

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 976**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/US2013/030152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13154709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13775210 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2836845**

54 Título: **Biomarcadores maternos para diabetes gestacional**

30 Prioridad:

**13.04.2012 US 201261623690 P**

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

**05.10.2018**

73 Titular/es:

**DIABETOMICS, INC. (100.0%)  
2345 NW Amberbrook Drive, Suite 140  
Hillsboro, OR 97006, US**

72 Inventor/es:

**NAGALLA, SRINIVASA, R.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 684 976 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 maternos para diabetes gestacional

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad respecto a la Solicitud de Patente Provisional en EE UU No. 61/623.690, presentada el 13 de abril, 2012, titulada "BIOMARCADORES MATERNOS PARA DIABETES GESTACIONAL".

10 **Campo técnico**

Las formas de realización en el presente documento se refieren al campo de las herramientas de cribado para el bienestar fetal/materno y, más específicamente, a biomarcadores para diabetes gestacional.

15 **Antecedentes**

20 Los índices de obesidad y diabetes han aumentada rápidamente a lo largo de los últimos 20 años tanto en los Estados Unidos como globalmente. La incidencia de diabetes mellitus gestacional (DMG) también está aumentado, en paralelo a la subida global en obesidad y diabetes de tipo 2. Se espera que la adopción de nuevos criterios diagnósticos basados en el reciente estudio Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes (HARPO) aumente la prevalencia de DMG hasta aproximadamente el 18% de todos los embarazos. A la luz del hecho de que el 80-90% de las mujeres con DMG pueden ser tratadas con terapia de estilo de vida sola, el cribado universal para DMG se considera crecientemente justificado.

25 La DMG es una complicación grave del embarazo que puede aumentar el riesgo de un número de trastornos materno-fetales, incluyendo macrosomía, distocia de hombros o lesión en el nacimiento, parto prematuro, y preeclampsia. Además del riesgo aumentado de complicaciones asociadas con la gestación y parto, también hay complicaciones posnatales graves asociadas con DMG. Por ejemplo, se encontró que del 5 al 10% de las mujeres con DMG tienen diabetes inmediatamente después del embarazo, y las mujeres que han tenido DMG tienen una posibilidad 10 veces mayor de desarrollar diabetes en los siguientes 10-20 años. Los hijos de madres con DMG tienen un riesgo ocho veces mayor de desarrollar diabetes de tipo 2 en la vida posterior. Por tanto, la DMG no tratada contribuye a la población diabética global tanto a corto como a largo plazo.

35 El cribado de DMG universal o incluso generalizado está obstaculizado por el hecho de que las evaluaciones estándares de diabetes y prediabetes, tales como insulina/glucosa y HbA1c en ayunas, no están recomendadas para el cribado de DMG. En su lugar, el parámetro recomendado es una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT), que es costosa e invasiva, que requiere una visita al hospital y múltiples extracciones de sangre.

40 **Breve descripción de los dibujos**

Las formas de realización se entenderán fácilmente mediante la siguiente descripción detallada junto con los dibujos acompañantes. Las formas de realización se ilustran a modo de ejemplo y no a modo de limitación en las figuras de los dibujos acompañantes.

45 La **figura 1** ilustra un análisis de electroforesis en gel diferencial bidimensional (2D-DIGE) de muestras de suero materno control y de DMG, en las que proteínas diferencialmente abundantes (flechas) aparecen como manchas rojas o verdes dependiendo del grado de sub- o sobre-abundancia, según varias formas de realización:

50 La **figura 2** ilustra las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) que demuestran la capacidad de glucosilación de la fibronectina y la glucoproteína específica de embarazo (PSG) para distinguir muestras de mujeres embarazadas con y sin diabetes gestacional, según varias formas de realización:

55 La **figura 3** ilustra curvas ROC que demuestran el rendimiento de clasificación de cada proteína y perfil de glucosilación de proteína como analitos individuales y como un modelo multi-analito, según varias formas de realización;

La **figura 4** ilustra medidas en serie de fibronectina-SNA a través de trimestres en 35 controles no diabéticas, en la que las líneas representan el 25° y 75° percentil del grupo de estudio de DMG, según varias formas de realización;

60 La **figura 5** es una curva de eficacia diagnóstica (ROC) que ilustra la capacidad de fibronectina-SNA del primer trimestre para predecir el posterior desarrollo de diabetes gestacional, según varias formas de realización;

65 La **figura 6** es una curva de eficacia diagnóstica (ROC) que ilustra la capacidad de glucosilación de fibronectina y PSG para distinguir entre no diabéticas y diabéticas gestacionales en el segundo y tercer trimestres del embarazo, según varias formas de realización;

La **figura 7** es una curva de eficacia diagnóstica (ROC) que ilustra el rendimiento de clasificación de cada proteína y perfil de glucosilación de proteína como analitos individuales y como un modelo multi-analito, según varias formas de realización;

5 Las **figuras 8A** y **8B** ilustran un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de un inmunoensayo de flujo lateral (**figura 8A**) y un dispositivo de flujo lateral (**figura 8B**) que se puede usar según varias formas de realización divulgadas en el presente documento; y

10 La **figura 9** es un gráfico que ilustra una comparación de los resultados de un ELISA de fibronectina con los resultados de una prueba FN-LFIA, según varias formas de realización.

