimestre.

	GDM [ng/ml]	**Control [ng/ml]**
Mínimo	35,80	4,30
25 % Percentil	71,75	53,73
Mediana	91,20	93,00
75 % Percentil	175,9	113,9
Máximo	501,4	566,4
Menor CI del 95 % de la media	105,7	87,51
Mayor CI del 95 % de la media	154,6	119,7

El peso y especialmente el BMI correlacionado con el peso es un factor de riesgo para desarrollar GDM. Debido a que los pacientes fueron preseleccionados y que coincidían en las características basales como se indica en la Tabla 1, no hubo diferencias significativas en la edad gestacional, el peso y el BMI al momento del muestreo. Ambos grupos de estudio fueron, por lo tanto, comparables para todos los parámetros. El valor predictivo de la sFRP4 en relación con la GDM es independiente del BMI (ver Tabla 3). Los resultados muestran que una concentración de la sFRP4 en suero por encima de 130 ng/ml al final del primer trimestre se asocia con un riesgo (OR) 3,75 veces mayor de desarrollar GDM más tarde en el embarazo. Se conoce que el BMI solo tiene un OR de 2,1 para sobrepeso y 2,4 para mujeres obesas (Kim SY, y otros, 2010. Am J Public Health 100:1047-1052).

Cuando se hace una selección dentro de los datos sobre la base de un BMI mayor, tal como por encima de 25 (sobrepeso) o por encima de 30 (obesidad), el valor predictivo del marcador es aún más fuerte, respectivamente 4,1 y 5,8 (ver Tabla 3). El valor predictivo, la razón de probabilidades, y la sensibilidad se incrementan, esto en relación con la pérdida en especificidad.

Tabla 3. Influencia de selección para un BMI mayor dentro de la población de estudio.

		BMI medio		**Sensibilidad**	**Especificidad**	**OR**
		No afectado	**GDM**			
Grupo total	**sFRP4 >130**	26.4	26.6	43 %	83 %	3.75
BMI >25	**Todos**	29.9	30.3	59 %	43 %	1.11
BMI >25	**sFRP4 >130**	29.9	30.3	55 %	77 %	4.10
BMI >30	**Todos**	33.2	33.4	29 %	76 %	1.25
BMI >30	**sFRP4 >130**	33.2	33.4	71 %	70 %	5.80

REIVINDICACIONES

1. Un método de tipificación de un sujeto femenino embarazado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, el método que comprende:
a) determinar un nivel de expresión de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) en una muestra la cual se ha obtenido del sujeto;
b) comparar el nivel de expresión determinado de la sFRP4 con un nivel de expresión de la sFRP4 en una muestra de referencia; y
v) tipificar dicho sujeto como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional si el nivel de expresión de la sFRP4 se incrementa en la muestra del sujeto, cuando se compara con la muestra de referencia.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es un fluido corporal, preferentemente sangre.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la muestra biológica es suero.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica se obtiene antes de las 20 semanas de gestación.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se determina un nivel de expresión de la sFRP4 mediante un biosensor, preferentemente mediante el uso de un cartucho desechable.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se determina un nivel de expresión de la proteína sFRP4.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se determina un nivel de expresión de la proteína sFRP4 mediante el Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

8. Un plan de alimentación dietética y/o actividad física para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de las reivindicaciones 1-7.

9. La metformina, una sulfonilurea, una tiazolidindiona, un inhibidor de DPP-4, un agonista del receptor de GLP-1 y/o un inhibidor de SGLT2, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de las reivindicaciones 1-7.

10. La insulina para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que se ha tipificado como que está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional de acuerdo con los métodos de las reivindicaciones 1-7.

11. Uso de un kit para evaluar la susceptibilidad en un sujeto femenino embarazado para la diabetes gestacional, dicho kit que comprende:
un dispositivo para recoger una muestra de prueba de un paciente; y
reactivos para medir un nivel de expresión de la proteína secretada relacionada con frizzled 4 (sFRP4) en dicha muestra.

12. Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los reactivos para determinar un nivel de expresión de la sFRP4 son reactivos para PCR en tiempo real o reactivos para una prueba inmunoquímica.

13. Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 11 o reivindicación 12, en donde los reactivos para determinar un nivel de expresión de la sFRP4 incluyen un receptáculo que se reviste con un anticuerpo específico para la sFRP4.

14. Uso del kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde el receptáculo es una placa de microtitulación.

15. El uso de un anticuerpo específico para la sFRP4 en un método in vitro para determinar un riesgo de un sujeto femenino de desarrollar diabetes gestacional.

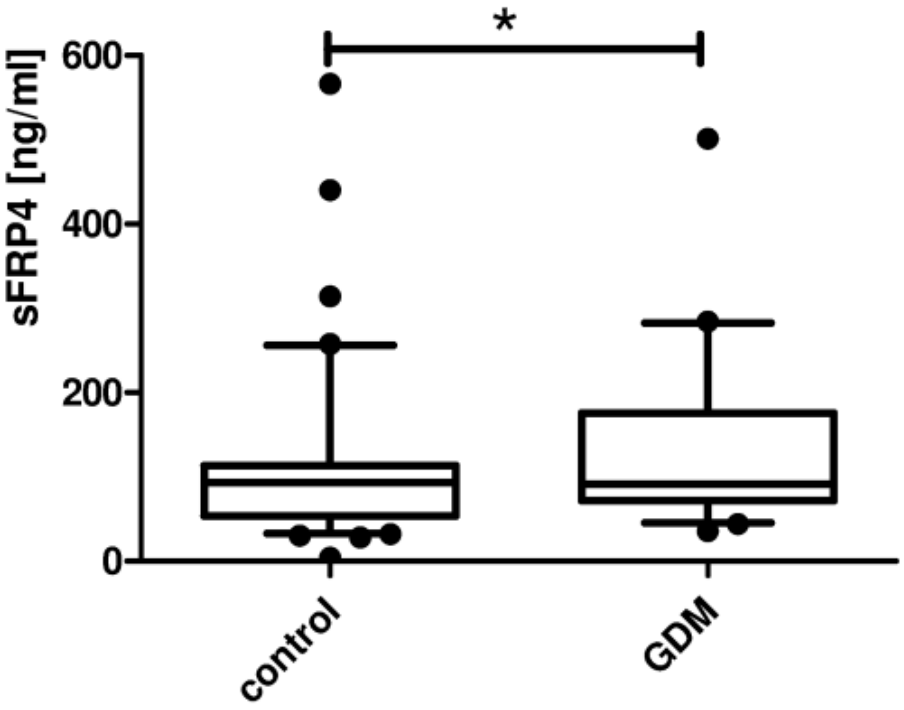

Figura 1