

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 910**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)
<b>A61P 13/12</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/25</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011** E 16194985 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** EP 3151012

54 Título: **Biomarcadores relacionados con nefropatía diabética**

30 Prioridad:

**21.09.2010 AU 2010904249**

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

**30.04.2018**

73 Titular/es:

**PROTEOMICS INTERNATIONAL PTY LTD (50.0%)  
PO Box 3008 Broadway Nedlands  
Crawley, Western Australia 6009, AU y  
THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**STOLL, THOMAS;  
BRINGANS, SCOTT;  
WINFIELD, KAYE;  
CASEY, TAMMY;  
DAVIS, WENDY;  
DAVIS, TIMOTHY;  
PETERS, KIRSTEN y  
LIPSCOMBE, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 665 910 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 relacionados con nefropatía diabética

**Campo de la descripción**

5 La descripción se refiere a biomarcadores relacionados con prediabetes, diabetes y afecciones relacionadas con la diabetes, tales como la nefropatía diabética, métodos de utilización de los biomarcadores para determinar el riesgo de que un individuo desarrolle prediabetes, diabetes y afecciones relacionadas con la diabetes, métodos de detección de una población para identificar a las personas en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y afecciones relacionadas con la diabetes y, y dianas farmacológicas para prediabetes, diabetes y afecciones relacionadas con la diabetes.

**10 Antecedentes de la invención**

15 La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y uno de los principales problemas de salud pública de nuestro tiempo. En todo el mundo hay una población cada vez mayor de pacientes con diabetes que están imponiendo una gran carga financiera en los sistemas sanitarios. La prevalencia de la diabetes para todos los grupos de edad en todo el mundo se estimó en 2,8% en 2000 y 4,4% para 2030. Se prevé que el número total de personas con diabetes aumentará de 171 millones en 2000 a 366 millones en 2030. En 2002, la prevalencia de diabetes en la población australiana fue del 7,4% en los mayores de 25 años, y el número de australianos con diabetes se ha triplicado desde 1981.

20 La diabetes tipo 2 es con mucho la más frecuente, p. ej., afectando al 90 a 95% de la población estadounidense con diabetes. La prevalencia de la diabetes mellitus aumenta con la edad, y cabe esperar que el número de personas mayores con diabetes aumente a medida que aumenta el número de personas mayores. Junto con la creciente tasa de diabetes también hay una mayor prevalencia de metabolismo alterado de la glucosa, que se asocia con un mayor riesgo de cardiopatías y diabetes. Diabetes es un término que abarca la prevalencia de diabetes, obesidad, alteración del metabolismo de la glucosa y los factores de riesgo asociados de hipertensión y perfiles lipídicos plasmáticos anormales (dislipidemia). La "epidemia de diabetes" continuará incluso si los niveles de obesidad permanecen constantes. Dada la creciente prevalencia de la obesidad, es probable que estas cifras subestimen la prevalencia de diabetes futura.

25 La diabetes mellitus es una enfermedad en la que el cuerpo no puede mantener concentraciones normales de glucosa en sangre. La mayoría de los casos de diabetes mellitus se clasifican en tres grandes categorías: tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional. La diabetes tipo 1 es el resultado de la insuficiencia del cuerpo para producir insulina, y actualmente requiere que la persona se inyecte insulina. La diabetes tipo 2 es el resultado de la resistencia a la insulina, una enfermedad en la que las células no pueden usar la insulina adecuadamente, a veces combinada con una carencia absoluta de insulina.

30 La diabetes tipo 2 generalmente se pueden controlar en primera instancia mediante ejercicio regular y la dieta. Pueden ser necesarios comprimidos y con el tiempo inyecciones de insulina a medida que avanza la enfermedad. Con el tiempo, altas concentraciones de glucosa en sangre pueden dañar los vasos sanguíneos y los nervios. Estas complicaciones de la diabetes pueden causar daños en los ojos, los nervios y los riñones y aumentar el riesgo de ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, impotencia y problemas en los pies. Este daño puede ocurrir antes de que un individuo sepa que tiene diabetes si no se lo detecta durante mucho tiempo. Por lo tanto, es importante diagnosticar y controlar la diabetes y sus complicaciones en una etapa muy temprana.

35 La diabetes también es la mayor causa de enfermedad renal (nefropatía) en los países desarrollados y es responsable de los enormes costos en diálisis. Del 10% al 20% de las personas con diabetes morirán de insuficiencia del riñón (renal). Las razones detrás de la complicación de la nefropatía en la diabetes son complejas e incluyen los efectos tóxicos de las altas concentraciones de glucosa; presión arterial elevada; concentraciones anormales de lípidos y anomalías de pequeños vasos sanguíneos. El resultado acumulativo es que hay un engrosamiento de los glomérulos en el riñón que permite que la proteína (albúmina) se excrete en la orina.

40 La diabetes se ha convertido en la causa más frecuente de insuficiencia renal en etapa terminal (ESRF) en el 40-50% de casos ESRD y los gastos anuales de Australian Medicare son mayores para pacientes con ESRF ocasionada por diabetes en comparación con todos los demás diagnósticos primarios de ESRD. Hasta un tercio de los adultos con diabetes tipo 2 recién diagnosticada ya padecen enfermedad renal crónica, y los datos sugieren que en muchos de estos pacientes puede haberse desarrollado en el curso del estado prediabético. La enfermedad es progresiva y afecta a más hombres que mujeres.

45 La nefropatía diabética se detecta principalmente midiendo la cantidad de albúmina excretada en la orina (albuminuria). La albuminuria generalmente se mide usando la proporción de albúmina y creatinina (ACR). Esta es la relación entre la albúmina y la creatinina en la orina. La proporción considera la concentración de albúmina en relación con la tasa de filtración glomerular, que viene determinada por la cantidad de creatinina en la orina. La albuminuria se define como: ACR >2,5mg/mmol (hombres) o >3,5mg/mmol (mujeres).

A pesar de numerosos estudios y algoritmos que se han utilizado para evaluar el riesgo de diabetes y afecciones relacionadas, sigue habiendo necesidad de métodos precisos de evaluar dichos riesgos o enfermedades que

pueden ser fácilmente adoptados por los médicos de atención primaria quienes lo más probable es que inicialmente encuentren al prediabético o diabético precoz no diagnosticado.

5 Por consiguiente, sigue habiendo necesidad de métodos relativamente económicos y convenientes para identificar personas en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes y para el seguimiento de pacientes con prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes. Dichos métodos podrían usarse para examinar a una gran población para identificar personas en situación de riesgo de diabetes, para evaluar a una persona para determinar su riesgo de desarrollar diabetes, para controlar la salud de pacientes con diabetes y evaluar la eficacia de las intervenciones diseñadas para tratar diabetes, prediabetes y/o afecciones relacionadas. También hay necesidad de identificar nuevas dianas farmacológicas para la prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes, incluidas las dianas farmacológicas. La identificación de nuevas dianas farmacológicas permitirá el desarrollo de nuevas intervenciones para la prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes.

El documento WO2010/085879 describe biomarcadores de orina y suero relacionados con la nefropatía diabética.

El documento KR100792630 describe biomarcadores para diagnosticar la nefropatía diabética.

15 El documento US2007111245 describe una técnica para predecir la nefropatía diabética.

Granier *et al.*, 2008 *Nephrology Dialysis Trasplantation* vol. 23 págs. 792-799 describe marcadores genéticos y proteicos de la nefropatía diabética.

Rao *et al.*, 2007 *Diabetes Care*. vol. 30 págs. 629-637 describe la identificación proteómica de biomarcadores urinarios de nefropatía diabética.

20 Hung *et al.*, 2005 *Molecular Biosystems* vol. 7 nº 6 págs.1990-1998 describe el análisis proteómico en plasma de los marcadores de isquemia crítica de las extremidades en pacientes diabéticos con hemodiálisis.

Es en este contexto y los problemas y dificultades relacionados con el mismo que se ha desarrollado la presente invención.

**Compendio de la invención**

25 En un aspecto, la presente invención proporciona un método de evaluación de un paciente para nefropatía diabética que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en donde al menos dicho biomarcador es similar al antígeno CD5.

Otros aspectos son como en las reivindicaciones adjuntas.

Tabla 1

Proteína	Número de entrada (base de datos UniProt)
Peroxirredoxina-2	P32119
Proteína AMBP	P02760
Subunidad B subcomponente del complemento C1q	P02746
Apolipoproteína A-IV	P06727
Apolipoproteína C-III	P02656
Proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide	P17936
Adiponectina	Q15848
Proteína 2 relacionada con el factor H del complemento	P36980
Subunidad de hemoglobina beta	P68871
Antígenoide CD5	043866
Apolipoproteína B-100	P04114
Sulfhidril oxidasa 1	O00391
Cadena beta del componente C8 del complemento	P07358

30

Tabla 2

Proteína	Número de entrada (base de datos UniProt)
Peroxirredoxina-2	P32119
Proteína AMBP	P02760
Subunidad B subcomponente del complemento C1q	P02746 5
Adiponectina	Q15848
Proteína 2 relacionada con el factor H del complemento	P36980
Apolipoproteína B-100	P04114
Sulfhidril oxidasa 1	O00391
Apolipoproteína A-IV	P06727 10

También se describe un equipo que contiene reactivos para medir al menos un biomarcador en una muestra de un paciente, en donde al menos dicho biomarcador se selecciona de la lista de los biomarcadores en la tabla 1 o 2.

15 También se describe un medio legible por ordenador que tiene instrucciones ejecutables por ordenador para la evaluación de un paciente para prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes, comprendiendo el medio legible por ordenador: una rutina, almacenada en el medio legible por ordenador y adaptada para ser ejecutada por un procesador, para almacenar datos de medición de biomarcadores que representan al menos un biomarcador seleccionado de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

20 También se describe un método de evaluación de un tratamiento para la prediabetes, la diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende medir al menos un biomarcador, en una muestra del paciente sometido a tratamiento, seleccionado de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2, al menos dos veces durante el transcurso del tratamiento.

25 También se describe un método de evaluar el riesgo de un paciente que desarrolla prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende medir al menos un biomarcador, en una muestra del paciente, seleccionado de la lista de los biomarcadores en la tabla 1 o 2.

También se describe un método de seguimiento de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende medir al menos un biomarcador, en una muestra del paciente, seleccionado de la lista de los biomarcadores en la tabla 1 o 2 y comparar la medida obtenida con otra medida al menos del biomarcador.

30 También se describe un método para diagnosticar o identificar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende medir al menos un biomarcador, en una muestra del paciente, seleccionado de la lista de los biomarcadores en la tabla 1 o 2.

35 También se describe un método para diagnosticar diferencialmente la nefropatía de otras enfermedades que también producen proteinuria en un paciente que comprende medir al menos un biomarcador, en una muestra del paciente, seleccionado de la lista de los biomarcadores en la tabla 1 o 2.

También se describe un método para diagnosticar diferencialmente subclases o etapas de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende medir al menos un biomarcador, en una muestra del paciente, seleccionado de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

También se describe un sistema de ensayo que comprende:

40 (i) medios para obtener datos de resultados del ensayo que representan niveles de al menos un biomarcador seleccionado de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2, en una muestra del paciente;

(ii) medios para recoger y rastrear los datos de los resultados del ensayo generados en la etapa (i);

45 (iii) medios para calcular un valor del índice de riesgo de la prediabetes, diabetes y/o afección relacionada con la diabetes a partir de los datos de los resultados del ensayo, en donde dicho valor del índice de riesgo es representativo del riesgo de un individuo que desarrolla o tiene prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes; y

(iv) medios para presentar dicho valor del índice de riesgo.

50 También se describe un método de clasificación o agrupación de una población de individuos, que comprende: la obtención de datos de índice de riesgo de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes para individuos en dicha población; y clasificar a los individuos dentro de la población en relación con los demás

individuos de la población o dividir la población en al menos dos grupos, basados en los factores que comprenden dichos datos del índice de riesgo obtenido.

5 También se describe un método de evaluación de un criterio de valoración alternativo de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes un en un paciente, comprendiendo el método: medir al menos un biomarcador de la lista de biomarcadores de la tabla 1 o 2; y evaluar un criterio de valoración alternativo de una diabetes, prediabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en el paciente en base a dicha medida.