### Descripción detallada de formas de realización divulgadas

15 En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos acompañantes que forman una parte de la misma, y en la que se muestran a modo de ilustración formas de realización que se pueden practicar. Se debe entender que se pueden utilizar otras formas de realización y se pueden hacer cambios estructurales o lógicos. Por tanto, la siguiente descripción detallada no se debe tomar en un sentido limitante, y el ámbito de las formas de realización se define por las reivindicaciones adjuntas.

20 Se pueden describir varias operaciones como operaciones discretas múltiples sucesivamente, de una manera que puede ser útil en entender las formas de realización; sin embargo, el orden de descripción no se debe interpretar que implica que estas operaciones son dependientes del orden.

25 La descripción puede usar descripciones basadas en perspectiva tal como arriba/abajo, detrás/delante, y superior/inferior. Tales descripciones se usan solamente para facilitar la discusión y no se pretende que restrinjan la aplicación de las formas de realización divulgadas.

30 Los términos “acoplado” y “conectado” junto con sus derivados, se pueden usar. Se debe entender que estos términos no se pretenden como sinónimos entre sí. Más bien, en formas de realización particulares, “conectado” se puede usar para indicar que dos o más elementos están en contacto físico o eléctrico directo entre sí. “Acoplado” puede significar que dos o más elementos están en contacto físico o eléctrico directo entre sí. Sin embargo, “acoplado” también puede significar que dos o más elementos no están en contacto directo entre sí, pero aún cooperan o interactúan entre sí.

35 Para los fines de la descripción, una frase en la forma “A/B” o en la forma “A y/o B” significa (A), (B), o (A y B). Para los fines de la descripción, una frase en la forma “al menos uno de A, B y C” significa (A), (B), (C), (A y B), (A y C), (B y C), o (A, B y C). Para los fines de la descripción, una frase en la forma “(A)B” significa (B) o (AB), es decir, A es un elemento opcional.

40 La descripción puede usar los términos “forma de realización” o “formas de realización”, que se pueden referir cada uno a una o más de formas de realización iguales o diferentes. Además, los términos “comprender”, “incluir”, “tener”, y similares, como se usan con respecto a las formas de realización, son sinónimos.

45 En el presente documento se divulgan en varias formas de realización métodos no invasivos y mínimamente invasivos que se pueden usar para el cribado generalizado para diabetes gestacional. En varias formas de realización, los métodos pueden incluir determinar si un perfil proteómico de una muestra de prueba de un sujeto incluye al menos una firma de expresión característica de diabetes gestacional, en donde el perfil proteómico incluye información sobre la expresión de fibronectina glucosilada, por ejemplo, mediante la detección y/o cuantificación de fibronectina glucosilada, tal como detectar/cuantificar fibronectina-lectina de Sambucus nigra (SNA) y/o detectar y/o  
50 cuantificar glucoproteína específica de embarazo-lectina de Aleuria aurantia (PSG-AAL). En algunas formas de realización, el perfil proteómico también puede incluir información sobre la expresión de adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), proteína C reactiva (CRP), la proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario, o una combinación de las mismas, tal como dos, tres, o las cuatro de adiponectina,  
55 SHBG, CRP y la proporción de hCG respecto a lactógeno placentario.

Como se usa en el presente documento, el término “proteoma” se refiere a una porción significativa de las proteínas en una muestra biológica en un momento determinado. En términos generales, el proteoma es fundamentalmente diferente de un genoma en que mientras que el genoma es virtualmente estático, el proteoma cambia continuamente  
60 en respuesta a sucesos internos y externos. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término “perfil proteómico” se refiere a una representación del patrón de expresión de una pluralidad de proteínas en una muestra biológica, tal como sangre completa, plasma, suero o saliva, en un momento determinado. En varias formas de realización, un perfil proteómico puede, por ejemplo, estar representado como un espectro de masas, pero también se incluyen otras representaciones basadas en cualquier propiedad fisicoquímica o biológica de las proteínas. Por  
65 tanto, un perfil proteómico se puede, por ejemplo, basar en diferencias en las propiedades electroforéticas de las proteínas, determinadas por electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) o electroforesis en gel

