

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 467**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/38** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C40B 30/00** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C07K 14/81** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010 E 10735454 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2391654**

54 Título: **Biomarcadores de la orina y el suero asociados con la nefropatía diabética**

30 Prioridad:

**28.01.2009 US 147778 P**

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

**30.11.2015**

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH  
INSTITUTE (100.0%)  
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Road  
Chutung, Hsinchu 31040, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, WEI-YA;  
YEH , MARY YA-PING;  
TSENG, TZU-LING;  
CHENG, PING-FU;  
HSU, TSAI-WEI;  
LI, HUNG-YI;  
CHEN, YI-TING;  
LIN, YUH-FENG;  
CHEN, GIEN-SHUEN y  
LI , YEN-PENG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 552 467 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

Biomarcadores de la orina y el suero asociados con la nefropatía diabética

**Antecedentes de la invención**

5 La nefropatía diabética (DN) es una enfermedad renal progresiva asociada con una diabetes mellitus largamente establecida. Provoca la filtración anómala de fluidos y una mayor excreción de albúmina urinaria, lo cual conduce finalmente a una insuficiencia renal.

10 La DN no muestra síntomas en su desarrollo temprano. Por tanto, resulta difícil detectar la incipiente de esta enfermedad. De hecho, el actual diagnóstico de la DN depende del desarrollo de una microalbuminuria, que aparece cuando ya se ha producido daño renal. La falta de un ensayo de diagnóstico temprano evita el tratamiento eficaz de la DN en estadios tempranos.

15 Resulta muy importante identificar biomarcadores fiables que sean útiles para diagnosticar la DN en estadios tempranos. Rao *et al.* (Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy, 2007, Diabetes Care, 30(3):629-637) describen la identificación de biomarcadores de la nefropatía en la orina procedente de pacientes diabéticos de tipo 2 mediante una cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Sin embargo, Rao *et al.* no indican que ciertos fragmentos específicos de la alfa-2-HS-glicoproteína son útiles como biomarcadores para el diagnóstico de la nefropatía diabética.

20 El documento WO 03/019193 A1 describe biomarcadores útiles para diferenciar el síndrome nefrótico por cambios mínimos con respecto a la glomerulosclerosis segmental focal, la nefrotropía membranosa y la glomerulonefritis membranoproliferativa. Sin embargo, el documento WO 03/019193 A1 no indica que ciertos fragmentos específicos de la alfa-2-HS-glicoproteína son útiles como biomarcadores para el diagnóstico de la nefropatía diabética.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención se basa en los descubrimientos inesperados de que una serie de proteínas de la orina y del suero, y sus fragmentos, solos o en combinación, están presentes diferencialmente en pacientes con DN, comparado con sujetos sin DN. Por tanto, estas moléculas de proteína son marcadores útiles para el diagnóstico de la DN en estadios tempranos.

Por consiguiente, un aspecto de esta invención incluye un método para diagnosticar la DN en un sujeto. Este método incluye al menos dos etapas: (a) determinar, en un sujeto sospechoso de padecer DN, el nivel de un biomarcador, y (b) evaluar si el sujeto padece DN basándose en el nivel del biomarcador. Un aumento en el nivel del biomarcador, comparado con el nivel en un sujeto sin DN, indica que el sujeto tiene DN.

30 El biomarcador (i) empleado en este método de diagnóstico es una molécula de proteína de la orina que es un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionada del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2).

El método de la presente invención preferiblemente comprende además determinar el nivel de uno o más biomarcadores adicionales (ii) a (iv).

35 El biomarcador (ii) es una molécula de proteína de la orina que es un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionada del grupo que consiste en KGKWERPFEVKDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFTFNKIPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFTFNKIPNLAEFA (SEQ ID NO:6).

40 El biomarcador (iii) es una molécula de proteína de la orina que es un fragmento de la alfa-1 glicoproteína ácida, concretamente GQEHFAHLLLRDRTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).

El biomarcador (iv) es una molécula de proteína del suero que es un fragmento de la osteopontina seleccionada del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).

45 El método de diagnóstico descrito anteriormente puede incluir también, después de la etapa de evaluación, una etapa de correlacionar el nivel del biomarcador con el estado de la DN (es decir, si está en el estadio temprano o tardío). Un aumento en el nivel del biomarcador con relación al nivel en un sujeto sin DN es indicativo de una DN en estadio tardío.

50 En otro aspecto, la presente invención incluye un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de la DN en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano o un animal de laboratorio). Este método incluye determinar en el sujeto los niveles antes y después del tratamiento de la molécula de proteína (i), y evaluar la eficacia del tratamiento basándose en el cambio en el nivel del biomarcador después del tratamiento. El método preferiblemente comprende además determinar en el sujeto los niveles antes y después del tratamiento de una o más de las moléculas de proteínas (ii) a (iv) descritas anteriormente. Si el nivel del biomarcador después del tratamiento sigue siendo el

mismo o disminuye, comparado con el nivel del biomarcador antes del tratamiento, esto indica que el tratamiento es eficaz. En otro aspecto, esta invención incluye un método para determinar un estadio de la DN, que incluye al menos cuatro etapas: (a) obtener una muestra de orina y, opcionalmente, una muestra de suero del sujeto sospechoso de padecer una nefropatía diabética, (b) determinar en la muestra o muestras el nivel del biomarcador (i) y también preferiblemente determinar el nivel de uno o más de los biomarcadores (ii) a (iv) descritos anteriormente, (c) calcular una puntuación de enfermedad basándose en el nivel del biomarcador, y (d) evaluar el estadio de la nefropatía diabética del sujeto basándose en la puntuación de enfermedad, comparado con unos valores de corte predeterminados, que indicarían que el sujeto está en un estadio tardío de la nefropatía diabética. En este método, la etapa del cálculo puede realizarse mediante un análisis de la regresión Ridge, un análisis de factores, un análisis de la función discriminante, y un análisis de la regresión logística. Preferiblemente, el método comprende además determinar el nivel de uno o más factores clínicos seleccionados del grupo que consiste en la edad, el género, HbA1c, la proporción de albúmina/creatinina (ACR) y la velocidad de filtración glomerular (GFR).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar el avance de la DN basándose en el nivel del biomarcador (i) y, opcionalmente, uno o más de los factores clínicos descritos anteriormente. Preferiblemente, el método comprende además determinar el nivel de uno o más de los biomarcadores (ii) a (iv) descritos anteriormente. Este método incluye obtener dos muestras de orina y, opcionalmente, dos muestras de suero, dentro de un espacio de tiempo de 2 semanas a 12 meses (por ejemplo, 2-24 semanas o 3-12 meses) de un sujeto sospechoso de padecer DN, determinar en las muestras el nivel del biomarcador (i) y, además, preferiblemente el nivel de uno o más de los biomarcadores (ii) a (iv), calcular las puntuaciones de enfermedad basándose en los niveles de los biomarcadores y, opcionalmente, en los niveles de uno o más factores clínicos, y evaluar el avance de la DN en el sujeto basándose en las puntuaciones de enfermedad. Una puntuación de enfermedad para las muestras obtenidas en un momento posterior mayor que la de las muestras obtenidas en un momento anterior es indicativa de una exacerbación de la DN.

Las puntuaciones de enfermedad mencionadas anteriormente también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un tratamiento de DN. El tratamiento resulta eficaz si la puntuación de enfermedad después del tratamiento se mantiene sin cambios o disminuye, comparado con la puntuación de enfermedad antes del tratamiento.

La presente invención proporciona también un kit para su uso en cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Este kit incluye un anticuerpo (A) capaz de unirse a un fragmento de una alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2). Preferiblemente, el kit comprende también al menos otro anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo (B) capaz de unirse a un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFVEKDTSEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAQKTDTSHHDDHPTFNKIPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAQKTDTSHHDDHPTFNKIPNLAEFA (SEQ ID NO:6), un anticuerpo (C) capaz de unirse a un fragmento de la alfa-1 glicoproteína ácida, concretamente GQEHFAHLLLRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7), y un anticuerpo (D) capaz de unirse a un fragmento de la osteopontina seleccionado del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9). En un ejemplo, este kit contiene solo anticuerpos específicos para los antígenos que se van a detectar (por ejemplo, biomarcadores asociados con la DN) para practicar uno de los métodos descritos en la presente. Concretamente, consiste fundamentalmente en dichos anticuerpos.

También dentro del alcance de esta invención se encuentra un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2).

La expresión "un anticuerpo aislado" empleada en la presente se refiere a un anticuerpo sustancialmente exento de las moléculas asociadas con él en la naturaleza. De modo más específico, se considera que una preparación que contiene el anticuerpo es "un anticuerpo aislado" cuando las moléculas asociadas con el anticuerpo en la naturaleza presentes en la preparación constituyen como máximo 20% en peso seco. La pureza puede medirse mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida y HPLC.

Cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente puede utilizarse para fabricar un kit útil para la práctica de cualquiera de los métodos de esta invención.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se indican en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente figura y de la descripción detallada de varias realizaciones, y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

## 55 Breve descripción del dibujo

En primer lugar, se describe el dibujo.

La figura 1 es un diagrama que muestra una gráfica de barras para la alfa-2-HS-glicoproteína de la orina (uDN2;

véase el panel A), la alfa-1 antitripsina de la orina (uDN5; véase el panel B), la alfa-1 glicoproteína ácida de la orina (uGR3; véase el panel C), y la osteopontina del suero (sDNO; véase el panel D) en diversos grupos de pacientes con DN. Los límites superior e inferior de las barras marcan los valores del 25% y 75%, siendo las medianas las líneas que atraviesan las barras. El trazo superior marca el valor mayor por debajo del perímetro superior, que es el valor del 75% más 1,5 del intervalo intercuartil, y el trazo inferior marca el valor menor por encima del perímetro inferior, que es el valor del 25% menos 1,5 del intervalo intercuartil.

**Descripción detallada de la invención**

La DN es un trastorno renal asociado con la diabetes. Tiene cinco fases de avance:

Etapa 1: se caracteriza por una diabetes mellitus con GFR normal y albuminuria normal (ACR < 30 mg/g);

10 Etapa 2: se caracteriza por una hiperfiltración glomerular (mayor que 120 ml/minuto/1,73 m<sup>2</sup>) y un agrandamiento renal, acompañados por una GFR normal y una albuminuria normal (ACR < 30 mg/g);

Etapa 3: se caracteriza por una microalbuminuria;

Etapa 4: se caracteriza por una albuminuria manifiesta y una disminución progresiva en la GRF; y

Etapa 5: se caracteriza por una GRF menor que 15 ml/minuto/1,73 m<sup>2</sup>.

15 Habitualmente, se considera que las etapas 1-3 son el estadio temprano y se considera que las etapas 4 y 5 son el estadio tardío.

Los inventores han identificado una serie de biomarcadores asociados con la DN, en especial la DN en diferentes estadios. Estos biomarcadores están compuestos de fragmentos de las siguientes cuatro proteínas, en orina o en suero: (a) alfa-2-HS-glicoproteína (n.º de registro de GenBank NP\_001613, 10-enero-2010) (b) alfa-1 antitripsina (n.º de registro de GenBank AAB59495, 10-enero-2010) (c) alfa-1 glicoproteína ácida (n.º de registro de GenBank EAW87416, 10-enero-2010), y (d) osteopontina, que incluye dos isoformas conocidas como fosfoproteína segregada 1a (n.º de registro de GenBank NP\_001035147, 17-enero-2010) y fosfoproteína segregada 1b (n.º de registro de GenBank NP\_000573, 10-enero-2010).

25 Los fragmentos de estas cuatro proteínas tienen una longitud mínima de 17 aminoácidos y una longitud máxima de 42 aminoácidos. Por ejemplo, los fragmentos de las proteínas (a), (b), (c) y (d) pueden contener hasta 19, 34, 32 y 42 restos aminoácidos, respectivamente.

Los inventores también han descubierto que las puntuaciones de enfermedad calculadas basándose en los niveles de los fragmentos mencionados anteriormente y, opcionalmente, uno o más factores clínicos (edad, género, HbA1c, ACR y GFR) también están asociados con la DN en diferentes estadios.

30 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de la DN que emplea el biomarcador basado en la proteína (a) descrita anteriormente. El método también emplea preferiblemente uno o más de los biomarcadores basados en las proteínas (b) a (d). Para practicar este método, se recoge una muestra de orina, y cuando resulte necesario una muestra de suero, de un sujeto sospechoso de padecer DN, y los niveles en orina y en suero del biomarcador o de los biomarcadores listados anteriormente pueden determinarse mediante métodos habituales, por ejemplo, espectrometría de masas y análisis inmunológico. Si resulta aplicable, se determinan los factores clínicos mediante métodos habituales.

40 Cuando se determina el nivel de un biomarcador basado en una única molécula de proteína, su nivel en un sujeto puede compararse con un punto de referencia para determinar si el sujeto presenta DN. El punto de referencia, que representa el nivel del mismo biomarcador en un sujeto sin DN, puede determinarse basándose en los niveles representativos del biomarcador en grupos de pacientes con DN y en sujetos sin DN. Por ejemplo, puede ser el punto intermedio entre los niveles promedio de estos dos grupos. Un nivel de un biomarcador mayor que el punto de referencia es indicativo de DN.

45 Cuando se determinan los niveles de los biomarcadores basados en al menos dos moléculas de proteína y, opcionalmente, el nivel de la menos un factor clínico, los niveles de las moléculas de proteína y el valor o valores del factor o factores clínicos pueden someterse a un análisis adecuado para generar una puntuación de enfermedad (por ejemplo, representado por un número). El análisis se selecciona del grupo que consiste en un análisis de la función discriminante, un análisis de la regresión logística, un análisis de la regresión Ridge, y un análisis de factores. Después la puntuación de enfermedad se compara con un punto de referencia que representa el nivel del mismo biomarcador en sujetos sin DN. El punto de referencia puede ser determinado por métodos convencionales.

50 Por ejemplo, puede ser una puntuación obtenida analizando el promedio de los niveles de las moléculas de proteína y, cuando sea necesario, el promedio de los valores del factor o factores clínicos en sujetos sin DN con el mismo análisis. Una puntuación de enfermedad mayor que el punto de referencia es indicativa de la presencia de DN.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un método para determinar un estadio de DN basado en el biomarcador

basado en la proteína (a) descrita anteriormente. Preferiblemente, el método también emplea uno o más de los biomarcadores basados en las proteínas (b) a (d) y, opcionalmente, uno o más de los factores clínicos descritos anteriormente. Para practicar este método, el nivel de un biomarcador de un paciente con DN, representado preferiblemente por una puntuación de enfermedad, se compara con un conjunto de valores de corte predeterminados que distinguen entre diferentes estadios de DN para determinar el estadio de la DN del sujeto. Los valores de corte pueden determinarse analizando los niveles representativos del mismo biomarcador en pacientes con diferentes estadios de DN mediante el mismo análisis.

A continuación se describe un ejemplo de un procedimiento para determinar los valores de corte mencionados anteriormente basándose en un biomarcador asociado con la DN en diferentes estadios:

- (1) asignar los pacientes con DN a diferentes grupos según sus condiciones de enfermedad (por ejemplo, estadios de DN y factores de riesgo);
- (2) determinar en cada grupo de pacientes los niveles/valores de las moléculas de proteína y los factores clínicos;
- (4) someter los niveles de proteína y los valores de los factores clínicos a un análisis adecuado para establecer un modelo (por ejemplo, una fórmula) para calcular una puntuación de enfermedad, y
- (6) determinar un valor de corte para cada estadio de enfermedad basándose en una puntuación de enfermedad (por ejemplo, valor promedio) que represente a cada grupo de pacientes, así como otros factores pertinentes, tales como la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (PPV) y el valor predictivo negativo (NPV).

Cualquiera de los modelos generados de esta forma puede evaluarse para su valor de diagnóstico mediante un análisis de la característica operativa del receptor (ROC) para crear una curva ROC. Un modelo multivariable óptimo proporciona una gran área bajo la curva (AUC) en el análisis ROC. Véanse los modelos descritos en los siguientes ejemplos 1-3.

En otro aspecto, esta invención se refiere a un método para controlar el avance de la nefropatía en un sujeto basándose en el biomarcador basado en la proteína (a) descrita anteriormente. Preferiblemente, el método emplea también uno o más de los biomarcadores basados en las proteínas (b) a (d) y, opcionalmente, uno o más de los factores clínicos descritos anteriormente. De modo más específico, pueden obtenerse dos muestras de orina y/o muestras de suero de un sujeto dentro de espacio de tiempo adecuado (de 2 semanas a 12 meses) y se estudian para determinar los niveles de los biomarcadores. Después se determinan las puntuaciones de enfermedad según se describió anteriormente. Si la puntuación de enfermedad que representa el nivel del biomarcador en la muestra o muestras obtenidas en un momento posterior es mayor que la de la muestra o muestras obtenidas en un momento anterior, esto indica la exacerbación de la DN en el sujeto.

El método de control puede aplicarse a un sujeto humano que padece o que está en riesgo de padecer DN. Cuando el sujeto humano está en riesgo de una DN o está en el estadio temprano de la DN, el nivel del biomarcador puede estudiarse una vez cada 6 a 12 meses para controlar el avance de la DN. Cuando el sujeto humano ya se encuentra en el estadio tardío de la DN, se prefiere que el nivel del biomarcador se estudie una vez cada 3 a 6 meses.