También se describe un método para evaluar el riesgo de un paciente que desarrolla prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en el que al menos dicho biomarcador se selecciona de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

10 También se describe un método de seguimiento del riesgo de un paciente en desarrollo prediabetes, la diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en el que al menos dicho biomarcador se selecciona de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

15 También se describe un método para diagnosticar o identificar un paciente con prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en el que al menos dicho biomarcador se selecciona de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

También se describe un método de seguimiento de un tratamiento o intervención de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en donde al menos dicho biomarcador se selecciona de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

20 También se describe un método para diagnosticar diferencialmente un estado patológico o subclase de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en donde al menos dicho biomarcador se selecciona de la lista de biomarcadores en la tabla 1 o 2.

25 También se describe un método de tratamiento de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende: evaluar el riesgo, para el paciente, de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes utilizando al al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 y tratar al paciente cuando se identifique que está en elevado riesgo de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes con un régimen de tratamiento para retrasar o evitar la aparición de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

30 También se describe un método de clasificación o agrupación de una población de pacientes, que comprende: la obtención de datos que representa una puntuación de riesgo de prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes para los pacientes comprendidos dentro de dicha población, en donde dicha puntuación de riesgo se calcula utilizando al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 y clasificando a los pacientes dentro de la población en relación con los restantes individuos en la población o dividiendo la población en al menos dos grupos, basados en factores que comprenden dichos datos de puntuación de riesgo obtenidos.

35 También se describe un método de identificación o evaluación de un agente para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende:

(i) poner en contacto células que expresan al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 con un supuesto agente; y

40 (ii) comparar la expresión y/o las concentraciones de al menos un biomarcador de la tabla 1 en las células antes del contacto con el supuesto agente para la expresión y/o niveles de al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 en las células después del contacto con el supuesto agente;

en donde un cambio en la concentración o la expresión identifica al agente como un agente para tratar la prediabetes, la diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

También se describe el uso de al menos un biomarcador en la tabla 1 o 2 como una diana farmacológica para la prediabetes, la diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

45 También se describe un método de tratamiento o reducción del riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente adaptado para cambiar la expresión o la concentración de al menos un biomarcador en la tabla 1 o 2.

50 También se describe la utilización de un agente adaptado para cambiar la expresión o la concentración de al menos un biomarcador en la tabla 1 o 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la reducción del riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

**Breve descripción de los dibujos**

La siguiente descripción detallada puede entenderse junto con las figuras adjuntas, en las que:

5 La Figura 1 es una tabla que indica los datos de proteínas de biomarcadores obtenidos de tres estudios con respecto a la presencia de nefropatía diabética en pacientes con diabetes medidos mediante seguimiento de reacción múltiple (MRM);

La figura 2 es una serie de diagramas de caja y bigotes para cada biomarcador indicado en la figura 1 procedente del estudio FDS1 (diagrama de caja izquierdo: grupo diabético; diagrama de caja derecho: grupo diabético con nefropatía grave; eje x: proteína/péptido; eje y: relación de abundancia relativa; secuencias de péptidos: ATA = ATAVVDGAFK; TVA = TVAACNLPIVR; EYC = EYCGVPGDGDEELLR; LEP = LEPYADQLR e ISA = ISASAEELR)

10 La figura 3 es una serie de diagramas de caja y bigotes para cada biomarcador indicado en la figura 1 procedente del estudio FDS2 (diagrama de caja izquierdo: grupo diabético; diagrama de caja derecho: grupo diabético con nefropatía grave; eje x: proteína/péptido; eje y: relación de abundancia relativa; secuencias de péptidos: IAF = IAFSATR; LEP = LEPYADQLR; ISA = ISASAEELR; ALA = ALAQCAPPAVCAELVR; FLN = FLNVLSPR; DAL = DALSSVQESQVAQQAR; TVA = TVAACNLPIVR; EYC = EYCGVPGDGDEELLR; GDI = GDIGETGVPGAEGPR; 15 TGD = TGDIVEFVCK y LVY = LVYPSCEEK);

La figura 4 es una serie de diagramas de caja y bigote para cada biomarcador indicados en la figura 1 del estudio BDS (gráfico de caja izquierdo: grupo diabético; gráfico de caja derecho: grupo diabético con nefropatía grave; eje x: proteína/ péptido; eje y: relación de abundancia relativa; secuencias peptídicas: LVG = LVGGDNLCSGR; IWL = IWLNDNVR; SVS = SVSLPSLDPASAK y TEV = TEVIPPLIENR); y

20 la figura 5 es una tabla que indica los datos de proteínas de biomarcadores obtenidos del estudio BDS con respecto a pacientes con nefropatía diabética y pacientes sanos medidos por MRM.

**Descripción detallada**

En todos los párrafos siguientes, la palabra "invención" se debe leer como "descripción".

25 La presente invención se refiere a la identificación de biomarcadores relacionados con la prediabetes, la diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes, tal como la nefropatía diabética. Por consiguiente, la presente invención presenta métodos para identificar pacientes que están en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes, incluidos los pacientes que son asintomáticos o que solo presentan indicadores no específicos de prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes mediante la detección de los biomarcadores descritos en la presente memoria. Estos biomarcadores también son útiles para el 30 seguimiento de pacientes sometidos a tratamientos y terapias para prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes, y para seleccionar o modificar terapias y tratamientos que serían eficaces en pacientes que tienen prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes, en donde la selección y el empleo de dichos tratamientos y terapias ralentizan la evolución de la prediabetes, la diabetes y/o las afecciones relacionadas con la diabetes, o evitan su aparición. La presente invención también presenta nuevas dianas farmacológicas para 35 prediabetes, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes que comprenden al menos uno de los biomarcadores en la tabla 1 o 2.

**Definiciones**

40 Los "agentes para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes" incluyen: insulina tal como insulina madura, proinsulina y péptido C soluble (SCp), formas de acción rápida de insulina, insulina regular, insulina de acción intermedia y formas de insulina de acción prolongada; agentes hipoglucemiantes; agentes antiinflamatorios; agentes reductores de lípidos; antihipertensivos como bloqueadores de los canales de calcio, bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2 incluidos los profármacos de inhibidores de COX-2, inhibidores del sistema de angiotensina incluidos los bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRA), inhibidores de ECA e inhibidores de renina incluidos aminoácidos y sus derivados, 45 péptidos y sus derivados y anticuerpos contra la renina.

Los "antagonistas de angiotensina II" son compuestos que interfieren con la actividad de angiotensina II uniéndose a receptores de angiotensina II e interfiriendo con su actividad e incluyen compuestos peptídicos y compuestos no peptídicos. La mayoría de los antagonistas de angiotensina II son congéneres ligeramente modificados en los que la actividad agonista se atenúa por sustitución de la fenilalanina en la posición 8 por algún otro aminoácido. Los 50 ejemplos de antagonistas de angiotensina II incluyen: compuestos peptídicos (p. ej., saralasin, octapéptido angiotensina-(1-8) y análogos relacionados); Imidazol-2-ona N-sustituido; derivados de acetato de imidazol incluidos ácido 2-N-butil-4-cloro-1-(2-clorobencil)imidazol-5-acético; ácido 4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico y derivados análogos; análogos de N2-tetrazol beta-glucurónido; pirroles, pirazoles y triazoles sustituidos; fenol y derivados heterocíclicos tales como 1,3-imidazoles; heterociclos de anillo de 7 eslabones fusionado con 55 imidazo; anticuerpos contra angiotensina II; y compuestos de aralquil imidazol tales como imidazoles sustituidos con bifenilmetilo; ES8891 (N-morfolinoacetil-(-1-naftil) -L-alanil-1- (4, tiazolil) -L-alanil (35,45) -4-amino-3-hidroxi-5-ciclohexapentanoil-N -hexilamida); SKF108566 (ácido E-alfa-2-[2-butil-1-(carboxifenil)metil]-1H-imidazol-5-il[metilan-o]-2-tiofenopropanoico); Losartan (DUP753/MK954); y Remikirin.

Los "inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)" incluyen aminoácidos y sus derivados, péptidos, incluidos di- y tri-péptidos y anticuerpos contra ECA que intervienen en el sistema renina-angiotensina inhibiendo la actividad de ECA reduciendo o eliminando de ese modo la formación de sustancia vasotensora angiotensina II. Las clases de compuestos conocidos por ser útiles como inhibidores de ECA incluyen acilmercapto y mercaptoalcanoil prolinas tales como captopril y zofenopril, carboxialquil dipéptidos tales como enalapril, lisinopril, quinapril, ramipril y perindopril, simuladores del dipéptido carboxialquil tales como cilazapril y benazapril, fosfinilalcanoil prolinas tales como fosinopril y trandolopril.

Los agentes "antiinflamatorios" incluyen Alclofenac; dipropionato de Alclometasona; acetónido de Algestona; alfa Amilasa; Amcinafal; Amcinafide; Amfenac sódico; hidrocloreto de amiprilosa; Anakinra; Aniolac; Anitrazafén; Apazona; Balsalazida disódica; Bendazac; Benoxaprofeno; hidrocloreto de Bencidamina; Bromelanos; Broperamol; Budesonida; Carprofeno; Cicloprofeno; Cintazone; Cliprofeno; propionato de Clobetasol; butirato de Clobetasona; Clopirac; propionato de Cloticasona; acetato de Cormetasona; Cortodoxona; Deflazacort; Desonida; Desoximetasona; dipropionato de Dexametasona; Diclofenaco potásico; Diclofenaco sódico; diacetato de Diflorasona; Diflumidona sódica; Diflunisal; Difluprednato; Diftalona; de sulfóxido de dimetilo; Drocinonida; Edrisona; Enlimomab; Enolicam sódico; Epirizol; Etodolac; Etofenamato; Felbinac; Fenamol; Fenbufeno; Fenclofenaco; Fenclorac; Fendosal; Fempipalona; Fentiazac; Flazalona; Fluazacort; ácido flufenámico; Flumizol; acetato de Flunisolida; Flunixina; Flunixina Meglumina; butil Fluocortina; acetato de fluorometolona; Fluquazona; Flurbiprofeno; Fluretófeno; propionato de Fluticasona; Furaprofeno; Furobufeno; Halcinonida; propionato de Halobetasol; acetato de Halopredona; Ibufenaco; Ibuprofeno; Ibuprofeno aluminio; Ibuprofeno Piconol; Ilonidap; Indometacina; Indometacina sódica; Indoprofeno; Indoxol; Intrazol; acetato de isoflupredona; Isoxepac; Isoxicam; Cetoprofeno; hidrocloreto de Lofemizol; Lornoxicam; Etabonato de Loteprednol; Meclofenamato sódico; ácido meclofenámico; dibutirato de Meclorisona; ácido mefenámico; Mesalamina; Meseclazona; Suleptanato de Metilprednisolona; Morniflumato; Nabumetona; Naproxeno; Naproxeno sódico; Naproxol; Nimazona; Olsalazina sódica; Orgoteína; Orpanoxina; Oxaprozina; Oxifenbutazona; hidrocloreto de Paranilina; Pentosán polisulfato sódico; Fenbutazona sódica glicerato; Pirofenidona; Piroxicam; cinamato de Piroxicam; Piroxicam Olamina; Piroprofeno; Prednazato; Prifelona; Ácido prodólico; Proquazona; Proxazol; citrato de proxazol; Rimexolona; Romazarit; Salcolex; Salnacedina; Salsalato; Salicilatos; cloruro de Sanguinario; Seclazona; Sermetacina; Sudoxicam; Sulindac; Suprofen; Talmetacina; Talniflumato; Talosalato; Tebufelona; Tenidap; Tenidap sódico; Tenoxicam; Tesicam; Tesimida; Tetridamina; Tiopinac; pivalato de Tixocortol; Tolmetina; Tolmetina sódica; Triclonida; Triflumidato; Zidometacina; Glucocorticoides; Zomepirac sódico, aspirina, inhibidores de citocinas como antagonistas de citocinas (p. ej., antagonistas del receptor de IL-6), lisofosfolípidos de aza-alkil (AALP) y inhibidores del factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa), tales como los anticuerpos anti-TNF-alfa, receptor de TNF soluble, TNF-alfa, moléculas de ácido nucleico complementario, guanilhidrazona polivalente (CNI-1493), N-acetilcisteína, pentoxifilina, oxpentifilina, análogos de nucleósidos carboxílicos, Dexanabinol e inhibidores de TNF-alfa tales como Etanercept e Infliximab.