diferencial bidimensional (2D-DIGE), y puede estar representado, por ejemplo, como una pluralidad de manchas en un gel de electroforesis bidimensional. En varias formas de realización, los perfiles de expresión diferencial pueden tener importante valor diagnóstico, y las manchas de proteínas se pueden detectar y/o cuantificar, por ejemplo, por espectrometría de masas, inmunotransferencia, ensayos ELISA, o micromatrices de proteína. En varias formas de realización, las proteínas se pueden detectar y/o cuantificar usando dispositivos de flujo lateral, tal como para su uso en un punto de atención, así como pruebas colorimétricas de control de manchas.

En varias formas de realización, un perfil proteómico según la presente divulgación puede representar o contener información de aproximadamente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más proteínas. Como se usa en el presente documento, el término "firma de expresión" se refiere a una característica o motivo de expresión de proteínas único en un perfil proteómico de una muestra biológica (tal como una muestra de prueba) que puede ser diferente de un perfil proteómico de una muestra de referencia correspondiente (por ejemplo, obtenida del mismo tipo de fluido biológico) de una manera estadísticamente significativa. Por ejemplo, en varias formas de realización, una "firma de expresión característica de diabetes gestacional" puede incluir un motivo característico que se diferencia de un perfil proteómico de una muestra de referencia normal, o puede compartir un motivo característico con un perfil proteómico de una muestra de referencia de diabetes gestacional. En varias formas de realización, la firma de expresión puede incluir un aumento o disminución en la expresión de dos o más proteínas específicas, por ejemplo, fibronectina glucosilada (por ejemplo, que se puede detectar como fibronectina-SNA o un complejo fibronectina-anticuerpo), PSG glucosilada (por ejemplo, que se puede detectar como PSG-AAL o un complejo PSG-anticuerpo), adiponectina, SHBG, y/o CRP, y/o puede incluir un aumento o disminución en la proporción de expresión de dos o más proteínas específicas, tal como la proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario. Para cada una de estas proteínas, se enumera un número de acceso de GENBANK® ejemplar: fibronectina humana, No. de acceso de Genbank P02751; glucoproteína beta 1 específica de embarazo humana 9, No. de acceso de Genbank gi:6093845; globulina fijadora de hormonas sexuales humana, No. de acceso de Genbank gi:134907; adiponectina humana, No. de acceso de Genbank gi:167077467; coriogonadotropina humana subunidad beta, No. de acceso de Genbank gi:116184; hormona glucoproteína humana cadena alfa, No. de acceso de Genbank gi:121312; lactógeno placentario humano, No. de acceso de Genbank gi:190034; y proteína C reactiva humana, No. de acceso de Genbank gi:30224.

En algunas formas de realización, el método incluye detectar un aumento, tal como un aumento estadísticamente significativo relativo a una muestra de referencia, tal como al menos un aumento del 10%, 15%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 250% o incluso mayor, en la expresión de fibronectina glucosilada (que se puede detectar como, por ejemplo, fibronectina-SNA) y PSG glucosilada (que se puede detectar como, por ejemplo, PSG-AAL), o un aumento estadísticamente significativo en la expresión de fibronectina glucosilada (que se puede detectar como, por ejemplo, fibronectina-SNA) y PSG glucosilada (que se puede detectar como, por ejemplo, PSG-AAL), además de CRP y/o la proporción de hCG respecto a lactógeno placentario. En algunas formas de realización, el aumento estadísticamente significativo en la expresión de fibronectina y PSG (por ejemplo, fibronectina-SNA y PSG-AAL) también puede estar acompañado por una disminución estadísticamente significativa, tal como al menos una disminución del 10%, 15%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 250% o incluso mayor, relativo a la muestra de referencia, en la expresión de adiponectina y/o SHBG. En formas de realización particulares, una firma de expresión característica de diabetes gestacional puede incluir un aumento estadísticamente significativo en la expresión de fibronectina glucosilada (por ejemplo, detectada como fibronectina-SNA), PSG glucosilada (por ejemplo, detectada como PSG-AAL), CRP y la proporción de hCG respecto a lactógeno placentario, además de una disminución estadísticamente significativa en la expresión de adiponectina y SHBG.