El método de control descrito anteriormente también puede aplicarse a animales de laboratorio, siguiendo los procedimientos habituales, para estudiar la DN. La expresión "un animal de laboratorio" empleada en la presente se refiere a un animal vertebrado que se emplea habitualmente en la experimentación animal, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un gato, un perro, un cerdo, y un primateo no humano. Preferiblemente, un animal de laboratorio se estudia para determinar el nivel del biomarcador una vez cada 2 a 24 semanas.

Los biomarcadores también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un tratamiento de la DN en un sujeto que lo necesite (es decir, un paciente con DN humano o un animal de laboratorio que padece DN). En este método, se determinan las puntuaciones de enfermedad basadas en los niveles de los biomarcadores basados en la proteína (a) y, opcionalmente, uno o más factores clínicos descritos anteriormente, antes y después del tratamiento. Preferiblemente, el método emplea también uno o más de los biomarcadores basados en las proteínas (b) a (d). Si las puntuaciones de enfermedad se mantienen sin cambios o disminuyen a lo largo del tratamiento, esto indica que el tratamiento es eficaz.

En la presente también se describe un kit útil para practicar cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Este kit contiene un anticuerpo (A) capaz de unirse a un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2). Preferiblemente, el kit comprende además al menos otro anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo (B) capaz de unirse a un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFVKDTEEEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6), un anticuerpo (C) capaz de unirse a un fragmento de la alfa-1 glicoproteína ácida, concretamente GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7), y un anticuerpo (D) capaz de unirse a un fragmento de la osteopontina seleccionado del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y

KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9). En un ejemplo, este kit contiene solo anticuerpos específicos para los antígenos que se van a detectar (por ejemplo, moléculas de proteína asociadas con la DN) para practicar uno de los métodos descritos en la presente. Concretamente, el kit consiste fundamentalmente en dichos anticuerpos.

- 5 El kit descrito anteriormente puede incluir dos anticuerpos diferentes (es decir, un anticuerpo de revestimiento y un anticuerpo detector) que se unen al mismo antígeno. Generalmente, el anticuerpo detector está conjugado con una molécula que emite una señal detectable por sí misma o mediante su unión a otro agente. El término “anticuerpo” empleado en la presente se refiere a una inmunoglobulina completa o a uno de sus fragmentos, tales como Fab o F(ab')<sub>2</sub>, que conserva la actividad de unión al antígeno. Puede ser natural o estar genéticamente modificado (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado).

10 Los anticuerpos incluidos en el kit de esta invención pueden obtenerse de vendedores del mercado. Como alternativa, pueden prepararse por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. Para producir anticuerpo contra un biomarcador concreto, según se listan anteriormente, el marcador, opcionalmente acoplado con una proteína vehículo (por ejemplo, KLH), puede mezclarse con un adyuvante e inyectarse en un animal hospedante. Los anticuerpos producidos en el animal después pueden purificarse mediante una cromatografía de afinidad. Los animales hospedantes que se emplean habitualmente incluyen conejos, ratones, cobayas y ratas. Los diversos adyuvantes que pueden emplearse para aumentar la respuesta inmunológica dependen de la especie hospedante e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, CpG, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, y dinitrofenol. Los adyuvantes humanos útiles incluyen BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. En el suero del animal inmunizado están presentes anticuerpos policlonales, es decir, poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos.

25 Los anticuerpos monoclonales, es decir, poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpos, pueden prepararse empleando la tecnología del hibridoma convencional (véase, por ejemplo, Kohler *et al.* (1975), *Nature*, 256, 495, Kohler *et al.* (1976), *Eur. J. Immunol.*, 6, 511; Kohler *et al.* (1976), *Eur. J. Immunol.*, 6, 292; y Hammerling *et al.* (1981), *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y.). En particular, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo, tal como se describe en Kohler *et al.* (1975), *Nature*, 256, 495; y la patente de EEUU n.º 4.376.110; la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor *et al.* (1983), *Immunol. Today*, 4, 72; Cole *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2026; y la técnica del hibridoma-EBV (Cole *et al.* (1983), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp 77-96). Estos anticuerpos pueden pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina, que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La capacidad para producir altas titulaciones de anticuerpos monoclonales *in vivo* hace que sea un método de producción particularmente útil.

35 Además pueden generarse fragmentos de anticuerpos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, pero no se limitan a fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser producidos mediante una digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>.

- 40 Se cree que, sin mayores explicaciones, los expertos en la técnica, basándose en la anterior descripción, utilizarán la presente invención en su grado más completo. Por tanto, las siguientes realizaciones específicas deben considerarse meramente ilustrativas y no limitantes del resto de la descripción de ninguna manera.

**Ejemplo 1: Diagnóstico de la DN basándose en la alfa-2-HS-glicoproteína de la orina, la alfa-1 antitripsina de la orina, la alfa-1 glicoproteína ácida de la orina o la osteopontina del suero**

45 *Materiales y métodos*

(i) Sujetos

Se reclutaron 83 pacientes con diabetes mellitus (denominados “sujetos con DM”) y 82 pacientes con DN (denominados “sujetos con DN”) en el Tri-General Military Hospital en Taipei, Taiwán, siguiendo las normas indicadas por the American Diabetic Association y también descritas a continuación:

- 50 DM: padecen diabetes mellitus pero no tienen DN (véanse las normas descritas a continuación);

DN: padecen diabetes mellitus y segregan proteínas urinarias a un nivel mayor que 1 g diario, presentan una DN demostrada por biopsia, o presentan uremia.

Todos los sujetos se asignaron a un grupo de entrenamiento y a un grupo de ensayo en una proporción de 7:3.

(ii) Recolección de muestras y procesamiento

Se recogieron muestras de la primera orina de la mañana y muestras de suero de cada uno de los sujetos mencionados anteriormente. Los péptidos contenidos en las muestras de orina se estudiaron mediante una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción de láser asistida por matriz urinaria (MALDI-TOF-MS) y mediante marcadores isobáricos para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).

- 5 Las moléculas de proteína, que incluyen la alfa-2-HS-glicoproteína (DN2), la alfa-1 antitripsina (DN5), la osteopontina (DNO), y la alfa-1 glicoproteína ácida (GR3), se estudiaron para determinar sus concentraciones en las muestras de orina y de suero mediante ELISA. Brevemente, las muestras de orina se mezclaron con inhibidores de proteasa y se diluyeron a 1:100 con un tampón de dilución y las muestras de suero se diluyeron a 1:10. Las muestras diluidas se colocaron en placas de ELISA por triplicado. Los niveles de las concentraciones de DNO, DN2, DN5 y GR3 se midieron mediante el método de ELISA en "sandwich" convencional.

Se empleó una curva patrón de 5 parámetros para el cálculo de la concentración. Solo se incluyeron patrones y muestras con %CV menor que 15, y los que no cumplen los criterios se repitieron. Los niveles de proteínas en las muestras de orina se normalizaron frente a los niveles de creatinina en las mismas muestras de orina, que se midieron con el ensayo de creatinina QuantiChrom (BioAssay Systems (Hayward), California, EEUU).

- 15 (iii) Análisis estadístico

Los datos que indican las concentraciones de proteínas en orina y en suero de cada proteína estudiada fueron analizados estadísticamente y representados por auROC desde 0,44-0,87 por su capacidad independiente para distinguir los sujetos con DN de los sujetos con DM.

- 20 Para cada sujeto, se determinó la correlación entre los valores mediante un análisis de Spearman o de Pearson dependiendo de los resultados del ensayo para la normalidad. Se realizaron comparaciones del promedio o de la mediana de los grupos mediante el ensayo de la t de Student o el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico, según fuera apropiado. La significancia estadística se obtuvo cuando  $p < 0,05$ . Los resultados estadísticos se presentaron como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio (SEM) o como la mediana con [25%, 75%].

*Resultados*

- 25 (i) Características de los pacientes

Las siguientes tablas 1 y 2 muestran las características de los pacientes en el grupo de entrenamiento y en el grupo de ensayo y los que están en los grupos DM y DN.