Los "agentes bloqueadores del receptor beta-adrenérgico" antagonizan los efectos cardiovasculares de las catecolaminas en la angina de pecho, la hipertensión y las arritmias cardíacas e incluyen atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hidroalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindolol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimetoprolol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxiopropoxi)-3-piridincarbonitril HCl-, 1-butilamino-3-(2,5-diclorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propil)tiol-4-(5-carbamoil-2-tienil) tiazol y 7-(2-hidroxi-3-t-butilaminopropoxi)ftalida.

Los "bloqueadores de los canales de calcio" pertenecen a uno de los tres principales grupos químicos de fármacos, las dihidropiridinas tales como nifedipina, las fenil-alkilaminas, tales como verapamil, y las benzotiazepinas, tales como diltiazem. Otros bloqueadores de los canales de calcio útiles según la invención incluyen aminona, amlodipino, benciclina, felodipino, fendilino, flunarizina, isradipina, nicaldipina, nimodipina, perhexileno, gallopamil, tiapamil y análogos de tiapamil, feniloína, barbitúricos y los péptidos dinorfina, omega-conotoxina, y omega-agatoxina.

"Diabetes" incluye la diabetes tipo 1, tanto autoinmunitaria como idiopática, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional. La diabetes puede caracterizarse por hiperglucemia recurrente y persistente y puede diagnosticarse por un aumento de las concentraciones de glucosa en sangre y de hemoglobina glucosilada ( $\geq 6,5\%$ ). Según la definición actual, dos mediciones de glucosa en ayunas por encima de 126 mg/dl (7,0 mmol/l) se consideran diagnósticos para diabetes mellitus.

"Enfermedad relacionada con la diabetes" incluye cualquier afección o enfermedad que es un resultado o complicación de la diabetes o está correlacionada o relacionada con ella incluida una enfermedad causada por concentraciones de glucosa en sangre más altas que las normales y una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en: hipoglucemia, cetoacidosis diabética, neuropatía diabética, enfermedad renal incluidas la nefropatía diabética, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, retinopatía diabética y enfermedad arteriovascular.

"Biomarcador" en el contexto de la presente invención abarca, sin limitación, las proteínas en la tabla 1 o 2 y las sus medidas *de facto*; ácidos nucleicos que codifican las proteínas en la tabla 1 o 2; metabolitos y productos de degradación de las proteínas en la tabla 1 o 2; polimorfismos, mutaciones, variantes, modificaciones, subunidades, péptidos (tales como los de la tabla 3) y fragmentos de las proteínas en la tabla 1 o 2; y complejos proteína-ligando

incluidas las proteínas en la tabla 1 o 2. Los biomarcadores también pueden incluir proteínas con al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % de identidad o similitud con las proteínas en la tabla 1 o 2 así como formas mutadas de las proteínas en la tabla 1 o 2 y ácidos nucleicos que codifican dichas mutaciones. Los biomarcadores pueden usarse para calcular índices matemáticos y otras mediciones, incluidas tendencias y diferencias temporales que son útiles con respecto a la presente invención.

"Diabetes gestacional" se refiere a la intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Esta enfermedad provoca un alto nivel de azúcar en la sangre que comienza o se diagnostica por primera vez durante el embarazo.

Los agentes "hipoglucemiantes" incluyen agentes hipoglucemiantes orales e incluyen, sin limitación, sulfonilureas de primera generación: acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida; sulfonilureas de segunda generación: Glipizida, Gliburida, Glimepirida; biguanidas: Metformina; inhibidores de alfa-glucosidasa: Acarbosa, Miglitol, tiazolidindionas: Rosiglitazona, Pioglitazona, Troglitazona; Meglitinidas: Repaglinida; y otros hipoglucémicos tales como Acarbosa; Buformina; hidrocloreuro de butoxamina; Camiglibosa; Ciglitazona; Englitazona sódica; Darglitazona; hidrocloreuro de Etoformina; Gliamilida; Glibomurida; Glicetaniol, Gliclazida sódica; Gliflumida; Glucagón; Glihexamida; Glimidina sódica; Gliotamida; Gliparamida; Linoglitazona; fumarato de Linoglitazona; palmoxirato de metilo; palmoxirato sódico; tartrato de Piroglitazona; Proinsulina Humana; acetato de Seglitazona; Tolazamida; Tolpirramida; Zopolrestat.

"Glucosa en ayunas alterada" (IFG) es una afección prediabética relacionada con una concentración de glucosa en sangre que es superior a la normal, pero no lo suficientemente alto como para clasificarse como diabetes. Un paciente con IFG puede tener una concentración de azúcar (glucosa) en la sangre en ayunas inferior o igual a 125 mg/l, entre 100 y 125 mg/dl o entre 105 y 125 mg/dl.

El término "identidad" empleado en la presente memoria se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas, como se determina comparando las secuencias. "Identidad" también significa el grado de parentesco de secuencia entre las secuencias de molécula de polipéptido o de ácido nucleico, según sea el caso, determinado por la coincidencia entre cadenas de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre dos o más secuencias con alineaciones de espacios dirigidas por un modelo matemático particular de programas informáticos.

"Tolerancia alterada a la glucosa" (IGT) es una afección prediabética relacionada con una concentración de glucosa en sangre que es mayor que lo normal, pero no lo suficientemente alta como para clasificarse como diabetes. Un paciente con IGT puede tener concentraciones de glucosa de dos horas de 140 a 199 mg/dl (7,8 a 11,0 mmol) en la prueba de tolerancia oral a la glucosa de 75 g.

"Agentes reductores de lípidos" incluyen Gemfibrozil, Colistiramina, Colestipol, ácido nicotínico, e inhibidores de la HMG-CoA reductasa tal como simvastatina, lovastatina, pravastatina sódica, fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina.

El término "medición" y variantes tales como "medida", como se emplea en la presente memoria en relación con los biomarcadores descritos en la presente memoria se refiere a la determinación de la presencia y/o cantidad de un biomarcador dado.

"Prediabetes" es un estado en el que algunos, pero no todos los criterios de diagnóstico para la diabetes se cumplen. Incluye enfermedades donde los pacientes presentan concentraciones de azúcar en sangre entre concentraciones normales y diabéticas, enfermedades en las que los pacientes padecen intolerancia a la glucosa (IGT), alteración de la glucosa en ayunas (IFG) y/o hemoglobina glucosilada entre 5,7 y 6,4%.

Una "muestra" en el contexto de la presente invención es una muestra biológica aislada de un paciente y puede incluir, a modo de ejemplo y no de limitación, sangre completa, fracción de sangre, suero, plasma, células sanguíneas, células endoteliales, biopsias de tejidos, líquido linfático, fluido de ascitis, líquido intersticial (también conocido como "líquido extracelular" y abarca el líquido que se encuentra en los espacios entre las células, incluidos, entre otros, el fluido crevicular gingival), médula ósea, líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, moco, esputo, sudor, orina o cualquier otra secreción, excreción u otros fluidos corporales.

El término "similitud" es un concepto relacionado con "identidad", pero en cambio se refiere a una medida de similitud que incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias conservadoras de sustitución. Como las sustituciones conservativas se aplican a polipéptidos y no a moléculas de ácido nucleico, la similitud solo se refiere a las comparaciones de secuencias de polipéptidos. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, 10 de 20 aminoácidos idénticos, y el resto son todas sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y similitud serían ambas del 50%. Si en el mismo ejemplo, hay 5 posiciones más donde hay sustituciones conservadoras, entonces el porcentaje de identidad sigue siendo del 50%, pero la similitud porcentual sería del 75% (15 de cada 20). Por lo tanto, en los casos en que hay sustituciones conservadoras, el grado de similitud entre dos secuencias de polipéptidos será mayor que la identidad porcentual entre estas dos secuencias.

La expresión "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido natural por un resto normativo de tal manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, una sustitución conservativa resulta del reemplazo de un resto apolar en un polipéptido por cualquier otro resto apolar. Además, cualquier resto natural en el polipéptido también puede

sustituirse por alanina. Las reglas generales para las sustituciones conservadoras de aminoácidos se indican en la tabla siguiente:

Restos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Ásp	Ásp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

- 5 Las sustituciones conservativas de aminoácidos también abarcan restos de aminoácidos no naturales que se incorporan generalmente por síntesis de péptidos químicos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de restos de aminoácidos. Cabe esperar que las modificaciones conservativas para la secuencia de aminoácidos (y las modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificadores) produzcan polipéptidos que tengan características funcionales y químicas similares a las de los biomarcadores en la tabla 1. Por el contrario, modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de los biomarcadores en la tabla 1 pueden lograrse seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una configuración en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales se pueden dividir en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:
- 10
- 15 1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;  
 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;  
 3) ácidos: Asp, Glu;  
 4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;  
 5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 20 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Los métodos preferidos para determinar la identidad y/o similitud se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen el paquete de programa GCG, incluido GAP (Devereux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y

25

FASTA (Atschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990)). El programa BLAST X está disponible al público en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y en otras fuentes (Altschul *et al.*, BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, Mediante.); Altschul *et al.*, 1990, anteriormente). El muy conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

5 Un "paciente" en el contexto de la presente invención es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca. Un paciente puede ser uno que ha sido previamente diagnosticado o identificado como que tiene diabetes, prediabetes o una afección relacionada con la diabetes, y opcionalmente ya ha sido sometido, o está siendo sometido, a una intervención terapéutica para diabetes, prediabetes o afección relacionada con la diabetes. Alternativamente, un paciente también puede ser uno que no haya sido previamente diagnosticado con prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes. Por ejemplo, un paciente puede ser uno que presenta uno o más factores de riesgo para prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes, o un paciente que no presenta ninguno de dichos factores de riesgo o un paciente que es asintomático para la prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes. Un paciente también puede ser uno que padece o está en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

#### Diagnósticos y pronósticos

La invención proporciona un diagnóstico y un pronóstico mejorados de prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. El riesgo de desarrollar pre diabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes puede evaluarse midiendo uno o más de los biomarcadores descritos en la presente memoria y comparando los valores medidos con los valores de referencia o índice. Dicha comparación se puede realizar con algoritmos o fórmulas matemáticas para combinar información de resultados de múltiples biomarcadores individuales y otros parámetros en una única medida o índice. Los pacientes identificados con un mayor riesgo de prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes pueden opcionalmente ser seleccionados para recibir regímenes de tratamiento, tal como la administración de compuestos profilácticos o terapéuticos o la aplicación de regímenes de ejercicios o complementos dietéticos para evitar, tratar o retardar el comienzo de la prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes.

La cantidad del biomarcador puede medirse en una muestra de prueba y compararse con un nivel de referencia o normal, utilizando técnicas tales como límites de referencia, límites de discriminación o umbrales de definición de riesgo para definir límites y valores anormales para prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. El nivel de referencia normal es el nivel de uno o más biomarcadores o índices de biomarcadores combinados que se encuentran generalmente en un paciente que no padece prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Los niveles normales y anormales y los límites pueden variar basándose en si un biomarcador se usa solo o en una fórmula combinándose con otros biomarcadores en un índice. Alternativamente, el nivel normal o anormal puede ser una base de datos de patrones de biomarcadores o "característicos" de paciente examinados anteriormente que desarrollan o no o se convierten en prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes durante un horizonte de tiempo clínicamente relevante.

La presente invención se puede usar para realizar mediciones continuas o categóricas del riesgo de desarrollar o convertirse en prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes, diagnosticando y definiendo de este modo el espectro de riesgo de una clase de pacientes con un estado clínico definido. En el escenario de clases, los métodos de la presente invención se pueden usar para discriminar entre cohortes normales y cohortes con prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. En otras realizaciones, la presente invención se puede usar para discriminar prediabetes de diabetes, diabetes de diabetes normal y diferentes afecciones relacionadas con la diabetes o diferentes enfermedades de diabetes de la normal. Dicho uso diferente puede requerir diferentes combinaciones de biomarcadores en cada uno de los paneles, algoritmos matemáticos y/o límites, pero sometidas a las mismas mediciones anteriormente mencionadas de precisión para el uso pretendido.