En varias formas de realización, si la muestra de referencia es una muestra de referencia normal o control, tal como una muestra de un sujeto que no tiene diabetes gestacional, y el perfil proteómico de la muestra de prueba se diferencia de la muestra de referencia con respecto a al menos una firma de expresión característica de diabetes gestacional, entonces se puede determinar que el sujeto tiene diabetes gestacional. Por el contrario, si la muestra de prueba no se diferencia de la muestra de referencia normal con respecto a al menos una firma de expresión característica de diabetes gestacional, entonces se puede determinar que el sujeto no tiene diabetes gestacional. En otras formas de realización, si la muestra de referencia es una muestra de referencia de diabetes gestacional, tal como una muestra de un sujeto que tiene diabetes gestacional, y el perfil proteómico de la muestra de prueba se diferencia de la muestra de referencia con respecto a al menos una forma de expresión característica de diabetes gestacional, entonces se puede determinar que el sujeto no tiene diabetes gestacional. Por el contrario, si la muestra de prueba no se diferencia de la muestra de referencia de diabetes gestacional con respecto a al menos una firma de expresión característica de diabetes gestacional, entonces se puede determinar que el sujeto tiene diabetes gestacional. Algunas formas de realización pueden usar más de una muestra de referencia, tal como una muestra de referencia normal y una muestra de referencia de diabetes gestacional. Por tanto, el perfil proteómico proporciona un criterio diagnóstico para diabetes gestacional. Los métodos estadísticos para determinar si la abundancia de una proteína de interés está aumentada o disminuida relativa a una muestra de referencia se conocen bien en la técnica, y se describen posteriormente.

En varias formas de realización, el análisis proteómico de fluidos biológicos, tal como sangre completa, saliva, o suero, se puede realizar usando una variedad de métodos que conocen los expertos en la materia. En varias formas de realización, en un análisis comparativo directo, la muestra de referencia y la muestra de prueba se pueden tratar

exactamente de la misma manera, para representar correctamente la abundancia relativa de proteínas y obtener resultados precisos. Por ejemplo, como se ha discutido anteriormente, en varias formas de realización, las proteínas presentes en las muestras biológicas se pueden separar por electroforesis en gel bidimensional según su carga y peso molecular. Por ejemplo, las proteínas se pueden separar primero por su carga usando isoelectroenfoque (electroforesis unidimensional), por ejemplo, usando tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), que están comercialmente disponibles. En varias formas de realización, la segunda dimensión puede ser un análisis por SDS-PAGE, donde la tira de IPG enfocada se puede usar como la muestra. Después de la separación en electroforesis en gel bidimensional, las proteínas se pueden visualizar después con colorantes convencionales, tal como azul de Coomassie o tinción con plata, y obtener imágenes usando técnicas y equipo conocidos, tal como, por ejemplo, densitómetro Bio-Rad GS800 y software PDQUEST™.

En algunas formas de realización, las manchas individuales se pueden cortar después del gel, destefiñar, y someter a digestión triptica, lo que permite que las muestras de péptidos se analicen por espectrometría de masas (EM). Alternativamente, en algunas formas de realización, los péptidos se pueden separar, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta presión capilar (HPLC) y se pueden analizar por EM ya sea individualmente, o en grupos. Si se desea, en algunas formas de realización, las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos y las proteínas de las que derivan, se pueden determinar. Aunque es posible identificar y secuenciar todas o algunas de las proteínas presentes en un perfil proteómico, esto típicamente no es necesario para el uso diagnóstico de los perfiles proteómicos.

Como se ha discutido anteriormente, en varias formas de realización, un diagnóstico de diabetes gestacional se puede basar en similitudes o diferencias características (por ejemplo, firmas de expresión) entre una muestra de referencia y una muestra de prueba. Por ejemplo, en varias formas de realización, si el perfil proteómico se presenta en forma de un espectro de masas, la firma de expresión puede ser un pico o una combinación de picos que se diferencian, cualitativa o cuantitativamente, del espectro de masa de una muestra normal correspondiente. Por tanto, la aparición de un nuevo pico o una combinación de picos nuevos en el espectro de masa, o cualquier cambio estadísticamente significativo en la amplitud o forma de un pico existente o combinación de picos existentes, o la desaparición de un pico existente en el espectro de masa se puede considerar una firma de expresión.

Los métodos estadísticos para comparar perfiles proteómicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en varias formas de realización que emplean un espectro de masa, un perfil proteómico se puede definir por los valores de amplitud del pico en posiciones de masa/carga ( $M/Z$ ) claves a lo largo del eje horizontal del espectro. Según esto, en varias formas de realización, un perfil proteómico característico se puede, por ejemplo, caracterizar por el patrón formado por la combinación de amplitudes espectrales a valores de  $M/Z$  determinados. En varias formas de realización, la presencia o ausencia de una firma de expresión característica, o la identidad sustancial de dos perfiles, se puede determinar emparejando el perfil proteómico de una muestra de prueba con el perfil proteómico de una muestra de referencia con un algoritmo adecuado.