Tabla 1 - Características de los pacientes en los grupos de entrenamiento y de ensayo

	Entrenamiento (n = 118)	Ensayo (n = 47)	Valor p
Edad, promedio (DE)	59,94 (9,37)	60,28 (9,48)	0,8362
Mujeres, n (%)	83 (70)	27 (57)	0,16
MDRD_S_GFR, promedio (DE)	86,56 (33,11)	83,05 (43,96)	0,5785
ACR (ug/ml), promedio (DE)	737,82 (1465,47)	1084,18 (2030,98)	0,2239
TP/Cr de la orina (mg/mg), promedio (DE)	1,01 (2,01)	1 (1,78)	0,9963
Creatinina del suero (mg/dl), promedio (DE)	1,02 (0,87)	1,34 (1,44)	0,0903
HbA1c (%), promedio (DE)	8,49 (1,5)	8,29 (2,19)	0,5356
Marcadores (ajustados a creatinina), promedio (DE)			
uDNO (ng/mg)	1452,71 (1416,7)	1488,77 (1222,2)	0,8687
sDNO (ng/ml)	40,65 (34,52)	38,35 (34,13)	0,6926
uDN2 (ng/mg)	4225,77 (9279,63)	5999,64 (10305,95)	0,2983
uDN5 (ng/mg)	15951,12 (94956,78)	45479,82 (199827,84)	0,3228
uGR3 (ng/mg)	32823,47 (62290,96)	42709,23 (103787,54)	0,5333

Tabla 2 - Características de los pacientes en los grupos DM y DN

	Entrenamiento (n = 118)			Ensayo (n = 47)		
	DM (n = 61)	DN (n = 57)	Valor p	DM (n = 22)	DN (n = 25)	Valor p
Edad, promedio (DE)	57,11 (8,05)	62,96 (9,8)	0,0006	59,09 (8,82)	61,32 (10,09)	0,4230
Mujeres, n (%)	43 (70)	40 (70)	1,00	12 (55)	15 (60)	0,93
MDRD_S_GFR, promedio (DE)	111,21 (15,75)	60,18 (25,59)	<0,0001	115,6 (33,66)	54,41 (29,79)	<0,0001
ACR (ug/ml), promedio (DE)	11,35 (6,81)	1515,26 (1815,72)	<0,0001	9,63 (5,61)	2029,78 (2432,31)	0,0004
TP/Cr de la orina (mg/mg), promedio (DE)	0,17 (0,51)	1,9 (2,56)	<0,0001	0,17 (0,32)	1,7 (2,18)	0,0019
Creatinina del suero (mg/dl), promedio (DE)	0,66 (0,12)	1,42 (1,12)	<0,0001	0,67 (0,15)	1,92 (1,79)	0,0019
HbA1c (%), promedio (DE)	8,34 (1,48)	8,7 (1,53)	0,2311	8,37 (1,61)	8,22 (2,66)	0,8238
Marcadores (ajustados a creatinina), promedio (DE)						
uDNO (ng/mg)	1422,18 (1105,46)	1366,77 (1347,92)	0,8083	1769,54 (1260,15)	1516,44 (1945,7)	0,5953
sDNO (ng/ml)	29,03 (19,32)	46,17 (37,32)	0,0026	26,2 (11,53)	64,52 (50,47)	0,0010
uDN2 (ng/mg)	1968,47 (4218,58)	8084,87 (13101,68)	0,0013	968,79 (1144,47)	7348,69 (10865,95)	0,0074
uDN5 (ng/mg)	390,24 (1327,63)	40036,86 (147186,58)	0,0467	336,21 (568,08)	71802,69 (264863,27)	0,1899
uGR3 (ng/mg)	3576,06 (13562,8)	67470,92 (105208,28)	<0,0001	2447,77 (2742,38)	71693,1 (82996,86)	0,0003

5 Se observaron diferencias estadísticamente significativas en GFR, ACR, las proteínas y los niveles de creatinina en suero en los sujetos con DN frente a los sujetos con DM. No existen diferencias en la distribución de género entre los grupos.

(ii) Moléculas de proteína asociadas con DN

Mediante el análisis proteómico de la orina, se descubrió que los péptidos listados en la siguiente tabla 3 estaban diferencialmente presentados en las muestras de orina procedentes de los sujetos con DM y los sujetos con DN.

Tabla 3 - Péptidos de la orina/suero diferencialmente presentados y péptidos en los que están localizados

Secuencias de péptidos	Proteínas correspondientes
VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1)	alfa-2-HS-glicoproteína (DN2)
MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2)	
KGKWERPFEVKDTEEEEDF (SEQ ID NO:3)	alfa-1 antitripsina (DN5)
MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4)	
EDPQGDAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAE (SEQ ID NO:5)	
EDPQGDAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6)	

Secuencias de péptidos	Proteínas correspondientes
YPDVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8)	osteopontina (DNO)
GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7)	alfa-1 glicoproteína ácida (GR3)

A través de un ensayo de ELISA, se descubrió que tres moléculas de proteína de la orina, concretamente, uDN2, uGR3 y uDN5, y una molécula de proteína del suero, concretamente, sDNO, estaban asociadas con la DN (véase la figura 1, los paneles A-D y la anterior tabla 2). De modo más específico, se descubrió que los niveles de uDN2, uGR3, uDN5 y sDNO aparecen elevados en los sujetos con DN, comparado con los sujetos con DM (no tienen DN), lo cual indica que son marcadores fiables de la DN. Además, los niveles de uDN5 y uGR3 en los sujetos con DN que presentan macroalbuminuria (ACR > 300 mg/g) fueron mayores que los niveles en los sujetos con DN que presentan microalbuminuria (ACR de 30 mg/g a 300 mg/g). La macroalbuminuria es un indicador de la DN en estadio tardío, y la microalbuminuria indica una DN en estadio temprano.

**Ejemplo 2: Estadificación clínica de la DN basándose en un modelo de dos proteínas en combinación uDN2, uDN5, uGR3, uDNO y sDNO**

Los niveles combinados de dos de uDN2, uDN5, uGR3, uDNO y sDNO en los sujetos con DM y en los sujetos con DN se sometieron a un análisis de la función discriminante, un análisis de la regresión logística y un análisis de la regresión Ridge. Los resultados de este estudio indican que cualquier combinación de dos de las cinco proteínas o sus fragmentos puede utilizarse como marcador fiable para determinar el estadio de la DN.

A continuación se muestra un ejemplo de un modelo de dos proteínas que no es parte de esta invención, concretamente, uDN5 y uGR3, que incluye las ecuaciones para calcular las puntuaciones de enfermedad basándose en los niveles combinados de estas dos moléculas de proteína. A continuación también se muestran las tablas (concretamente, las tabla 4-9) que listan los valores de corte, las sensibilidades, las especificidades, los valores predictivos positivos (PPV) y los valores predictivos negativos (NPV), y el área bajo la curva ROC (AUROC) para este modelo de dos proteínas.

*Análisis de la función discriminante:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = 0,3303 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,2732 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 5$$

Tabla 4 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	11,227	11,691	11,227	11,691
Sensibilidad (%)	93	93	96	100
Especificidad (%)	90	90	77	83
PPV (%)	90	83	83	78
NPV (%)	93	96	94	100
AUROC	0,95	0,96	0,98	0,96

Tabla 5 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	11,066	11,227	11,691	14,017	11,066	11,227	11,691	14,017

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
Sensibilidad (%)	75	93	93	75	84	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	83	80
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	78	18
NPV (%)	69	93	96	99	71	94	100	100
AUROC	0,86	0,95	0,96	0,95	0,9	0,98	0,96	0,91

*Análisis de la regresión logística:*

Puntuación de enfermedad =  $\exp(\text{valor\_Logit}) / (1 + \exp(\text{valor\_Logit}))$ , en la que

$$\text{valor\_Logit} = -12,5332 + 0,7197 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,4941 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg})$$

- 5 Tabla 6 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	0,445	0,676	0,445	0,676
Sensibilidad (%)	93	93	100	100
Especificidad (%)	90	90	82	83
PPV (%)	90	83	86	78
NPV (%)	93	96	100	100
AUROC	0,95	0,96	0,98	0,97

Tabla 7 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	0,383	0,445	0,676	0,996	0,383	0,445	0,676	0,996
Sensibilidad (%)	75	93	93	75	84	100	100	50
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	82	83	80
PPV (%)	92	90	83	21	87	86	78	10
NPV (%)	69	93	96	99	71	100	100	97
AUROC	0,86	0,95	0,96	0,95	0,9	0,98	0,97	0,88

- 10 *Análisis de la regresión Ridge:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = -1,7697 + 0,1520 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,2254 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg})$$

Tabla 8 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	2,254	2,606	2,254	2,606
Sensibilidad (%)	93	93	100	94
Especificidad (%)	90	90	77	79
PPV (%)	90	83	83	74
NPV (%)	93	96	100	96
AUROC	0,94	0,96	0,98	0,96

Tabla 9 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	2,185	2,254	2,606	4,016	2,185	2,254	2,606	4,016
Sensibilidad (%)	75	93	93	75	84	100	94	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	79	84
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	74	22
NPV (%)	69	93	96	99	71	100	96	100
AUROC	0,86	0,94	0,96	0,95	0,89	0,98	0,96	0,91

*Modelo de tres proteínas*

5 Los niveles combinados de tres de uDN2, uDN5, uGR3, uDNO y sDNO en los sujetos con DM y en los sujetos con DN se sometieron a un análisis de la función discriminante, un análisis de la regresión logística, un análisis de factores y un análisis de la regresión Ridge. Los resultados indican que cualquier combinación de tres proteínas puede utilizarse como marcador fiable para determinar la estadificación clínica de la DN.