La identificación de un paciente antes de que desarrolle prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes permite seleccionar e iniciar diversas intervenciones terapéuticas o regímenes de tratamiento con el fin de retrasar, reducir o evitar la conversión del paciente a un estado patológico. El seguimiento de los niveles de al menos un biomarcador también permite controlar el curso del tratamiento prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Por ejemplo, se puede proporcionar una muestra de un paciente sometido a regímenes de tratamiento o intervenciones terapéuticas, p. ej., tratamientos farmacológicos, para prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Dichos regímenes de tratamiento o intervenciones terapéuticas pueden incluir regímenes de ejercicio, modificación de la dieta, suplementos dietéticos, intervención quirúrgica bariátrica, administración de productos farmacéuticos, y tratamiento con productos terapéuticos o profilácticos utilizados en pacientes diagnosticados o identificados con prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Se pueden obtener muestras del paciente en varios momentos antes, durante o después del tratamiento.

La presente invención también se puede utilizar para identificar poblaciones en una variedad de escenarios. Puede investigarse para grupos de pacientes: para identificar a los que requieren intervenciones; para la recopilación de datos epidemiológicos; para evaluarlos con fines de seguro sanitario. Los datos obtenidos a través de filtros de población serán especialmente valiosos cuando se correlacionen con medidas clínicas de prediabetes, diabetes o

una afección relacionada con la diabetes y puedan almacenarse en matrices de datos u otras colecciones en medios legibles por ordenador para uso conveniente de los proveedores de servicios sanitarios y el sector sanitario aliado para mejorar la prestación de servicios y la eficiencia y, por lo tanto, mejorar los resultados de los pacientes.

5 Un medio de almacenamiento legible por ordenador incluye cualquier material para almacenamiento de datos codificado con datos legibles por ordenador o matrices de datos que, cuando se usa un ordenador programado con instrucciones para usar dichos datos, es capaz de usarse para una variedad de propósitos, tales como, sin limitación, proporcionar o generar información del paciente relacionada con factores de riesgo de la prediabetes, la diabetes o una afección relacionada con la diabetes a lo largo del tiempo o en respuesta a intervenciones o tratamientos y descubrimiento de fármacos. La evaluación o medición de los biomarcadores de la invención y/o el correspondiente riesgo determinado a partir de ellos pueden realizarse en programas informáticos que se ejecutan en ordenadores programables, que comprenden, entre otros, un procesador, un sistema de almacenamiento de datos (incluidos la memoria volátil y no volátil y/o elementos de almacenamiento), al menos un dispositivo de entrada, y al menos un dispositivo de salida. El código de programa o programa informático se puede aplicar a datos de entrada para realizar las funciones requeridas para generar la salida requerida.

15 El código del programa o programa informático puede realizar una o más de las funciones en relación con los datos relativos a los biomarcadores, incluidas: determinar los niveles normales o anormales de un biomarcador y comparar un nivel de un biomarcador con un valor de referencia, p. ej., un paciente o población de referencia cuya prediabetes, diabetes o un estado patológico relacionado con la diabetes es conocido o un valor índice o valor de referencia. La muestra de referencia o el valor índice o valor de referencia se puede tomar o proceder de uno o más pacientes que han estado expuestos a un tratamiento, o pueden tomarse o proceder de uno o más pacientes que están en situación de bajo riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes, o puede tomarse o proceder de pacientes que han presentado mejoras en uno o más factores de riesgo relacionados con la prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes (incluidos los parámetros clínicos admitidos) como resultado de la exposición a un tratamiento. La muestra de referencia o el valor índice o valor de referencia también pueden tomarse o proceder de uno o más pacientes que no han estado expuestos al tratamiento. Por ejemplo, se pueden tomar muestras de pacientes que hayan recibido tratamiento inicial para prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes y tratamiento posterior para prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes para controlar la evolución del tratamiento. Un valor de referencia también puede comprender un valor procedente de un algoritmo de predicción de riesgo o índices calculados a partir de estudios de población. La muestra de referencia o el valor de índice o valor de referencia también pueden tomarse o derivarse de uno o más pacientes que no han estado expuestos al tratamiento. Por ejemplo, se pueden tomar muestras de pacientes que hayan recibido tratamiento inicial para prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes y tratamiento posterior para la enfermedad previa a la diabetes, diabetes o relacionada con la diabetes para monitorear el progreso del tratamiento. Un valor de referencia también puede comprender un valor derivado de un algoritmo de predicción de riesgo o índices calculados a partir de estudios de población.

Los biomarcadores de la presente invención se pueden usar para generar un perfil de biomarcador o característico de los pacientes: (i) que no tienen y no cabe esperar que desarrollen prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes y/o (ii) que tienen o cabe esperar que desarrollen pre diabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Las características de biomarcador de un paciente se puede comparar con unas características de biomarcador predeterminado o de referencia para diagnosticar o identificar pacientes en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes, para controlar la evolución de la enfermedad, así como la tasa de evolución de la enfermedad y para controlar la efectividad de los tratamientos de prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Las características de los biomarcadores de la presente invención están preferiblemente contenidas en un medio legible por ordenador y están "vivas" en la medida en que se pueden actualizar con datos adicionales que están disponibles, mejorando así la resistencia y la importancia clínica de los biomarcadores. Los datos relativos a los biomarcadores de la presente invención también pueden combinarse o correlacionarse con otros datos o resultados de pruebas, tales como, sin limitación, mediciones de parámetros clínicos u otros algoritmos para prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Otros datos incluyen la edad, origen étnico, índice de masa corporal (IMC), concentraciones de colesterol total, glucemia, presión arterial, concentraciones de LDL y HDL. Los medios legibles por ordenador también pueden comprender información del paciente tal como anamnesis y cualesquier antecedentes familiares relevantes.

La presente invención también proporciona métodos para identificar agentes para el tratamiento de prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes que son apropiados o de otro modo personalizados para un paciente específico. A este respecto, se puede tomar una muestra de prueba de un paciente, expuesto a un agente terapéutico o a un fármaco, y se puede determinar el nivel de uno o más biomarcadores. El nivel de uno o más biomarcadores puede compararse con una muestra procedente del paciente antes y después del tratamiento, o puede compararse con muestras procedentes de uno o más pacientes que han presentado mejoras en los factores de riesgo como resultado de dicho tratamiento o exposición.

#### Pruebas

60 Los biomarcadores y sus paneles de la presente invención se pueden introducir en una gama de sistemas de prueba. Normalmente, los sistemas de prueba incluyen un medio para obtener resultados de una muestra, un medio para recopilar, almacenar, procesar y/o rastrear resultados de pruebas para la muestra, generalmente en una base

de datos y un medio para comunicar los resultados de las pruebas. Los medios para obtener resultados de pruebas pueden incluir un módulo adaptado para pruebas automáticas que utiliza uno o más ensayos de detección, bioquímicos, inmunológicos y de ácidos nucleicos. Algunos sistemas de prueba pueden procesar múltiples muestras y pueden ejecutar múltiples pruebas en una muestra dada. Los medios para recopilar, almacenar, procesar y/o rastrear los resultados de las pruebas pueden comprender un dispositivo de almacenamiento de datos físico y/o electrónico tal como un disco duro o memoria flash o impresiones en papel. Los medios para comunicar los resultados de las pruebas pueden incluir una pantalla visible, un enlace a una estructura de datos o base de datos, o una impresora. A este respecto, los medios de notificación pueden ser simplemente un enlace de datos que está adaptado para enviar resultados a otro dispositivo tal como una base de datos, pantalla visual o impresora.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona un sistema de prueba adaptado para ayudar en la identificación de individuos en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes o diagnosticar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes, el sistema de prueba que comprende un medio que usa datos relacionados con al menos uno de los biomarcadores descritos en la presente memoria. Normalmente, los resultados procedentes del sistema de la presente invención sirven como entradas a un ordenador o microprocesador programado con un código máquina o programa informático que toma los datos relacionados con al menos uno de los biomarcadores descritos en la presente memoria y determina el riesgo de desarrollar o tener ya prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes.

#### Selección de biomarcadores

20 Los biomarcadores de la tabla 1 se han identificado al haberse encontrado que han alterado o modificado los niveles de presencia o concentración en pacientes que tienen diabetes y/o la nefropatía diabética. Por lo tanto, los biomarcadores y métodos de la presente invención permiten a un experto en la técnica identificar, diagnosticar o sino evaluar a pacientes que no presentan ningún síntoma de prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes, pero que, no obstante, pueden tener o estar en situación de riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes.

25 Uno o más de los biomarcadores en la tabla 1 o 2 se pueden seleccionar para formar un panel de marcadores. Por ejemplo, una realización de la invención es un método para evaluar el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes, que comprende la etapa de medir los niveles de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 biomarcadores de la tabla 1 o 2. Preferiblemente, el panel incluye al menos uno de los siguientes: Peroxirredoxina-2 (P32119), Proteína AMBP (P02760); Apolipoproteína A-IV (P06727) y Subunidad B subcomponente del complemento C1q (P02746); al menos uno de Adiponectina (Q15848), proteína 2 relacionada con el factor de complemento H (P36980), subunidad de hemoglobina beta (P68871), Apolipoproteína B-100 (P04114) y sulfhidril-oxidasa 1 (O00391) o; al menos uno de Apolipoprotein C-III (P02656), proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulinoide (P17936), antígeno CD5 (O43866) y cadena beta del componente C8 de complemento (P07358).

#### 35 Algoritmos clínicos

Los resultados obtenidos usando los biomarcadores de la presente invención se pueden combinar en índices útiles en la práctica de la invención usando una o más fórmulas. Como se indicó anteriormente, y sin limitación, dichos índices pueden indicar, entre otras diversas indicaciones, la probabilidad, la posibilidad, el riesgo absoluto o relativo, el tiempo para de uno a otros estados de la enfermedad o la tasa de conversión de los mismos, o hacer predicciones de futuras mediciones de biomarcadores de prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Esto puede ser durante un período u horizonte temporal específico, o para el riesgo de vida restante, o simplemente proporcionarse como un índice relativo a otra población de pacientes de referencia.

45 Las fórmulas preferidas incluyen la amplia clase de algoritmos de clasificación estadística tales como característica de operación relativa (ROC), el uso de análisis discriminante p. ej. análisis discriminante lineal (ADL). Las características se pueden identificar para ADL empleando un método basado en eigengen con diferentes umbrales (ELDA) o un algoritmo por etapas basado en un análisis multifactorial de la variancia (MANOVA). Se pueden realizar algoritmos directos, inversos y paso a paso que minimicen la probabilidad de no separación en base a la estadística de Hotelling-Lawley. Otras fórmulas incluyen una máquina de vectores soporte (SVM), un bosque aleatorio o una partición recursiva también se puede usar por separado o en combinación para identificar las combinaciones de biomarcadores que son más importantes.

Puede usarse otra fórmula con el fin de tratar previamente los resultados de las mediciones de cada biomarcador en formas más valiosas de información, antes del tratamiento posterior. El tratamiento previo incluye transformaciones de raíz inversa y cuadrada, normalización de resultados de biomarcadores, utilizando transformaciones matemáticas tales como funciones logarítmicas o logísticas. Se prefieren especialmente las normalizaciones basadas en parámetros clínicos como la edad, el género, la raza, el IMC o el sexo.

55 En la práctica de la invención pueden usarse uno o más parámetros clínicos en combinación con los biomarcadores de la presente invención como una entrada a una fórmula o como criterios de preselección que definen una población relevante a medir usando un panel de biomarcadores en particular y fórmula. Los parámetros clínicos también pueden ser útiles en la normalización y pretratamiento de biomarcadores, o en la selección de

biomarcadores, la construcción de paneles, la selección y derivación del tipo de fórmula y el postratamiento del resultado de la fórmula.