Otras formas de realización pueden utilizar matrices de proteínas para seguir los niveles de expresión de proteínas, lo que permite análisis de alto rendimiento. Los expertos en la materia conocen las matrices de proteínas, y en general, están formadas por proteínas inmovilizadas, tal como anticuerpos específicos para proteínas de interés, en una superficie sólida, tal como vidrio, silicio, nitrocelulosa, o PVDF usando cualquiera de una variedad de químicas de unión covalentes y no covalentes bien conocidas en la técnica. Las matrices se pueden ensayar con proteínas marcadas con fluorescencia de dos fuentes diferentes, tal como las muestras normal y de prueba, y la intensidad de la fluorescencia puede reflejar el nivel de expresión de una proteína diana.

Varias formas de realización también pueden usar cualquiera de varios formatos de inmunoensayo para la cuantificación de niveles de expresión de proteínas. En general, los inmunoensayos pueden ser homogéneos o heterogéneos. Por ejemplo, en varias formas de realización, se puede usar un ensayo de adsorción (ELISA) para cuantificar la expresión de proteínas. En un ejemplo, en un ensayo "sándwich", una superficie sólida se puede recubrir con un anticuerpo en fase sólida, y se puede dejar que la muestra de prueba reaccione con el anticuerpo unido. Cualquier antígeno no unido (por ejemplo, proteína de interés) se puede después lavar, y después se puede hacer reaccionar una cantidad conocida de un anticuerpo marcado con enzima. El marcador se puede cuantificar después como una medida directa de la cantidad de proteína de interés presente en la muestra.

En algunas formas de realización, también se puede usar ELISA como un ensayo competitivo. Por ejemplo, en un ensayo competitivo, la muestra de prueba que contiene la proteína de interés se puede mezclar con una cantidad precisa de proteína de interés marcada con enzima, y ambas pueden competir para la unión a un anticuerpo unido a una superficie sólida. En varias formas de realización, el exceso de proteína marcada con enzima libre se puede lavar antes de añadir el sustrato para la enzima, y la intensidad de color resultante de la interacción enzima-sustrato se puede usar como una medida de la cantidad de proteína de interés en la muestra de prueba.

Varias otras formas de realización pueden cuantificar las proteínas de interés usando una técnica de inmunoensayo multiplicado enzimático (EMIT), que puede incluir una muestra de prueba, moléculas marcadas con enzima de las proteínas de interés, anticuerpos específicos para las proteínas de interés, y un sustrato cromógeno de enzima específico. En varias formas de realización, se puede añadir un exceso de anticuerpos específicos a la muestra de

- prueba, y las proteínas de interés se pueden unir después a los anticuerpos. En varias formas de realización, una cantidad medida de las correspondientes proteínas marcadas con enzimas se puede añadir después a la mezcla, y los sitios de unión al anticuerpo no ocupados por las proteínas de interés de la muestra de prueba se pueden ocupar con moléculas de la proteína marcada con enzima. Como resultado, en varias formas de realización, la actividad enzimática se puede reducir porque solo la proteína marcada con enzima libre puede actuar sobre el sustrato, y la cantidad de sustrato convertido puede reflejar la cantidad de enzima libre que queda en la mezcla. En varias formas de realización, una alta concentración de la proteína de interés en la muestra puede producir lecturas de absorbancia mayores.
- Varias otras formas de realización incluyen kits de inmunoensayos para la cuantificación de las proteínas de interés en una muestra de prueba. En varias formas de realización, estos kits pueden incluir, en envases separados, anticuerpos monoclonales que tienen especificidad de unión para cada una de las proteínas de interés y, opcionalmente, inmunoglobulinas anti-anticuerpo, en particular inmunoglobulinas anti-anticuerpo marcadas.
- También se describen en el presente documento dispositivos y kits de recogida de muestras para uso en los métodos divulgados. En algunas formas de realización, los métodos divulgados se pueden llevar a cabo usando un dispositivo de captura de muestra, tal como un dispositivo de flujo lateral (por ejemplo, una tira de prueba de flujo lateral) que puede permitir la cuantificación de dos o más proteínas de interés. Los dispositivos de flujo lateral están disponibles en numerosas configuraciones diferentes, pero en un ejemplo, una tira de prueba puede incluir una ruta de flujo desde un área de aplicación de la muestra anterior a un sitio de prueba, tal como desde un área de aplicación de la muestra a través de una zona de movilización a una zona de captura. En varias formas de realización, la zona de movilización puede contener un marcador movilizable que puede interactuar con la proteína de interés, y la zona de captura puede contener un reactivo que se une a la proteína de interés para la detección y/o cuantificación. En otras formas de realización, los kits de recogida de muestras ejemplares pueden incluir un medio absorbente, tal como papel de filtro, que puede incluir indicios para la colocación de la muestra de prueba en el medio. Tales kits también pueden incluir un dispositivo de punción para obtener una muestra de sangre de un sujeto, y opcionalmente, un paquete respuesta para enviar la muestra de prueba a un médico o laboratorio de análisis. Tales kits de recogida de muestras se pueden usar, por ejemplo, durante exámenes prenatales estándares, tal como la visita de la semana doce, dieciséis, veinte o veinticuatro, y/o la recogida de muestras se puede realizar cuando la sangre se obtiene para otras pruebas prenatales estándar.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para fines de ilustración, y no se deben interpretar como limitantes en modo alguno.