10 A continuación se muestra un ejemplo de un modelo de tres proteínas, concretamente, uDN2, uDN5 y uGR3, que incluye las ecuaciones para calcular las puntuaciones de enfermedad basándose en los niveles combinados de estas tres moléculas de proteína. A continuación también se muestran las tablas (concretamente, las tabla 10-17) que listan los valores de corte, las sensibilidades, las especificidades, los PPV y los NPV, y el AUROC para este modelo de tres proteínas.

*Análisis de la función discriminante:*

15 Puntuación de enfermedad =  $0,3340 \times \log_2[uDN5](ng/mg) - 0,0142 \times \log_2[uDN2](ng/mg) + 0,2784 \times \log_2[uGR3](ng/mg) + 5$

Tabla 10 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	11,190	11,663	11,190	11,663
Sensibilidad (%)	93	93	96	100
Especificidad (%)	90	90	77	83
PPV (%)	90	83	83	78
NPV (%)	93	96	94	100
AUROC	0,95	0,96	0,98	0,96

5

Tabla 11 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	11,064	11,190	11,663	13,986	11,064	11,190	11,663	13,986
Sensibilidad (%)	75	93	93	75	84	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	83	82
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	78	20
NPV (%)	69	93	96	99	71	94	100	100
AUROC	0,87	0,95	0,96	0,95	0,9	0,98	0,96	0,91

*Análisis de factores:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = 0,9190 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,6997 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,9003 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg})$$

10

Tabla 12 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	26,356	28,057	26,356	28,057
Sensibilidad (%)	84	93	88	100
Especificidad (%)	90	90	91	86
PPV (%)	89	83	92	82

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
NPV (%)	86	96	87	100
AUROC	0,93	0,95	0,99	0,97

Tabla 13 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	25,669	26,356	28,057	36,464	25,669	26,356	28,057	36,464
Sensibilidad (%)	68	84	93	75	84	88	100	50
Especificidad (%)	89	90	90	90	88	91	86	84
PPV (%)	91	89	83	21	93	92	82	12
NPV (%)	63	86	96	99	74	87	100	97
AUROC	0,83	0,93	0,95	0,95	0,91	0,99	0,97	0,86

*Análisis de la regresión logística:*

5 Puntuación de enfermedad =  $\exp(\text{valor\_Logit}) / (1 + \exp(\text{valor\_Logit}))$ , en la que

$$\text{valor\_Logit} = -11,2820 + 0,8810 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,3478 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,5576 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg})$$

Tabla 14 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	0,462	0,798	0,462	0,798
Sensibilidad (%)	91	88	96	94
Especificidad (%)	90	90	82	83
PPV (%)	90	82	86	77
NPV (%)	92	93	95	96
AUROC	0,95	0,96	0,97	0,95

Tabla 15 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	0,361	0,462	0,798	0,997	0,361	0,462	0,798	0,997
Sensibilidad (%)	75	91	88	75	90	96	94	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	82	83	82
PPV (%)	92	90	82	21	88	86	77	20
NPV (%)	69	92	93	99	80	95	96	100
AUROC	0,88	0,95	0,96	0,95	0,89	0,97	0,95	0,93

*Análisis de la regresión Ridge:*

- 5 Puntuación de enfermedad =  $-1,2900 + 0,1800 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,1013 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,2505 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg})$

Tabla 16 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	2,122	2,831	2,122	2,831
Sensibilidad (%)	95	85	100	94
Especificidad (%)	90	90	68	86
PPV (%)	90	81	78	81
NPV (%)	95	92	100	96
AUROC	0,95	0,95	0,97	0,95

10

Tabla 17 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	2,083	2,122	2,831	3,943	2,083	2,122	2,831	3,943
Sensibilidad (%)	78	95	85	75	87	100	94	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	69	68	86	82
PPV (%)	92	90	81	21	84	78	81	20
NPV (%)	71	95	92	99	73	100	96	100
AUROC	0,88	0,95	0,95	0,95	0,89	0,97	0,95	0,93

*Modelo de cuatro proteínas:*

5 Los niveles combinados de cuatro de uDN2, uDN5, uGR3, uDNO y sDNO en los sujetos con DM y en los sujetos con DN se sometieron a un análisis de la función discriminante, un análisis de la regresión logística, un análisis de factores y un análisis de la regresión Ridge. Los resultados indican que cualquier combinación de cuatro proteínas de las cinco proteínas o sus fragmentos puede utilizarse como marcador fiable para determinar los estadios de la DN.

10 A continuación se muestra un ejemplo de un modelo de cuatro proteínas, concretamente, uDN2, uDN5, uGR3 y sDNO, que incluye las ecuaciones para calcular las puntuaciones de enfermedad basándose en los niveles combinados de estas cuatro moléculas de proteína. A continuación también se muestran las tablas (concretamente, las tabla 18-25) que listan los valores de corte, las sensibilidades, las especificidades, los PPV y los NPV, y el AUROC para este modelo de cuatro proteínas.

*Análisis de la función discriminante:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = 0,2972 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,0159 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,2014 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,5688 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml}) + 5$$

15 Tabla 18 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	12,945	13,520	12,945	13,520
Sensibilidad (%)	88	95	96	100
Especificidad (%)	90	90	82	86
PPV (%)	89	83	86	82
NPV (%)	89	97	95	100
AUROC	0,94	0,96	0,97	0,97

Tabla 19 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	12,887	12,945	13,520	15,560	12,887	12,945	13,520	15,560
Sensibilidad (%)	73	88	95	100	81	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	81	82	86	82
PPV (%)	91	89	83	27	89	86	82	20
NPV (%)	67	89	97	100	68	95	100	100
AUROC	0,87	0,94	0,96	0,97	0,93	0,97	0,97	0,89

20 *Análisis de factores:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = 0,9132 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,6950 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,9080 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,4549 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml})$$

Tabla 20 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	28,459	30,095	28,459	30,095
Sensibilidad (%)	82	93	92	100
Especificidad (%)	90	90	91	83
PPV (%)	89	83	92	78
NPV (%)	85	96	91	100
AUROC	0,93	0,96	0,99	0,98

Tabla 21 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	28,347	28,459	30,095	38,624	28,347	28,459	30,095	38,624
Sensibilidad (%)	67	82	93	75	81	92	100	50
Especificidad (%)	89	90	90	90	94	91	83	84
PPV (%)	91	89	83	21	96	92	78	12
NPV (%)	62	85	96	99	71	91	100	97
AUROC	0,84	0,93	0,96	0,95	0,92	0,99	0,98	0,86

*Análisis de la regresión logística:*

5 Puntuación de enfermedad =  $\exp(\text{valor\_Logit}) / (1 + \exp(\text{valor\_Logit}))$ , en la que

$$\text{valor\_Logit} = -13,7529 + 0,9460 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,3110 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,4957 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,4787 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml})$$

Tabla 22 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	0,423	0,804	0,423	0,804
Sensibilidad (%)	91	88	96	100
Especificidad (%)	90	90	77	86
PPV (%)	90	82	83	82
NPV (%)	92	93	94	100
AUROC	0,96	0,96	0,97	0,96

Tabla 23 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	0,341	0,423	0,804	0,998	0,341	0,423	0,804	0,998
Sensibilidad (%)	75	91	88	75	90	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	86	82
PPV (%)	92	90	82	21	88	83	82	20
NPV (%)	69	92	93	99	80	94	100	100
AUROC	0,89	0,96	0,96	0,96	0,91	0,97	0,96	0,9

*Análisis de la regresión Ridge:*

- 5 Puntuación de enfermedad =  $-1,7588 + 0,1729 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,0971 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,2381 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,1312 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml})$

Tabla 24 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	2,261	2,854	2,261	2,854
Sensibilidad (%)	91	85	96	94
Especificidad (%)	90	90	77	90
PPV (%)	90	81	83	85
NPV (%)	92	92	94	96
AUROC	0,95	0,95	0,97	0,95

10

Tabla 25 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	2,079	2,261	2,854	3,950	2,079	2,261	2,854	3,950
Sensibilidad (%)	77	91	85	75	87	96	94	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	69	77	90	82
PPV (%)	92	90	81	21	84	83	85	20
NPV (%)	70	92	92	99	73	94	96	100
AUROC	0,89	0,95	0,95	0,95	0,89	0,97	0,95	0,93

*Modelo de cinco proteínas:*

Los niveles combinados de uDN2, uDN5, uGR3, uDNO y sDNO en los sujetos con DM y en los sujetos con DN se sometieron a un análisis de la función discriminante, un análisis de la regresión logística, un análisis de factores y un análisis de la regresión Ridge. Los resultados indican que la combinación de estas cinco proteínas o sus fragmentos puede utilizarse como marcador fiable para determinar los estadios de la DN.