5 Los paneles de biomarcadores de la presente invención se pueden adaptar a la población y al criterio de valoración o al uso que se pretende. Por ejemplo, los paneles de biomarcadores y fórmulas pueden usarse para la evaluación de pacientes para prevención primaria y diagnóstico y para prevención secundaria y tratamiento. Para la evaluación primaria, los paneles y las fórmulas se pueden utilizar para la predicción y la estratificación del riesgo para las enfermedades, para el diagnóstico de las enfermedades diabéticas, para el pronóstico de la concentración de glucosa y la tasa de cambio y para la indicación de un diagnóstico futuro. Para la prevención secundaria y el tratamiento, los paneles y las fórmulas se pueden usar para el pronóstico y la estratificación del riesgo para las complicaciones de la diabetes. Los paneles y las fórmulas se pueden usar para apoyo en la toma de decisiones clínicas, tal como determinar si se pospone la intervención a la siguiente visita, recomendar chequeos preventivos normales, recomendar una mayor frecuencia de visitas, recomendar un aumento de las pruebas y recomendar una intervención terapéutica. Los paneles y las fórmulas también pueden ser útiles para la intervención en pacientes con enfermedades diabéticas, tales como selección y respuesta terapéutica, ajuste y dosis de tratamiento, control de la eficacia terapéutica en curso e indicación de cambio en la intervención terapéutica.

10 Los criterios de valoración de la enfermedad de la invención incluyen prediabetes, la diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Los paneles y fórmulas en la presente memoria pueden usarse para evaluar el estado actual de los criterios de valoración de la enfermedad ayudando en el diagnóstico y/o determinación de la gravedad de la prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes y/o determinación de la subclase de la enfermedad o afección. Los paneles y las fórmulas en la presente memoria también son útiles para determinar el estado futuro de la intervención, como la determinación del pronóstico de una futura prediabetes, diabetes o afección relacionada con la diabetes con terapia, intervención y tratamiento farmacológico. La invención se puede adaptar a una intervención específica, clase de fármaco, clase terapéutica o tratamiento farmacológico o una combinación de los mismos.

25 Los criterios de valoración alternativos de la invención incluyen la medición de HbA1c, glucosa (17PG y OGTT), y la clase de glucosa (tolerancia normal a la glucosa (NGT), IGT, IFG y T2DM). Los paneles y las fórmulas en la presente memoria son útiles para determinar el estado actual de los criterios de valoración alternativos mediante el diagnóstico de la clase de glucosa con o sin ayuno. El estado futuro de los criterios de valoración alternativos puede determinarse usando los paneles de biomarcadores en la presente memoria, tales como la determinación del pronóstico de la futura clase de glucosa. Los paneles de biomarcadores y fórmulas también son útiles para determinar el estado futuro de la intervención, tal como la determinación del pronóstico de la futura clase de glucosa con la tratamiento farmacológico.

30 Los criterios de valoración de la complicación de las afecciones diabéticas incluyen las afecciones relacionadas con la diabetes en la presente memoria tales como nefropatía, retinopatía ocular, lesión microvascular, lesión hepática, amputación de extremidades y complicaciones cardiovasculares. Los paneles de biomarcadores y fórmulas se pueden usar para evaluar el estado actual de los criterios de valoración de la enfermedad ayudando en el diagnóstico de la prediabetes, diabetes o afección relacionada con la diabetes. El estado futuro de los criterios de valoración de la complicación se puede determinar usando los paneles de biomarcadores y fórmulas tales como la determinación del pronóstico de una futura pre diabetes, diabetes o afección relacionada con la diabetes con tratamiento.

35 Agentes para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes

40 Los biomarcadores de la presente invención también se pueden utilizar para identificar y evaluar agentes para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes o una afección relacionada con la diabetes. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para identificar o evaluar un agente para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes, y/o una afección relacionada con la diabetes que comprende:

- 45 (i) poner en contacto células que expresan al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 con un supuesto agente; y  
 (ii) comparar la expresión o la concentración de al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 en las células antes del contacto con el supuesto agente para la expresión de al menos un biomarcador de la tabla 1 o 2 en las células después del contacto con el supuesto agente;

50 en donde un cambio en la expresión o nivel identifica al agente como un agente para tratar la prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

55 Las células pueden ponerse en contacto con el supuesto agente *in vivo*, tal como en un modelo animal o *in vitro*, tal como en un cultivo o estirpe celular. La expresión o concentración puede compararse usando un programa informático o *software*.

La presente invención también proporciona un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente adaptado para cambiar la expresión o nivel de al menos un biomarcador en la tabla 1 o 2 para el paciente.

El agente puede administrarse según uno cualquiera de los métodos conocidos como seleccionados por un médico cualificado. Los agentes pueden administrarse como parte de una composición que comprende una cantidad eficaz del agente mezclado con un agente farmacéuticamente aceptable tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. El material portador puede ser agua para inyectables, preferiblemente enriquecida con otros materiales habituales en soluciones para administración a mamíferos. Los agentes farmacéuticamente aceptables normales tales como vehículos, diluyentes y excipientes pueden incluirse según se desee. Otros ejemplos de composiciones comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado correspondiente.

La formulación óptima del agente la determinará un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración, el formato de administración y la dosis deseada. Véase, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 1435-1712 (18ª edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990 ). Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo*.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona el uso de un agente adaptado para cambiar la expresión o el nivel de al menos un biomarcador en la tabla 1 o 2 para la preparación de un medicamento para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes.

Preferiblemente, el agente adaptado para cambiar la expresión o la concentración de al menos un biomarcador en la tabla 1 o 2 es un agente para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes como se define en la presente memoria. Otros agentes para tratar o reducir el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes y/o una afección relacionada con la diabetes incluyen, inhibidores de lipasa como Cetilistat; análogos sintéticos de Amilina tales como Symlin pramlintida con o sin leptina biotecnológica; inhibidores del cotransportador 2 de sodio-glucosa como Sergliflozina, YM543, Dapagliflozina, triglicérido lipasa adiposo doble y activadores de PI3 cinasa como Adyvia; antagonistas de los receptores de neuropéptido Y2, Y4 e Y5, análogo sintético de las hormonas humanas PYY3-36 y polipéptido pancreático; Antagonistas del receptor del canabinoide CB1 tales como Rimonabant, Taranabant, CP-945.598, hormonas como oleoil-estrona; inhibidores de serotonina, dopamina y norepinefrina (también conocidos en la técnica como "inhibidores triples de reabsorción de monoaminas") como la Tesofensina; inhibidores de la reabsorción de norepinefrina y dopamina, como Contrave (Bupropion más antagonista opioide Naltrexona) y Excalia (Bupropión más anticonvulsivante Zonisaminde); inhibidores de la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1); inhibidores de la síntesis de cortisol tales como Cetoconazol; inhibidores de gluconeogenia; activadores de glucoquinasa; inhibidores complementarios de la proteína tirosina fosfatasa-1B; así como otros agentes como inyecciones de análogos de gastrina y del factor de crecimiento epidérmico (EGF) tales como Islet Neogenesis Therapy (E1-INT); y Betahistina.

#### Medición de biomarcadores

Los biomarcadores pueden medirse usando una o más de una gama de técnicas. Preferiblemente, los biomarcadores se miden de una manera que minimiza la variabilidad del paciente. Por ejemplo, pueden medirse en ayunas y, por lo general, por la mañana, proporcionando un nivel reducido de variabilidad del paciente debido tanto al consumo de alimentos como al metabolismo y la variación diurna. Se puede usar cualquier procedimiento de muestreo en ayunas o temporal en la presente invención.

La medición real de las concentraciones de los biomarcadores en la presente invención se puede determinar con respecto a proteínas o ácidos nucleicos usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, con respecto al ácido nucleico, pueden usarse análisis de hibridación Northern y Southern, así como ensayos de protección de ribonucleasa que usan sondas que reconocen específicamente una o más de estas secuencias para determinar la expresión génica. Pueden medirse también concentraciones de biomarcadores usando ensayos de PCR basados en transcripción inversa (RT-PCR), p. ej., usando cebadores específicos para la secuencia de genes expresada diferencialmente. Preferiblemente, las concentraciones de biomarcadores se determinan con respecto a proteínas, p. ej., midiendo las concentraciones de péptidos codificados por los productos génicos descritos en la presente memoria, o sus actividades. Dichos métodos incluyen, p. ej., inmunoanálisis basados en anticuerpo contra proteínas codificadas por los genes, aptámeros o impresiones moleculares.

Los biomarcadores de la tabla 1 o 2, polipéptidos, péptidos, mutaciones y polimorfismos de los mismos se pueden detectar de cualquier forma adecuada, pero se detectan normalmente poniendo en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo que se une a la proteína del biomarcador, polipéptido, mutación, o polimorfismo y luego detectar la presencia o ausencia de un producto de reacción. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales, híbridos o un fragmento de los anteriores, y la etapa de detección del producto de reacción puede llevarse a cabo con cualquier inmunoanálisis adecuado.

Los inmunoanálisis llevados a cabo según la presente invención pueden ser análisis homogéneos o análisis heterogéneos. En un análisis homogéneo, la reacción inmunológica generalmente implica el anticuerpo específico para el biomarcador, un analito marcado y la muestra de interés. La señal que surge del marcador se modifica, directa o indirectamente, tras la unión del anticuerpo al analito marcado. Tanto la reacción inmunológica como la detección del alcance de la misma se pueden llevar a cabo en una solución homogénea.

Los marcadores inmunoquímicos que se pueden emplear incluyen radicales libres, radioisótopos, colorantes fluorescentes, enzimas, bacteriófagos o coenzimas.

En un método analítico heterogéneo, los reactivos son generalmente la muestra, el anticuerpo y los medios para producir una señal detectable. Se pueden usar muestras como se describe anteriormente. El anticuerpo se puede inmovilizar sobre un soporte, tal como una perla (tal como perlas de proteína A y proteína G agarosa), placa o portaobjetos, y ponerse en contacto con la muestra sospechosa de contener el antígeno en fase líquida. El soporte se separa a continuación de la fase líquida y se examina en la fase de soporte o en la fase líquida una señal detectable empleando medios para producir tal señal. La señal está relacionada con la presencia del analito en la muestra. Los medios para producir una señal detectable incluyen el uso de marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes o marcadores enzimáticos. Por ejemplo, si el antígeno que ha de detectarse contiene un segundo punto de unión, un anticuerpo que se une a ese punto puede conjugarse con un grupo detectable y añadirse a la solución de reacción en fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable en el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra analítica. Los ejemplos de inmunoanálisis adecuados incluyen oligonucleótidos, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, métodos de inmunofluorescencia, métodos de quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia (ECL) o inmunoanálisis ligados a enzimas.

Usando la información de secuencias proporcionada por las entradas de la base de datos para los biomarcadores en la tabla 1, la expresión de las secuencias de biomarcadores puede detectarse (si está presente) y medirse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica tales como análisis de hibridación de transferencia Northern o métodos que especifica, y, preferiblemente, amplifican cuantitativamente secuencias de ácido nucleico específicas. Como otro ejemplo, las secuencias pueden emplearse para construir cebadores para amplificar específicamente las secuencias de biomarcadores en, p. ej., métodos de detección basados en amplificación tales como reacción en cadena de la polimerasa basada en transcripción inversa (RT-PCR). Cuando las alteraciones en la expresión génica están relacionadas con amplificación génica, reducción, polimorfismos y mutaciones, pueden hacerse comparaciones de secuencias en la prueba y poblaciones de referencia comparando las cantidades relativas de las secuencias de ADN y ARN examinadas en la prueba y poblaciones de células de referencia.

La proteína biomarcador y/o los metabolitos de ácido nucleico también se pueden determinar usando una variedad o más de formas conocidas por un experto en la técnica, incluidas la espectroscopia de índice de refracción (IR), la espectroscopia ultravioleta (UV), análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopia de infrarrojo próximo (IR próximo), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de dispersión de luz (DL), espectrometría de masas incluidas la espectrometría de masas de seguimiento de reacción múltiple (MRM), espectrometría de masas de pirólisis, nefelometría, espectroscopia Raman dispersiva, cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas, cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas, desorción-ionización mediante láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF) combinada con espectrometría de masas, espectroscopia de pulverización iónica combinada con espectrometría de masas, electroforesis capilar, RMN y detección de IR.

Cuando los biomarcadores se miden usando espectrometría de masas, se pueden medir con un péptido seleccionado de la lista siguiente:

- (i) un péptido de 5-25 aminoácidos de una proteína de la tabla 1 o 2;
- (ii) un péptido de 5-20 aminoácidos de una proteína de la tabla 1 o 2;
- (iii) un péptido de 10-20 aminoácidos de una proteína de la tabla 1 o 2;
- (iv) un péptido de 10-15 aminoácidos de una proteína de la tabla 1 o 2; o
- (v) un péptido en la tabla 3.