### 35 Ejemplos

#### *Ejemplo 1: Selección de sujetos*

Un total de 1463 mujeres consecutivas en el segundo y tercer trimestres del embarazo se sometieron a OGTT de 75 gramos seguido por una determinación de glucosa en plasma a las 2 horas. Se diagnosticó DMG como una glucosa en plasma a las 2 horas > 7,8 mmol/l, consistente con los criterios de la OMS. Todas las mujeres restantes se categorizaron como no diabéticas.

Catorce participantes no diabéticas y 15 con DMG se seleccionaron aleatoriamente de la población descrita. Las características clínicas de las participantes se describen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características de las participantes por estado DMG

Características de las participantes Media (DE)	Grupo de estudio (n)		valor p <sup>1</sup>
	No diabéticas (14)	Diabetes gestacional (15)	
Edad (años)	24,2 (3,7)	24,6 (3,5)	0,78
Índice de masa corporal pre-embarazo (kg/m <sup>2</sup> )	19,6 (3,4)	20,9 (3,2)	0,32
Porcentaje de cambio de peso (%)	15,2 (4,9)	14,2 (3,7)	0,54
Presión sanguínea (mm Hg)			
Sistólica	106 (11)	110 (11)	0,38
Diastólica	71 (6)	69 (7)	0,45
Colesterol total (mg/dl)	213 (44)	190 (28)	0,11
Lipoproteína de baja densidad (mg/dl)	120 (41)	104 (30)	0,23
Lipoproteína de muy baja densidad (mg/dl)	42 (10)	38 (13)	0,4
Lipoproteína de alta densidad (mg/dl)	51 (3)	49 (4)	0,11
Mediana (IQR)			
Triglicéridos (mg/dl)	222 (178, 238)	189 (133, 227)	0,36
Glucosa en plasma en ayunas (mg/dl)	80 (77, 85)	84 (79, 90)	0,2
Hemoglobina glucosilada (%)	5,2 (5,0, 5,4)	5,4 (5,1, 5,8)	0,23
Péptido C (ng/ml)	0,9 (0,6, 1,2)	0,7 (0,4, 1,1)	0,25

*Ejemplo 2: Perfiles proteómicos*

Se analizaron muestras de suero para obtener medidas de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), adiponectina, gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno placentario, proteína C reactiva (CRP), glucoproteína específica de embarazo 1 (PSG-1), y fibronectina, así como formas glucosiladas específicas de fibronectina y PSG-1 (Tabla 2). Se realizaron electroforesis en gel diferencial bidimensional (2D-DIGE) e inmunoensayos (ELISA).

**Tabla 2.** Diferencias en niveles de analitos en suero entre mujeres embarazadas normales y diabéticas gestacionales

Concentración de proteína Mediana (IQR)	Grupo de estudio		valor p <sup>1</sup>
	No diabéticas (14)	Diabetes gestacional (15)	
Proteína C reactiva (mg/l)	2,1 (1,0, 4,0)	5,7 (2,2, 9,0)	0,05
SHBG (mg/l)	276 (252, 304)	240 (173, 278)	0,12
Adiponectina (mg/ml)	4,1 (3,3, 5,0)	3,4 (2,3, 5,2)	0,28
Proporción hCG/lactógeno placentario	1,6 (1,0, 2,3)	3,2 (1,6, 4,3)	0,03
PSG-1 (UA)	1,16 (0,96, 1,52)	1,21 (0,80, 1,40)	0,95
Fibronectina (mg/l)	96,0 (78,8, 151,9)	151,5 (55,4, 238,6)	0,33
Glucosilación de proteínas			
PSG-AAL (UA/ml)	52,5 (46,7, 71,0)	85,7 (69,9, 99,5)	0,004
Fibronectina-SNA (UA/ml)	51,0 (45,8, 55,1)	67,0 (53,5, 84,0)	0,006

La glucosilación diferencial de fibronectina se determinó por inmunoensayos de unión a lectina directos. Se usaron pruebas de la T para análisis de variables continuas normalmente distribuidas y el equivalente no paramétrico de Wilcoxon para variables con distribución sesgada. Se usaron las pruebas chi cuadrado y exacta de Fisher para variables categóricas. Se usaron las pruebas de la t paramétrica y no paramétrica de Wilcoxon para diferencias de prueba a través de grupos para variables con distribuciones normal y sesgada, respectivamente. Las proporciones de proteínas se computaron y ensayaron a través de grupos de estudio usando pruebas de la t no paramétricas de Wilcoxon.