5

A continuación se muestran las ecuaciones para calcular las puntuaciones de enfermedad basándose en los niveles combinados de estas cinco moléculas de proteína, así como las tablas (concretamente, las tabla 26-33) que listan los valores de corte, las sensibilidades, las especificidades, los PPV y los NPV, y el AUROC para este modelo de cinco proteínas.

10 *Análisis de la función discriminante:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = 0,2780 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,0231 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,2236 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,6043 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml}) - 0,1513 \times \log_2[\text{uDNO}](\text{ng/mg}) + 5$$

Tabla 26 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	11,818	12,164	11,818	12,164
Sensibilidad (%)	86	98	96	100
Especificidad (%)	90	90	86	86
PPV (%)	89	83	89	82
NPV (%)	87	99	95	100
AUROC	0,94	0,97	0,98	0,98

15

Tabla 27 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	11,766	11,818	12,164	14,432	11,766	11,818	12,164	14,432
Sensibilidad (%)	73	86	98	100	81	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	88	86	86	82
PPV (%)	91	89	83	27	93	89	82	20
NPV (%)	67	87	99	100	70	95	100	100
AUROC	0,86	0,94	0,97	0,98	0,94	0,98	0,98	0,91

*Análisis de factores:*

$$\text{Puntuación de enfermedad} = 0,9117 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) + 0,6949 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,9095 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,4554 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml}) + 0,0384 \times \log_2[\text{uDNO}](\text{ng/mg})$$

20

Tabla 28 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	29,475	30,541	29,475	30,541
Sensibilidad (%)	81	93	88	100
Especificidad (%)	90	90	91	83
PPV (%)	88	83	92	78
NPV (%)	83	96	87	100
AUROC	0,93	0,96	0,99	0,98

Tabla 29 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	28,740	29,475	30,541	39,042	28,740	29,475	30,541	39,042
Sensibilidad (%)	67	81	93	75	81	88	100	50
Especificidad (%)	89	90	90	90	94	91	83	84
PPV (%)	91	88	83	21	96	92	78	12
NPV (%)	62	83	96	99	71	87	100	97
AUROC	0,84	0,93	0,96	0,95	0,92	0,99	0,98	0,86

*Análisis de la regresión logística:*

5 Puntuación de enfermedad =  $\exp(\text{valor\_Logit}) / (1 + \exp(\text{valor\_Logit}))$ , en la que

$$\text{valor\_Logit} = -11,4318 + 0,8188 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,5376 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,7561 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,3940 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml}) - 0,1741 \times \log_2[\text{uDNO}](\text{ng/mg})$$

Tabla 30 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	0,436	0,780	0,436	0,780
Sensibilidad (%)	91	93	96	100
Especificidad (%)	90	90	77	86
PPV (%)	90	83	83	82
NPV (%)	92	96	94	100
AUROC	0,96	0,96	0,97	0,96

Tabla 31 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	0,329	0,436	0,780	0,997	0,329	0,436	0,780	0,997
Sensibilidad (%)	75	91	93	100	90	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	86	80
PPV (%)	92	90	83	27	88	83	82	18
NPV (%)	69	92	96	100	80	94	100	100
AUROC	0,89	0,96	0,96	0,96	0,91	0,97	0,96	0,91

*Análisis de la regresión Ridge:*

- 5 Puntuación de enfermedad =  $-1,3112 + 0,1648 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,0968 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,2468 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,1426 \times \log_2[\text{sDNO}](\text{ng/ml}) - 0,0552 \times \log_2[\text{uDNO}](\text{ng/mg})$

Tabla 32 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	2,244	2,759	2,244	2,729
Sensibilidad (%)	91	88	96	100
Especificidad (%)	90	90	82	90
PPV (%)	90	82	86	86
NPV (%)	92	93	95	100
AUROC	0,95	0,95	0,98	0,97

10

Tabla 33 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	2,043	2,244	2,729	3,913	2,043	2,244	2,729	3,913
Sensibilidad (%)	77	91	88	100	87	96	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	69	82	90	80
PPV (%)	92	90	82	27	84	86	86	18
NPV (%)	70	92	93	100	73	95	100	100
AUROC	0,89	0,95	0,95	0,96	0,9	0,98	0,97	0,93

**Ejemplo 3: Estadificación clínica de la DN basándose en una combinación de uDN2, uDN5, uGR3, y la edad**

5 A continuación se muestran las ecuaciones para calcular las puntuaciones de enfermedad determinadas mediante un análisis de la función discriminante, un análisis de factores, un análisis de la regresión logística y un análisis de la regresión Ridge, basándose en el nivel de un biomarcador compuesto por tres moléculas de proteína, concretamente, uDN2, uDN5, y uGR3, y un factor clínico, concretamente, la edad. A continuación también se muestran las tablas (concretamente, las tabla 34-41) que listan los valores de corte, las sensibilidades, las especificidades, los PPV, los NPV, y el AUROC para este modelo.

*Análisis de la función discriminante:*

10 Puntuación de enfermedad =  $0,3342 \times \log_2[uDN5](ng/mg) - 0,0201 \times \log_2[uDN2](ng/mg) - 0,2862 \times \log_2[uGR3](ng/mg) + 0,059 \times edad(años) + 5$

Tabla 34 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	11,515	12,088	11,515	12,088
Sensibilidad (%)	93	93	100	100
Especificidad (%)	90	90	77	79
PPV (%)	90	83	83	75
NPV (%)	93	96	100	100
AUROC	0,95	0,96	0,98	0,97

Tabla 35 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	11,353	11,515	12,088	14,343	11,353	11,515	12,088	14,343
Sensibilidad (%)	75	93	93	75	84	100	100	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	79	80
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	75	18
NPV (%)	69	93	96	99	71	100	100	100
AUROC	0,87	0,95	0,96	0,95	0,9	0,98	0,97	0,9

15

*Análisis de factores:*

Puntuación de enfermedad =  $0,9184 \times \log_2[uDN5](ng/mg) + 0,7006 \times \log_2[uDN2](ng/mg) + 0,9005 \times \log_2[uGR3](ng/mg) + 0,1863 \times edad(años)$

Tabla 36 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	38,341	40,075	38,341	40,075
Sensibilidad (%)	82	85	96	100
Especificidad (%)	90	90	86	83
PPV (%)	89	81	89	78
NPV (%)	85	92	95	100
AUROC	0,93	0,94	0,99	0,98

5

Tabla 37 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
N.º de pacientes (%)	73 (62)	57 (48)	41 (35)	4 (3)	31 (66)	25 (53)	18 (38)	2 (4)
Corte	38,341	38,341	40,075	48,538	38,341	38,341	40,075	48,538
Sensibilidad (%)	66	82	85	50	81	96	100	50
Especificidad (%)	89	90	90	90	88	86	83	89
PPV (%)	91	89	81	15	93	89	78	17
NPV (%)	62	85	92	98	70	95	100	98
AUROC	0,82	0,93	0,94	0,91	0,9	0,99	0,98	0,77

*Análisis de la regresión logística:*

Puntuación de enfermedad = exp (valor\_Logit)/(1 + exp (valor\_Logit)), en la que

10 
$$\text{valor\_Logit} = -15,9748 + 0,8688 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,4966 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,6436 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,0879 \times \text{edad}(\text{años})$$

Tabla 38 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	0,321	0,889	0,321	0,889
Sensibilidad (%)	93	80	100	94

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Especificidad (%)	90	90	77	83
PPV (%)	90	80	83	77
NPV (%)	93	90	100	96
AUROC	0,96	0,95	0,97	0,95

Tabla 39 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	0,301	0,321	0,889	0,997	0,301	0,321	0,889	0,997
Sensibilidad (%)	75	93	80	75	87	100	94	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	75	77	83	89
PPV (%)	92	90	80	21	87	83	77	29
NPV (%)	69	93	90	99	75	100	96	100
AUROC	0,89	0,96	0,95	0,92	0,88	0,97	0,95	0,91