#### Equipos

La invención también incluye un reactivo de detección de biomarcadores, p. ej., un anticuerpo específico para una proteína biomarcador en la tabla 1 o 2 o un péptido en la tabla 3 o un ácido nucleico que identifica o se une específicamente a uno o más ácidos nucleicos que codifican una proteína biomarcador en la tabla 1 o 2 o un péptido en la tabla 3 al tener secuencias de ácido nucleico homólogas, tales como secuencias de oligonucleótidos o aptámeros, complementarias a un fragmento de ácido nucleico envasados juntos en forma de un equipo. El equipo puede contener en recipientes separados un ácido nucleico o anticuerpo (bien ya unido a una matriz sólida o envasado por separado con reactivos para unirlos a la matriz), formulaciones de referencia (positivas y/o negativas), y/o un marcador detectable tal como fluoresceína, proteína fluorescente verde, rodamina, colorantes de cianina, colorantes Alexa, luciferasa, radiomarcadores, entre otros. Las instrucciones para llevar a cabo el ensayo también se pueden incluir en el equipo. El ensayo puede, por ejemplo, estar en forma de hibridación Northern, ELISA tipo sándwich o matriz de anticuerpos proteicos.

Los reactivos para detectar biomarcadores de la presente invención se pueden inmovilizar en una matriz sólida tal como una tira porosa para formar al menos un punto de detección de biomarcador. La región de medición o detección de la tira porosa puede incluir un gran número de puntos que contienen un anticuerpo o ácido nucleico. Una tira de prueba también puede contener puntos para controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los puntos de control pueden estar situados en una tira separada de la tira de prueba. Opcionalmente, los diferentes puntos de detección pueden contener diferentes cantidades de anticuerpos o ácidos nucleicos inmovilizados, p. ej.,

una cantidad mayor en el primer punto de detección y cantidades menores en puntos posteriores. Tras la adición de la muestra de prueba, el número de puntos que presentan una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad de biomarcador presente en la muestra. Los puntos de detección pueden configurarse en cualquier forma detectable adecuadamente y normalmente tienen la forma de una barra o punto que abarca el ancho de una tira de prueba.

Alternativamente, el equipo contiene una matriz de sustrato de ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos en la matriz identifican específicamente una o más secuencias de ácido nucleico adaptadas para unirse a una secuencia de ácido nucleico que codifica un biomarcador en la tabla 1 o 2. La matriz de sustrato puede estar, por ejemplo, en un sustrato sólido o "chip". Alternativamente, la matriz de sustrato puede ser una matriz de solución.

**Ejemplos**

Ejemplo 1 - Identificación y validación de biomarcadores de diabetes

1. Materiales/Métodos

A. Descripción de la cohorte

A.1. Estudio de diabetes de Fremantle (Fase 1)

Fundamento: La cohorte FDS1 comprendía 1.294 pacientes que tenían diabetes tipo 2. Los pacientes diabéticos con y sin nefropatía diabética se seleccionaron para dar presentaciones fenotípicas notablemente diferentes, permitiendo la mayor diferencia en la expresión de proteínas.

La fase I del estudio de diabetes de Fremantle (FDS) fue un estudio de observación longitudinal de atención, el control, las complicaciones y el coste de la diabetes en pacientes de una comunidad urbana estable definida por código postal de 120.097 personas. Cuando la fase I se concibió en 1991, había pocos datos publicados sobre la historia natural de la diabetes.

Grupos de estudio:	Diabéticos tipo 2 adultos, anglo-celtas
Grupo 1:	Normoalbuminuria (ACR: 0,57-1,53 mg/mmol)
Grupo 2:	Macroalbuminuria (ACR: 49,0-300,0 mg/mmol)
Edades:	33-84 años
Número de pacientes:	20 por grupo; 40 en total
Intervalo de selección:	1.294
Protocolo:	Tubo de EDTA, centrifugado en 4 horas, separado y almacenado a -80°C.
Muestras:	Plasma, orina

A.2. Estudio de diabetes de Fremantle (Fase 2)

Fundamento: La cohorte FDS2 alistó diabéticos recomendados por médicos en la localidad de Fremantle y los de la base de datos de la cohorte FDS1. Los pacientes diabéticos con y sin nefropatía diabética se seleccionaron para dar presentaciones fenotípicas notablemente diferentes que permitieran la mayor diferencia en la expresión de proteínas.

La fase II se concibió en 2007 para la recopilación mejorada y ampliada de datos con el fin de caracterizar la naturaleza de la diabetes en la Australia urbana contemporánea.

Grupos de estudio:	Todos los diabéticos tipo 2 adultos, indiferenciados por raza
Grupo 1:	Normoalbuminuria (ACR; 0,3-2,3 mg/mmol)
Grupo 2:	Macroalbuminuria (ACR 34,1- 405,0 mg/mmol)
Grupo 3:	Microalbuminuria (ACR 3,5 – 18,3 mg/mmol)
Edades:	44-85 años
Consentimiento para genética:	sangre recolectada y almacenada
Número de pacientes:	20 por grupo; 60 en total
Intervalo de selección:	2.000
Alistado de:	Estudio de diabetes de Fremantle Fase 13 (680) + nuevos alistados en el área de Fremantle

Protocolo:	Protocolo habitual de Proteomics Internacional
Muestras:	Plasma, suero, sangre y orina

A.3. Estudio de diabetes de Busselton

5 Fundamento: Ampliar la información sobre pacientes diabéticos de una comunidad rural. Información complementaria obtenida de los estudios urbanos FDS1 y FDS2. Incluye pacientes de referencia equiparados no diabéticos.

10 El Busselton Health Study es uno de los programas de investigación epidemiológica más antiguos del mundo. Los residentes de la ciudad de Busselton, comunidad costera en el suroeste de Australia Occidental, han participado en una serie de encuestas sanitarias desde 1966. Hasta la fecha, más de 16.000 hombres, mujeres y niños de todas las edades han participado en las encuestas. y han ayudado a contribuir a la comprensión de muchas enfermedades comunes y afecciones sanitarias.

Grupos de estudio:	Todos los adultos con y sin diabetes, indiferenciados por raza, no coincidentes en edad
Grupo 1:	Diabético con la peor albuminuria (ACR 17,5-408 mg/mmol)
Grupo 2:	Diabético con normoalbuminuria (ACR 0,4–2,6 mg/mmol)
Grupo 3:	Controles con normoalbuminuria (ACR 0,2-1,7 mg/mmol)
Edades:	41-94 años
Consentimiento para genética:	sangre recogida y almacenada
Número de pacientes:	20 por grupo; 60 en total
Intervalo de selección:	250 de 329 adultos con diabetes, 250 controles de 2595 no diabéticos
Alistado de:	Encuesta de salud de Busselton
Protocolo:	Protocolo habitual de Proteomics Internacional
Muestras:	Plasma, suero, sangre y orina

B. Descubrimiento de biomarcadores de proteínas usando iTRAQ y 2D LC MALDI TOF/TOF

15 Esta metodología de descubrimiento implica marcar químicamente el plasma de diferentes grupos de pacientes (p. ej. nefropatía diabética frente a diabético sin nefropatía) y determinar por espectrometría de masas la relación relativa de la presencia de una proteína determinada. Las proteínas con concentraciones significativamente alteradas después del análisis indican un cambio en la bioquímica de un grupo de pacientes frente a otro. Esta técnica se usó para medir las concentraciones relativas de 130-200 proteínas por muestra. Se identificaron proteínas de una concentración significativamente diferente entre grupos, y éstas se seleccionaron para un examen posterior mediante la metodología MRM (apartado C más adelante).

20 B.1. Preparación de la muestra

25 Se agruparon muestras de plasma (N = 10 o 20) antes de la inmunorreducción de las 14 proteínas más abundantes utilizando una columna de HPLC MARS 14 (Agilent Technologies). Se intercambiaron por tampón a muestras inmunoreducidas usando filtros centrífugos de umbral 10 kDa (Sartorius) en bicarbonato de trietilamonio 1M. Las muestras de proteínas se redujeron, se alquilaron, se digirieron con tripsina y se marcaron según el protocolo iTRAQ (Applied Biosystems).

B.2. Análisis instrumental

30 Los péptidos se desalaron en una columna de fase inversa polimérica 33 µM Strata-X de (Phenomenex) antes de la separación por cromatografía líquida de intercambio catiónico fuerte (SCX) en un Agilent 1100 HPLC usando una columna de polisulfoetil (4,6 x 100 mm, 5µm, 300 Å). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de KCl 0-400 mM. Las fracciones SCX se desalaron y cargaron en un sistema Ultimate 3000 nano HPLC (Dionex C18, PepMap 100, 3 µm) y se separaron con un gradiente de acetonitrilo al 10-40% (ácido fórmico al 0,1%) con observación usando un observador robótico ProBot (LC Packings). Las manchas resultantes se analizaron en un analizador 4800 MALDI TOF/TOF.

B.3. Análisis de los datos

El análisis de datos se realizó usando el programa informático ProteinPilot™ 2.0.1 (Applied Biosystems). Los índices de descubrimiento falso se calcularon utilizando el algoritmo PSPEP que funciona junto con ProteinPilot™ 2.0.1 y solo se aceptaron proteínas con un índice de descubrimiento falso (FDR) global de ajuste <5%.

#### C. Validación de candidatos a biomarcadores usando el seguimiento de reacciones múltiples (MRM)

- 5 El seguimiento de reacciones múltiples (MRM) es un método basado en la espectrometría de masas para dirigir específicamente transiciones (pares de iones precursores-fragmento) para un péptido característico, que representa un sustituto para la proteína entera del candidato biomarcador. Para cada candidato, se usaron uno o dos péptidos únicos para esa proteína (en comparación con SwissProt Human Database véase 57.1). Este método de alto rendimiento se utilizó para validar biomarcadores de la fase de descubrimiento (véase el apartado B anterior) en un mayor número de muestras individuales de plasma de pacientes.

##### C.1. Preparación de la muestra

- 15 Se prepararon muestras agrupadas idénticas a experimentos iTRAQ anteriores, así como muestras individuales (N = 10 por grupo) diferentes de los grupos iTRAQ anteriores (muestras de validación). Las muestras se inmunorredujeron de las 14 proteínas más abundantes utilizando una columna de HPLC MARS 14. Las muestras inmunorreducidas se intercambiaron por tampón usando filtros centrifugos de umbral 10 kDa. Las muestras de proteína se redujeron, se alquilaron, se digirieron con tripsina y se desalaron. Además, una muestra de referencia de plasma (grupo de individuos sanos) se marcó con <sup>18</sup>O y por último, se intensificó en cada muestra de cohorte (1:1) antes del análisis LC-MRM/MS.

##### C.2. Traducir listas de biomarcadores en listas de transición de MRM

- 20 Se generaron listas de transición MRM preliminares mediante una serie de etapas que incluían la descarga de secuencias de proteínas, la digestión de proteínas mediante simulación por ordenador junto con un filtro (p. ej. 7-21 aminoácidos, 0 escisiones perdidas) y la selección de un mínimo de 4 transiciones por péptido (por lo general, carga de precursor z2, carga del producto z1). También se incorporó información útil sobre péptidos proteotípicos de la bibliografía y registros (PeptideAtlas, MRMAid) y la selección de transiciones fue respaldada por bibliotecas espectrales (ISB, NIST, GPM, BiblioSpec). Se utilizó un programa informático de código abierto denominado Skyline (laboratorio MacCoss, Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. UU.) para generar y ajustar las transiciones MRM, así como para analizar los datos de transición MRM.