Las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) generadas de las probabilidades predichas de modelos de regresión logística se usaron para evaluar la capacidad de clasificación de combinaciones de analitos individuales y múltiples. El área bajo la curva ROC (AUROC) se computó de regresión logística simple para describir la capacidad de clasificación de cada proteína, proporción y proteína glucosilada individualmente. Basado en los resultados de AUROC, se añadieron secuencialmente proteínas individuales, proporciones y proteína glucosilada para construir un modelo multi-analito para rendimientos de clasificación mejorada. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando software SAS versión 9.22 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

*Ejemplo 3: Identificación de la firma de expresión característica de diabetes gestacional*

La **figura 1** ilustra una comparación por 2D-DIGE de la fracción de glucoproteína total de suero materno control y DMG reunido, en la que las manchas de proteína que eran diferencialmente abundantes en muestras control frente a DMG aparecen como manchas rojas o verdes, mientras que las proteínas presentes a niveles similares aparecen como amarillas, según varias formas de realización. Las flechas señalan a manchas de proteínas individuales que corresponden a putativos biomarcadores diferencialmente abundantes.

Se seleccionaron dos glucoproteínas de suero materno específicas, fibronectina y glucoproteína específica de embarazo (PSG-1), para la evaluación de cambios potenciales en el estado de glucosilación. El perfil de reactividad de lectina reveló que la glucosilación de fibronectina asociada con unión a lectina de *Sambucus nigra* (SNA) y la glucosilación de PSG-1 asociada con unión a lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) estaban significativamente elevadas en suero materno de DMG frente a suero control. Por tanto, estos dos pares de proteína-lectina, fibronectina-SNA y PSG-AAL, se seleccionaron para la inclusión en un panel multi-analito con biomarcadores adicionales previamente demostrados que muestran abundancia diferencial en DMG, incluyendo adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y proteína C reactiva (CRP), así como la proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario. Estos analitos se evaluaron individualmente y en combinación en un conjunto de muestras de suero materno control y DMG de las cohortes descritas en la tabla 1.

La edad media de las participantes y el IMC pre-embarazo eran 24,4 + 3,5 años y 20,3 + 3,3 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Las medidas de hemoglobina glucosilada no se diferenciaron entre participantes no diabéticas y con DMG [5,2% (IQR: 5,0-5,4%) y 5,4% (IQR: 5,1-5,8%), respectivamente]. Las medidas de glucosa en plasma en ayunas también eran similares entre grupos [80 mg/dl (IQR: 77-85 mg/dl) y 84 mg/dl (IQR: 79-90 mg/dl); p=0,20]. Además, no hubo diferencia estadísticamente significativa observada entre los grupos de estudio con respecto a cualquier otro parámetro clínico que se midió.

Como se muestra en la tabla 2, los niveles de PSG-AAL, fibronectina-SNA y la proporción hCG/lactógeno placentario estaban significativamente elevados en el grupo de DMG ( $p=0,004$ ,  $p=0,06$  y  $p=0,003$ , respectivamente). La diferencia en niveles de CRP en suero materno demostró significación límite ( $p=0,05$ ), con una mediana de concentración de 2,1 mg/l en no diabéticas y 5,7 mg/l en participantes con DMG. Por tanto, combinar estas proteínas en una proporción mejora la capacidad de distinción.

La **figura 2** ilustra las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) que demuestran la capacidad de la glucosilación de fibronectina y glucoproteína específica de embarazo (PSG) para distinguir muestras de mujeres embarazadas con y sin diabetes gestacional, según varias formas de realización. La **figura 3** ilustra las curvas ROC que demuestran el rendimiento de clasificación de cada proteína y patrón de glucosilación de proteínas como analitos individuales y como un modelo multi-analito; según varias formas de realización. Mientras que la capacidad de detectar DMG usando la expresión de las dos proteínas glucosiladas PSG-AAL y fibronectina-SNA solas es buena (AUROC: 0,85; **figura 2**), su uso junto con los otros analitos descritos en la tabla 2 en un modelo multi-analito (**figura 3**) demostró claramente rendimiento superior (AUROC: 0,97). Específicamente, la combinación de fibronectina-SNA y PSG-AAL solas tuvo un índice de detección del 74% con un índice de positivos falsos del 6% (**figura 2**), mientras que el modelo multi-analito tuvo un aumento marcado en el índice de detección (87%) con un índice de positivos falsos < 1% (**figura 3**).