*Análisis de la regresión Ridge:*

- 5 Puntuación de enfermedad =  $-2,1690 + 0,1771 \times \log_2[\text{uDN5}](\text{ng/mg}) - 0,1074 \times \log_2[\text{uDN2}](\text{ng/mg}) + 0,2474 \times \log_2[\text{uGR3}](\text{ng/mg}) + 0,0168 \times \text{edad}(\text{años})$

Tabla 40 - Valores de corte que representan los estadios temprano y tardío de la DN indicados por los niveles de albúmina en la orina

	Conjunto de entrenamiento (n = 118)		Conjunto de ensayo (n = 47)	
	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria	DM frente a DN	DM, microalbuminuria frente a macroalbuminuria
Corte	2,139	2,880	2,139	2,880
Sensibilidad (%)	93	85	100	89
Especificidad (%)	90	90	73	83
PPV (%)	90	81	81	76
NPV (%)	93	92	100	92
AUROC	0,96	0,95	0,98	0,96

Tabla 41 - Valores de corte que representan los estadios de la DN 1-5

Estadio de DN	Conjunto de entrenamiento (n = 118)				Conjunto de ensayo (n = 47)			
	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5	1 fr. 2-5	1-2 fr. 3-5	1-3 fr. 4-5	1-4 fr. 5
Corte	2,128	2,139	2,880	4,051	2,128	2,139	2,880	4,051
Sensibilidad (%)	75	93	85	75	84	100	89	100
Especificidad (%)	89	90	90	90	69	73	83	89
PPV (%)	92	90	81	21	84	81	76	29
NPV (%)	69	93	92	99	69	100	92	100
AUROC	0,89	0,96	0,95	0,92	0,89	0,98	0,96	0,92

**Otras realizaciones**

5 Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta memoria descriptiva puede sustituirse por una característica alternativa que cumpla el mismo objetivo, un objetivo equivalente o similar. Así, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica descrita es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

10 A partir de la anterior descripción, los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad las características fundamentales de la presente invención, y pueden realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Lin, Wei-Ya  
 Yeh, Mary Ya-Ping  
 Tseng, Tzu-Ling  
 Cheng, Ping-Fu  
 Hsu, Tsai-Wei  
 Li, Hung-Yi  
 10 Chen, Yi-Ting  
 Lin, Yuh-Feng  
 Chen, Giien-Shuen  
 Li, Yen-Peng
- 15 <120> Biomarcadores de la orina y el suero asociados con la nefropatía diabética  
 <130> 70006-008001  
 <150> 61/147,778  
 20 <151> 28-01-2009  
 <160> 9  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 25 <210> 1  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Fragmento de alfa-2-HS-glicoproteína  
 <400> 1  
 Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu Val Ser His Pro Arg Lys  
 1 5 10 15  
 35 Thr
- <210> 2  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Fragmento de alfa-2-HS-glicoproteína
- 45 <400> 2  
 Met Gly Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu Val Ser His Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Lys Thr
- <210> 3  
 <211> 18  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Fragmento de alfa-1 antitripsina  
 55 <400> 3  
 Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Asp Phe
- <210> 4  
 60 <211> 21

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> Fragmento de alfa-1 antitripsina

<400> 4  
 Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Thr Gln Lys  
 20

<210> 5  
 10 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <223> Fragmento de alfa-1 antitripsina

<400> 5  
 Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
 20 25 30

<210> 6  
 20 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <223> Fragmento de alfa-1 antitripsina

<400> 6  
 Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
 20 25 30  
 Phe Ala

<210> 7  
 30 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 35 <223> Fragmento de alfa-1 glicoproteína ácida

<400> 7  
 Gly Gln Glu His Phe Ala His Leu Leu Ile Leu Arg Asp Thr Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Tyr Met Leu Ala Phe Asp Val Asn Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu Ser  
 20 25 30

<210> 8  
 40 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 45 <223> Fragmento de osteopontina

<400> 8  
 Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro Ser Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu Glu Thr Asn  
 20 25 30  
 Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys  
 35 40

ES 2 552 467 T3

<210> 9  
<211> 29  
<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Fragmento de osteopontina

10 <400> 9  
Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Thr Leu Pro Ser Lys  
20 25

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método para diagnosticar la nefropatía diabética en un sujeto, que comprende:

determinar el nivel de un biomarcador en una muestra de orina procedente de un sujeto sospechoso de padecer una nefropatía diabética, en el que el biomarcador es un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2), y

evaluar si el sujeto presenta una nefropatía diabética basándose en el nivel del biomarcador;

en el que un aumento en el nivel del biomarcador, comparado con el nivel en un sujeto sin nefropatía diabética, indica que el sujeto presenta una nefropatía diabética.

2.- El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar el nivel de un segundo biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el segundo biomarcador es un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFVVDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAQKTDTSHTDQDHTFNKIPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAQKTDTSHTDQDHTFNKIPNLAEFA (SEQ ID NO:6).

3.- El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además determinar el nivel de un biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el biomarcador es GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).

4.- El método de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además determinar el nivel de un fragmento de osteopontina en una muestra de suero procedente del sujeto, en el que el fragmento de osteopontina se selecciona del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).

5.- El método de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además, después de la etapa de evaluación, correlacionar el nivel del biomarcador con el estado de la nefropatía diabética, en el que un aumento en el nivel del biomarcador, con relación al nivel en un sujeto sin nefropatía diabética, indica que el sujeto se encuentra en el estadio tardío de la nefropatía diabética.

6.- Un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para la nefropatía diabética en un sujeto, que comprende:

determinar el nivel de un biomarcador antes del tratamiento en una muestra de orina procedente del sujeto, en el que el biomarcador es un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2),

determinar el nivel del biomarcador después del tratamiento en una muestra de orina procedente del sujeto, y

evaluar la eficacia del tratamiento basándose en el cambio en el nivel del biomarcador después del tratamiento,

en el que si el nivel del biomarcador después del tratamiento es igual o menor que el nivel del biomarcador antes del tratamiento, esto indica la eficacia del tratamiento.

7.- El método de la reivindicación 6, que comprende además determinar el nivel de un segundo biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el segundo biomarcador es un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFVVDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAQKTDTSHTDQDHTFNKIPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAQKTDTSHTDQDHTFNKIPNLAEFA (SEQ ID NO:6).

8.- El método de la reivindicación 6 o 7, que comprende además determinar el nivel de un tercer biomarcador en la muestra de orina del sujeto, en el que el tercer biomarcador es GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).

9.- El método de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además determinar el nivel de un fragmento de osteopontina en una muestra de suero procedente del sujeto, en el que el fragmento de osteopontina se selecciona del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).

10.- El método de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el sujeto es un paciente humano.

11.- El método de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el sujeto es un animal de laboratorio.

12.- Un método para determinar el estadio de la nefropatía diabética en un sujeto, que comprende:

determinar el nivel de un biomarcador en una muestra de orina procedente de un sujeto sospechoso de padecer una nefropatía diabética y, opcionalmente, uno o más factores clínicos, en el que el biomarcador es un fragmento de la

alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2), y los factores clínicos se seleccionan del grupo que consiste en la edad, el género, HbA1c, la proporción de albúmina/creatinina y la velocidad de filtración glomerular;

calcular una puntuación de enfermedad basándose en el nivel del biomarcador; y

- 5 evaluar el estadio de la nefropatía diabética del sujeto basándose en la puntuación de enfermedad, comparado con valores de corte predeterminados, en el que un aumento en la puntuación de la enfermedad, comparado con unos valores de corte predeterminados, indica que el sujeto se encuentra en un estadio tardío de la nefropatía diabética.

10 13.- El método de la reivindicación 12, que comprende además determinar el nivel de un segundo biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el segundo biomarcador es un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFEVKDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6).

15 14.- El método de la reivindicación 12 o 13, que comprende además determinar el nivel de un tercer biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el tercer biomarcador es GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).

15.- El método de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende además determinar el nivel de un fragmento de osteopontina en una muestra de suero procedente del sujeto, en el que el fragmento de osteopontina se selecciona del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).

20 16.- El método de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la puntuación de enfermedad se calcula mediante un análisis seleccionado del grupo que consiste en un análisis de la regresión Ridge, un análisis de factores, un análisis de la función discriminante, y un análisis de la regresión logística.

17.- Un método para controlar el avance de la nefropatía diabética en un sujeto, que comprende:

obtener una primera muestra de orina de un sujeto sospechoso de padecer una nefropatía diabética;

25 obtener una segunda muestra de orina del sujeto de 2 semanas a 12 meses después;

determinar en la primera y la segunda muestra el nivel de un biomarcador, en el que el biomarcador es un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2), y los factores clínicos se seleccionan del grupo que consiste en la edad, el género, HbA1c, la proporción de albúmina/creatinina y la velocidad de filtración glomerular;

30 calcular una primera puntuación de enfermedad y una segunda puntuación de enfermedad basándose en los niveles del biomarcador y, opcionalmente, uno o más factores clínicos, en la primera y la segunda muestra, respectivamente; y

evaluar el avance de la enfermedad en el sujeto,

35 en el que si la segunda puntuación de enfermedad es mayor que la primera puntuación de enfermedad, esto es indicativo de la exacerbación de la nefropatía diabética.