- 30 Una alícuota de 1 µg de producto de digestión de plasma se cargó directamente en una nanocolumna (Dionex C18, PepMap 100, 3 µm) y los péptidos se eluyeron con un gradiente de 100 min de acetonitrilo al 2-30% (ácido fórmico al 0,1%) en un 4000 QTrap equipado con una fuente de ionización de nanoelectropulverización. Se adquirieron un máximo de 200 MRM por serie con un tiempo de permanencia de 20 ms y un ciclo de 5 s. Se analizaron las series (es decir, se eliminaron los péptidos sin transiciones razonables) y una lista ajustada de péptidos y transiciones se sometió a un experimento de MS/MS desencadenado por MRM para validar la asignación de péptidos. Dado que la asignación de péptidos para proteínas poco abundantes es una tarea bastante desafiante sin patrones, las configuraciones de exploración del ion del producto (EPI) variaron, p. ej. velocidad de barrido (1.000-4.000), tiempo de llenado LIT (20-300 ms). Las dos transiciones más intensas por péptido se seleccionaron para la validación y se enviaron para MS/MS (intervalo de masa 200-1.200) cuando una transición excedía un umbral de 1.000 cps. En total, se usaron 40 MRM por serie con un tiempo de permanencia de 20 ms y un ciclo de ~ 7 s. Los datos de MS/MS adquiridos se buscaron frente a una base de datos SwissProt actual con filtro de taxonomía humana utilizando MASCOT. Los péptidos identificados se compararon con los datos de MRM (secuencia de péptido, tiempo de retención). Finalmente, los péptidos validados fueron probados para su idoneidad para ser utilizados con MRM. Los datos de MS/MS adquiridos se buscaron en una base de datos SwissProt actual con filtro de taxonomía humana utilizando MASCOT. Los péptidos identificados se emparejaron con los datos de MRM (secuencia de péptido, tiempo de retención). Por último, se probó la idoneidad de los péptidos validados para ser utilizados con el método de marcaje con <sup>18</sup>O de MRM. La lista de transición final para cada estudio de cohortes constaba de 1-2 péptidos (véase la tabla 3) por proteína experimental (véase la tabla 1) y 3 transiciones por péptido. Si es posible, se excluyeron las secuencias de péptidos que no eran exclusivas de la proteína experimental y los péptidos con los aminoácidos M, W, Q N-terminal o E, etc.

Tabla 3

Nombre de la proteína (véase la tabla 1)	Número de entrada (Uniprot)	Secuencias de posición/péptido (SEQ ID nº)	Clave
Sulfhidril oxidasa 1	sp O00391 QSOX1_HUMAN	257-265 SFYTAYLQR (SEQ ID nº: 1)	L
Apolipoproteína A-IV	sp P06727 APOA4_HUMAN	135-143 LEPYADQLR (SEQ ID nº: 2)	APOA4/LEP
	sp P06727 APOA4_HUMAN	256-264 ISASAEELR (SEQ ID nº: 3)	APOA4/ISA
Antígeno de CD5	sp O43866 CD5L_HUMAN	246-256 LVGGDNLCSGR (SEQ ID nº: 4)	CD5L/LVG
	sp O43866 CD5L_HUMAN	308-314 IWLDNVR (SEQ ID nº: 5)	CD5L/IWL
Cadena beta del componente C8 del complemento	sp P07358 CO8B_HUMAN	122-132 CEGFVCAQTGR (SEQ ID nº: 6)	M
Apolipoproteína B-100	sp P04114 APOB_HUMAN	642-654 SVSLPSLDPASAK (SEQ ID nº: 7)	APOB/SVS
	sp P04114 APOB_HUMAN	950-960 TEVIPLIENR (SEQ ID nº: 8)	APOB/TEV
Peroxirredoxina-2	sp P32119 PRDX2_HUMAN	17-26 ATAVVDGAFK (SEQ ID nº: 9)	PRDX2/ATA
Proteína AMBP	sp P02760 AMBP_HUMAN	283-293 TVAACNLPIVR (SEQ ID nº: 10)	AMBP/TVA
	sp P02760 AMBP_HUMAN	335-349 EYCGVPGDGDEELLR (SEQ ID nº: 11)	AMBP/EYC
Subunidad de beta hemoglobina	sp P68871 HBB_HUMAN	10-18 SAVTALWGK (SEQ ID nº: 12)	I1
	sp P68871 HBB_HUMAN	19-31 VNVDEVGGEALGR (SEQ ID nº: 13)	I2
Subunidad B del subcomponente del complemento C1q	sp P02746 C1QB_HUMAN	122-128 IAFSATR (SEQ ID nº: 14)	C1QB/IAF
Apolipoproteína C-III	sp P02656 APOC3_HUMAN	45-60 DALSSVQESQVAQQAR (SEQ ID nº: 15)	APOC3/DAL
Proteína 3 de unión al insulinoide	sp P17936 IBP3_HUMAN	47-63 ALAQCAPPAVCAELVR (SEQ ID nº: 16)	IBP3/ALA
	sp P17936 IBP3_HUMAN	226-233 FLNVLSPR (SEQ ID nº: 17)	IBP3/FLN
Adiponectina	sp Q15848 ADIPO_HUMAN	78-92 GDIGETGVPGAEGPR (SEQ ID nº: 18)	ADIPO/GDI
Proteína 2 relacionada con el factor H del complemento	sp P36980 FHR2_HUMAN	233-242 TGDIVEFVCK (SEC ID nº: 19)	FHR2/TGD
	sp P36980 FHR2_HUMAN	262-270 LVYPSCEEK (SEC ID nº: 20)	FHR2/LVY

### C.3. Análisis instrumental

5 Todas las muestras se redisolieron y se intensificaron 1:1 con un plasma de referencia marcado con  $^{18}\text{O}$  (grupo de individuos sanos) antes del análisis LC-MRM/MS para corregir las diferencias de eficiencia de pulverización y de ionización entre series. Cada muestra se inyectó por duplicado directamente en una nanocolumna (Dionex C18, PepMap 100, 3  $\mu\text{m}$ ) y los péptidos se eluyeron en un gradiente de 100 min de 2-30% de acetonitrilo (ácido fórmico al 0,1%) en un 4000 QTrap equipado con una fuente de ionización por nanoelectropulverización. La opción MRM

programada se usó para toda la adquisición de datos con un tiempo de exploración objetivo de 4 s (al menos 8 puntos de datos en un pico) y una ventana de detección MRM de 6-8 minutos que dio como resultado tiempos de permanencia mínimos de 50-60 ms.

C.4. Análisis de los datos

5 Todas las transiciones se integraron y para cada péptido se calculó una relación (ponderada) de área de péptido no marcado a área de péptido marcado. Las relaciones se normalizaron para las diferencias de población basadas en un conjunto invariable de proteínas. Por último, se aplicó una prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos a las relaciones normalizadas y se calculó un valor de p, que define una proteína expresada de manera significativa diferencialmente entre dos grupos de pacientes, p. ej. sano frente a enfermo.

10 La sensibilidad, o la tasa de verdaderos positivos, frente a la tasa de falsos positivos (curvas características operativas relativas) también se representaron para una gama de marcadores (univariable y multivariable). Se usaron numerosas transformaciones estadísticas para mejorar la potencia, incluidos el logaritmo natural (ln), inverso (inv) y raíz cuadrada ( $\sqrt{\quad}$ ).

2. Resultados

15 D. biomarcadores

D1. Biomarcadores para nefropatía diabética en pacientes diabéticos

La tabla en la Figura 1 muestra datos de proteína de biomarcador procedentes de los estudios de diabetes tanto de Busselton como de Fremantle con respecto a la presencia de nefropatía diabética donde todos los pacientes tenían diabetes. La pregunta que se aborda es “¿Cuáles son los biomarcadores para nefropatía diabética en pacientes diabéticos?”

20 Los resultados de la tabla en la figura 1 se ilustran como diagramas de caja con bigotes de la figura 2 (estudio FDS1), figura 3 (estudio FDS2) y la figura 4 (estudio BDS). Para cada candidato a biomarcador, se midieron por MRM uno a dos péptidos característicos por proteína (gráfico de caja izquierdo: grupo diabético, gráfico de caja derecho: grupo diabético con nefropatía grave, eje x: proteína/péptido, eje y: relación de abundancia relativa).

25 Los datos ROC en las tablas 4-8 ilustran además que el/los biomarcador(es) se puede utilizar como un diagnóstico para nefropatía diabética.

Tabla 4 Análisis univariable

Péptido (clave - véase la tabla 3)	Relaciones raras	Sensibilidad	Especificidad	P	AUC ROC	Media		n
						referencia	caso	
PRDX2/ATA (ln)	17,7	80,0	80,0	0,040	0,860	0,245	0,507	20
AMBP/TVA	22,6	70,0	70,0	0,034	0,840	2,00	2,63	20
AMBP/EYC	1,42	60,0	80,0	0,061	0,850	10,6	14,1	20
C1QB/IAF (ln)	0,002	90,0	87,5	0,088	0,950	1,08	0,363	18

Tabla 5 Análisis multivariable (Modelo 3)

Péptido (clave - véase la tabla 3)	Relaciones raras	Sensibilidad	Especificidad	P	AUC de ROC	Media		n
						referencia	caso	
PRDX2/ATA (ln)	6,06	90,0	87,5	0,678	0,9625	0,265	0,61	18
AMBP/TVA	0,109			0,697		2,04	2,68	
AMBP/EYC	2,10			0,426		11	14,3	
C1QB/IAF (ln)	0,0004			0,287		1,2	0,41	

30

Tabla 6 Análisis multivariable (Modelo FDS1)

Péptido (clave - véase la tabla 3)	Relaciones raras	Sensibilidad	Especificidad	P	ROC AUC	Media		n
						referencia	caso	
PRDX2/ATA (ln)	6,52	90	90	0,254	0,89	-1,41	-0,68	20
AMBP/TVA	6,61			0,355		2,04	2,67	
AMBP/EYC	1,01			0,97		10,98	14,34	

Tabla 7 Análisis multivariable (Modelo FDS2)

Péptido (clave - véase la tabla 3)	Relaciones raras	Sensibilidad	Especificidad	P	ROC AUC	Media		n
						referencia	caso	
C1QB/IAF (ln)	0,016	88,9	100	0,167	0,958	1,08	0,363	17
AMBP/EYC	0,044			0,218		2,78	2,28	
ADIPO/GDI (ln)	0,281			0,589		0,797	0,394	
FHR2/LVY (√)	0,342			0,842		1,46	1,08	

5

Tabla 8 Análisis multivariable (Modelo BDS)

Péptido (clave - véase la tabla 3)	Relaciones raras	Sensibilidad	Especificidad	P	ROC AUC	Media		n
						referencia	caso	
CD5L/LVG (√)	34.679	66,7	80	0,209	0,922	0,796	0,890	19
CD5L/IWL (ln)	0,0009			0,151		3,11	1,65	
APOB/SVS	5,42e <sup>25</sup>			0,076		0,146	0,308	
APOB/TEV	1,95e <sup>-40</sup>			0,092		0,130	0,237	

D2. Biomarcadores para diabéticos con nefropatía frente a pacientes sanos

La tabla en la figura 5 describe los biomarcadores descubiertos para pacientes con nefropatía diabética frente a un grupo de referencia sano sin diabetes. Esta información procede del estudio de Busselton.