40 18.- El método de la reivindicación 17, que comprende además determinar el nivel de un segundo biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el segundo biomarcador es un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFEVKDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6).

19.- El método de la reivindicación 17 o 18, que comprende además determinar el nivel de un tercer biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el tercer biomarcador es GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).

45 20.- El método de las reivindicaciones 17 a 19, que comprende además determinar el nivel de un fragmento de osteopontina en una muestra de suero procedente del sujeto, en el que el fragmento de osteopontina se selecciona del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).

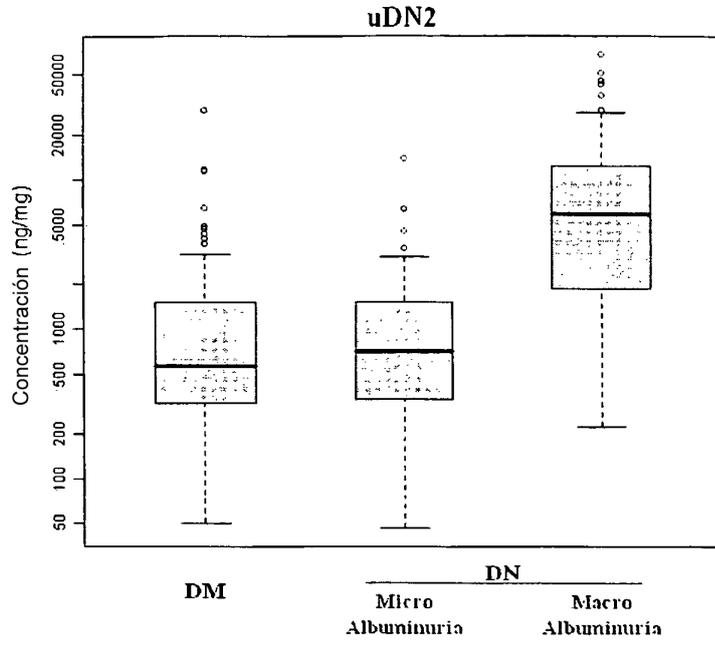
50 21.- El método de las reivindicaciones 17 a 20, en el que la puntuación de enfermedad se calcula mediante un análisis seleccionado del grupo que consiste en un análisis de la regresión Ridge, un análisis de factores, un análisis de la función discriminante, y un análisis de la regresión logística.

22.- Un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para la nefropatía diabética en un sujeto, que comprende:

- obtener una primera muestra de orina del sujeto antes del tratamiento,
- obtener una segunda muestra de orina del sujeto después del tratamiento,
- determinar en las muestras los niveles de un biomarcador, en el que el biomarcador es un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionada del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2), y los factores clínicos se seleccionan del grupo que consiste en la edad, el género, HbA1c, la proporción de albúmina/creatinina y la velocidad de filtración glomerular;
- 5 calcular una primera puntuación de enfermedad y una segunda puntuación de enfermedad basándose en los niveles de los biomarcadores y, opcionalmente, uno o más factores clínicos, en la primera y la segunda muestra, respectivamente; y
- 10 evaluar la eficacia del tratamiento en el sujeto,
- en el que si la segunda puntuación de enfermedad es igual o menor que la primera puntuación de enfermedad, esto indica la eficacia del tratamiento.
- 23.- El método de la reivindicación 22, que comprende además determinar el nivel de un segundo biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el segundo biomarcador es un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFVVKDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6).
- 15 24.- El método de la reivindicación 22 o 23, que comprende además determinar el nivel de un tercer biomarcador en la muestra de orina procedente del sujeto, en el que el tercer biomarcador es GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).
- 20 25.- El método de las reivindicaciones 22 a 24, que comprende además determinar el nivel de un fragmento de osteopontina en una muestra de suero procedente del sujeto, en el que el fragmento de osteopontina se selecciona del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).
- 25 26.- El método de las reivindicaciones 22 a 25, en el que la puntuación de enfermedad se calcula mediante un análisis seleccionado del grupo que consiste en un análisis de la regresión Ridge, un análisis de factores, un análisis de la función discriminante, y un análisis de la regresión logística.
- 27.- Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un péptido seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2).
- 30 28.- Un kit para el diagnóstico de la nefropatía diabética, que comprende un anticuerpo que es capaz de unirse a un fragmento de la alfa-2-HS-glicoproteína seleccionado del grupo que consiste en VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) y MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2).
- 29.- El kit de la reivindicación 28, que comprende además un anticuerpo, que es capaz de unirse a un fragmento de la alfa-1 antitripsina seleccionado del grupo que consiste en KGKWERPFVVKDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAE (SEQ ID NO:5) y EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6).
- 35 30.- El kit de la reivindicación 28 o 29, que comprende además un anticuerpo, que es capaz de unirse a GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7).
- 40 31.- El kit de las reivindicaciones 28 a 30, que comprende además un anticuerpo, que es capaz de unirse a un fragmento de osteopontina seleccionado del grupo que consiste en YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) y KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9).
- 32.- El kit de las reivindicaciones 28 a 31, en el que los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina completas.

Fig. 1

A.



B.

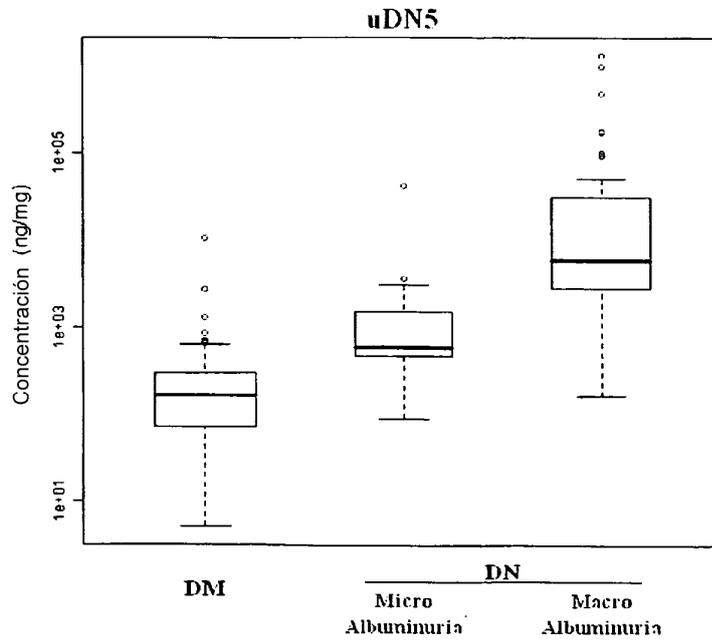
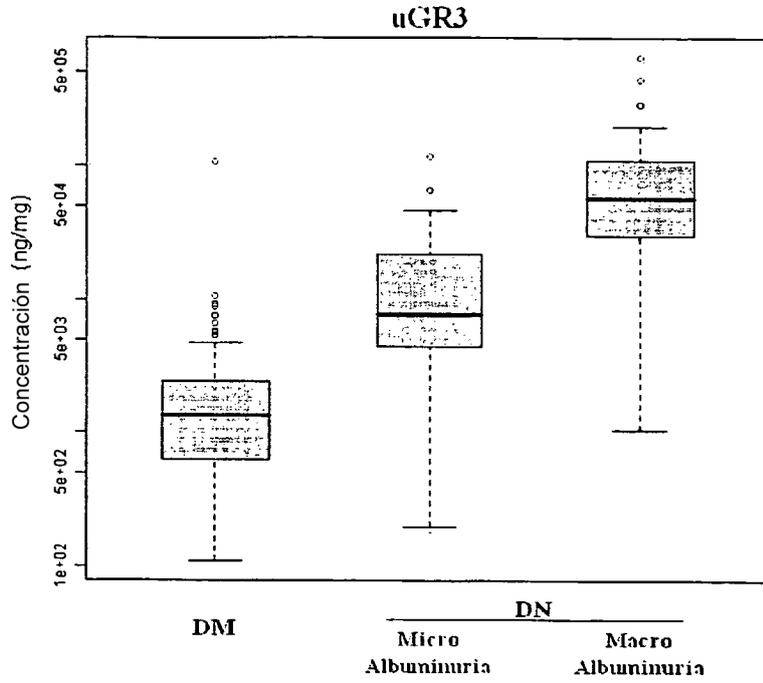


Fig. 1 (cont.)

C.



D.