- 10 En la presente memoria, la presencia de determinadas características no excluye la existencia de características adicionales. Las palabras "que comprende", "que incluye" y "que tiene" deben interpretarse en un sentido incluyente en lugar de exclusivo.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Proteomics International Pty Ltd  
 The University of Western Australia  
 <120> Biomarcadores asociados con prediabetes, diabetes y afecciones relacionadas con la diabetes  
 <150> AU2010904249  
 <151> 21-09-2010  
 10 <160> 20  
 <170> BiSSAP 1.0  
 15 <210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..9  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
 25 <400> 1  
**Ser Phe Tyr Thr Ala Tyr Leu Gln Arg**  
**1 5**  
 <210> 2  
 <211> 9  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> FUENTE  
 35 <222> 1..9  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
 <400> 2  
**Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg**  
**1 5**  
 40 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..9  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
 50 <400> 3  
**Ile Ser Ala Ser Ala Glu Glu Leu Arg**  
**1 5**  
 55 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..10  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

<400> 4  
 Leu Val Gly Gly Asp Asn Leu Cys Ser Gly  
 1 5 10

5 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..7  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

15 <400> 5  
 Ile Trp Leu Asp Asn Val Arg  
 1 5

20 <210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..11  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

30 <400> 6  
 Cys Glu Gly Phe Val Cys Ala Gln Thr Gly Arg  
 1 5 10

35 <210> 7  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..13  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

45 <400> 7  
 Ser Val Ser Leu Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys  
 1 5 10

50 <210> 8  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..11  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

60 <400> 8  
 Thr Glu Val Ile Pro Pro Leu Ile Glu Asn Arg  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE  
 <222> 1..10  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

5 <400> 9  
 Ala Thr Ala Val Val Asp Gly Ala Phe Lys  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..11  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

<400> 10  
 Thr Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg  
 1 5 10

20 <210> 11  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..15  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

30 <400> 11  
 Glu Tyr Cys Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu Arg  
 1 5 10 15

35 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..9  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

45 <400> 12  
 Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys  
 1 5

<210> 13  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..13  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

55 <400> 13  
 Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg  
 1 5 10

60 <210> 14  
 <211> 7

ES 2 665 910 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 5 <221> FUENTE  
 <222> 1..7  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
  
 <400> 14  
 Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg  
 10 1 5  
  
 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..16  
 20 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
  
 <400> 15  
 Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg  
 1 5 10 15  
  
 25 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 30 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..18  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
  
 35 <400> 16  
 Ala Leu Ala Gln Cys Ala Pro Pro Pro Ala Val Cys Ala Glu Leu Val  
 1 5 10 15  
 Arg Arg  
  
 <210> 17  
 <211> 8  
 40 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> FUENTE  
 45 <222> 1..8  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
  
 <400> 17  
 Phe Leu Asn Val Leu Ser Pro Arg  
 1 5  
 50  
  
 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
  
 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..15  
 <223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"  
 60  
  
 <400> 18

ES 2 665 910 T3

Gly Asp Ile Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg  
1                    5                    10                    15

<210> 19  
<211> 10  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> FUENTE  
10 <222> 1..10  
<223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

<400> 19  
Thr Gly Asp Ile Val Glu Phe Val Cys Lys  
1                    5                    10

15 <210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <220>  
<221> FUENTE  
<222> 1..9  
<223> /tipo\_mol="proteina" / organismo="Homo sapiens"

25 <400> 20  
Leu Val Tyr Pro Ser Cys Glu Glu Lys

30 1                    5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para evaluar a un paciente de nefropatía diabética que comprende medir al menos un biomarcador en una muestra del paciente, en donde al menos dicho biomarcador antigenoide CD5.
- 5 2. Un método según la reivindicación 1, en donde al menos un biomarcador comprende además al menos dos de los biomarcadores en la tabla 1.
3. Un método según la reivindicación 1, en donde el al menos un biomarcador comprende además al menos tres de los biomarcadores en la tabla 1.
- 10 4. Un método según la reivindicación 1, en donde al menos un biomarcador comprende además al menos cuatro de los biomarcadores en la tabla 1.
- 15 5. Un método según la reivindicación 1, en donde al menos un biomarcador comprende además proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulinoide.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa de determinación de al menos un biomarcador en una muestra del paciente comprende detectar un fragmento peptídico de al menos dicho biomarcador.
- 20 7. Un método según la reivindicación 6, en donde los biomarcadores se determinan usando espectrometría de masas y el fragmento peptídico es un fragmento de péptido de 5-25 aminoácidos.
- 25 8. Un método según la reivindicación 6, en donde el fragmento peptídico se selecciona del grupo que comprende las SEQ ID n°: 1 a 20.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicho fragmento peptídico se detecta usando espectrometría de masas.
- 30 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente es asintomático para indicadores no específicos de nefropatía diabética o sólo los presenta.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el paciente ha sido diagnosticado con nefropatía diabética.
- 35 12. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el paciente padece enfermedad renal.
13. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el paciente padece microalbuminuria, macroalbuminuria o enfermedad renal en etapa terminal.
- 40 14. El método según cualquier reivindicación precedente, en donde la muestra comprende una muestra de sangre.

Figura 1

Estudio	Nombre	Número de entrada	Cambio de estado	Diferencia de pliegues	Valor p (Mann-Whitney)
FDS1	Peroxirredoxina-2	P32119	arriba	2,3	0,01
	Proteína AMBP	P02760	arriba	1,3	0,01
	Apolipoproteína A-IV	P06727	arriba	2	0,05
FDS2	Subunidad B subcomponente de complemento C1q	P02746	abajo	3	0,0016
	Apolipoproteína A-IV	P06727	arriba	1,5	0,08
	Apolipoproteína C-III	P02656	arriba	2,3	0,056
	Factor de crecimiento insulinoide	P17936	abajo	1,7	0,07
	Proteína AMBP	P02760	abajo	1,3	0,037
	Adiponectina	Q15848	abajo	2	0,04
	Proteína 2 relacionada con factor H de complemento	P36980	abajo	1,7	0,03
	Subunidad de beta-hemoglobina	P68871	arriba	3,5	0,05
BDS	Antígeno CD5	O43866	abajo	2	0,06
	Apolipoproteína B-100	P04114	arriba	1,3	0,045

Figura 2

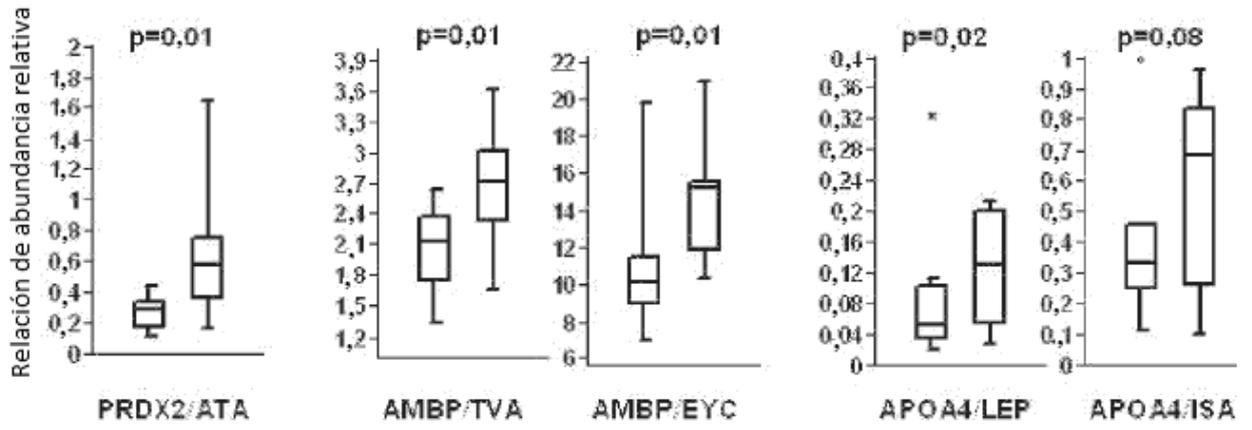


Figura 3

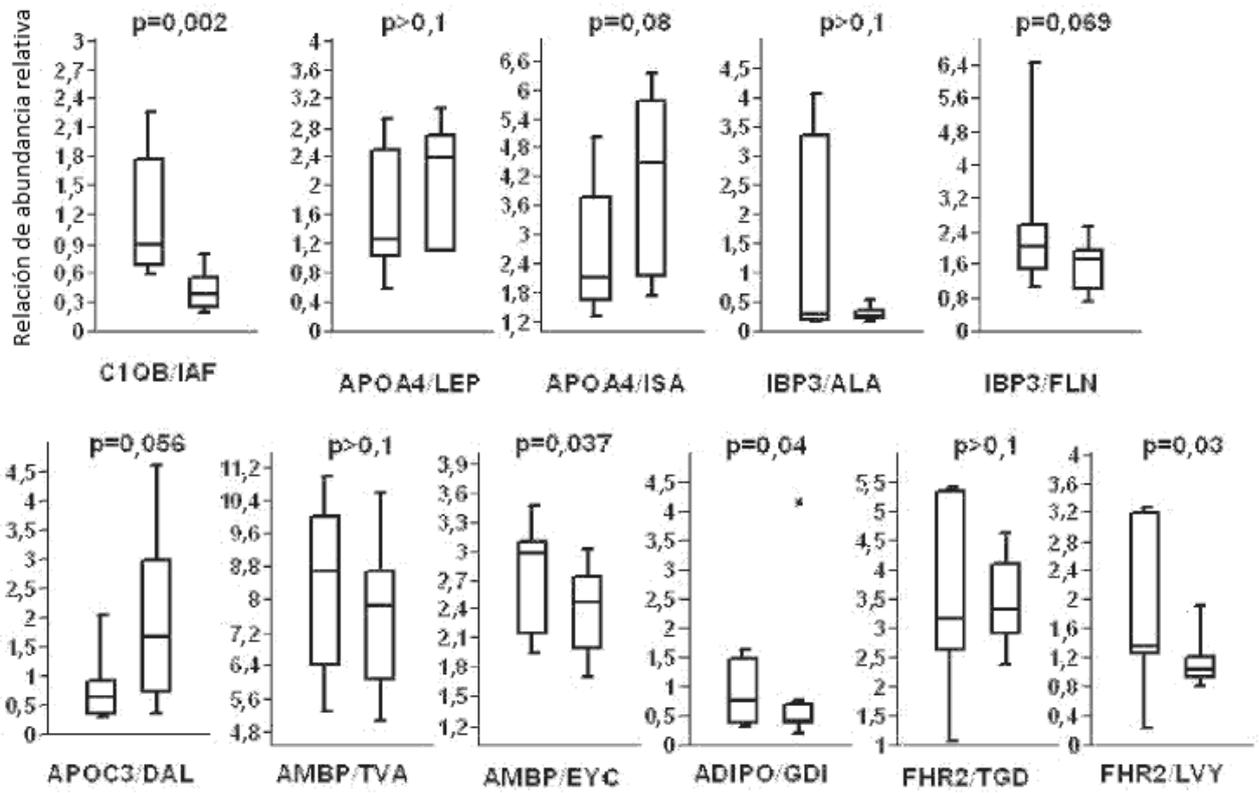
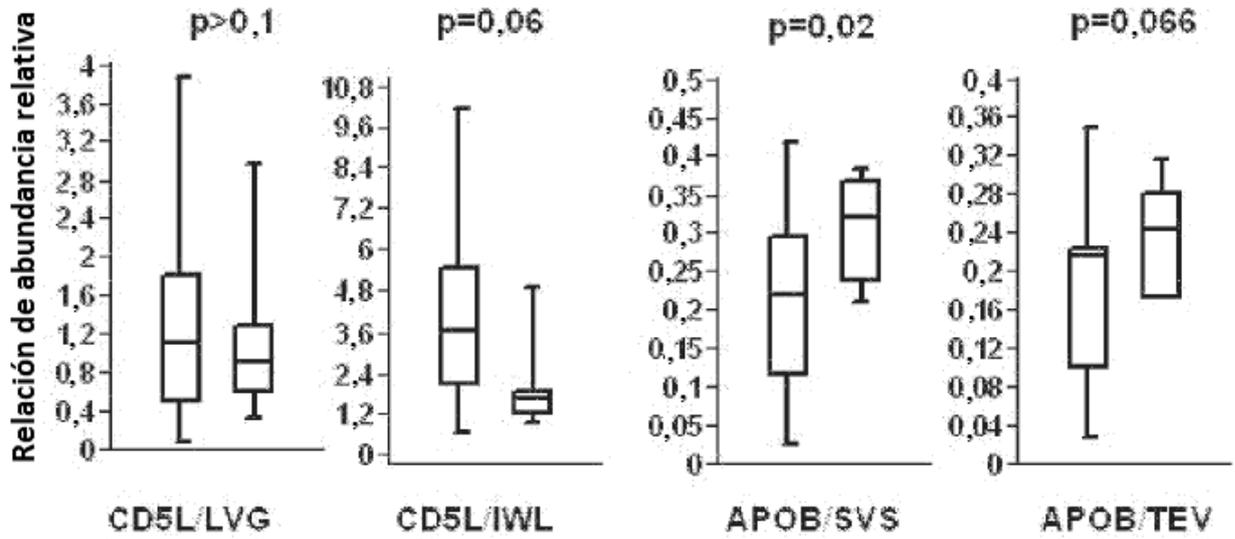


Figura 4



**Figura 5**

Estudio	Nombre	Número de entrada	Cambio de estado	Diferencia de pliegues	Valor p (Mann-Whitney)
BDS	Sulfhidil oxidasa 1	O00391	arriba	1,7	0,045
	Apolipoproteína A-IV	P06727	arriba	1,7	0,05
	Cadena beta del componente C8 del complemento	P07358	arriba	1,3	0,09