Por tanto, un perfil de prueba multi-analito compuesto de proteínas individuales, sus proporciones, y patrones de glucosilación específicos en suero materno puede identificar pacientes con DMG independientemente clasificadas por OGTT. Estos analitos son todos susceptibles para análisis en manchas de sangre seca, lo que permite el uso de una prueba de cribado mínimamente invasiva, conveniente, y económica para DMG que puede ser particularmente útil para la evaluación de poblaciones desatendidas que padecen disparidades significativas en el cuidado de la diabetes.

#### *Ejemplo 4: Materiales y métodos para el panel en suero del primer trimestre para la predicción/detección de DMG*

La glucosa en plasma se determinó por el método de la hexoquinasa usando un analizador de química clínico Konelab 60i (Thermo Electron Co, Finlandia).

Las fuentes (número de catálogo) y diluciones de trabajo de los anticuerpos primarios usados en los ELISA fueron como sigue: Acm de SHBG (31401) de Abcam a 1:250; Acm de lactógeno placentario (L1022-03G) de US Biologicals a 1:250; Acm de hCG (MAB605) de Millipore a 1:250; Acm de fibronectina (MAB1918) a 1:1000, Ac policlonal de CRP (842676) a 1:180, Acm de adiponectina (840965) a 1:180, y Acm de PAPP-A-2 (MAB1668) a 1:500 de R&D systems; y Ac policlonal de AFP (A0008) a 1:1000 y Ac policlonal de PAPP-A-1 (A0230) a 1:1000 de Dako.

Los niveles de los analitos proteicos se determinaron por ELISA sándwich. Los anticuerpos de recubrimiento primarios se resuspendieron en tampón carbonato (pH 9,6) y se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo de una placa Reactibind de 96 pocillos (Pierce) y se incubó a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon con BSA al 3% en PBS (pH 7,2). Después de la adición de la muestra e incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron con PBST usando un lavador de placas de Biotek, y después se incubaron con anticuerpos de detección durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron otra vez con PBST y después se incubaron con estreptavidina-HRP (50 ng/ml en PBS; Pierce) durante 45 minutos a temperatura ambiente, y después se lavaron con PBST. Se añadió sustrato TMB (Neogen) y, después del desarrollo de la señal, se extinguió mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. La placa se leyó usando un lector de placas EPOCH (Biotek) a 490 nm, y los datos se procesaron usando software Gen5 versión 1.10.8. Los datos se analizaron después como se describe posteriormente en el ejemplo 6. Se corrió una muestra de referencia en cada placa. Para la carrera del ensayo de medidas en serie, se incluyeron muestras de los tres trimestres para cada participante en la misma placa. El coeficiente de variación (CV) interensayo para todos los ensayos fue <10%.

Para el ensayo de fibronectina-SNA, se usó el Acm de fibronectina para recubrir placas Reactibind que después se bloquearon como se ha descrito anteriormente. La solución de bloqueo se eliminó después y se añadieron 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de oxidación (peróxido de sodio 100 mM, ácido cítrico 50 mM, pH 4,0) y la placa se incubó durante 14 minutos. La solución de oxidación se eliminó después y la placa se lavó con PBST antes de la adición de la muestra. Las muestras se aplicaron a una dilución de 1:800, después de lo cual la placa se lavó con PBST. A continuación, se añadió SNA conjugada con biotina (Vector Labs) a una concentración de 0,5 ng/ $\mu$ l en PBS. Después de lavar la placa con PBST, la placa se incubó con estreptavidina-HRP y se procesó como anteriormente. El CV interensayo para FN-SNA fue del 17%.

#### *Ejemplo 5: Población objeto para el panel en suero del primer trimestre para predicción/detección de DMG*

La cohorte de maternidad finlandesa es un estudio prospectivo derivado del banco de suero en el Instituto Nacional para la Salud y Bienestar (Finlandia). Las participantes se inscribieron de clínicas de maternidad en el área del Hospital Universitario de Oulu (Oulu, Finlandia) y el Hospital Universitario de Kuopio (Kuopio, Finlandia) entre 2004 y 2010. Las muestras de suero se extrajeron durante exámenes prenatales regulares, y los datos clínicos se

obtuvieron del Registro de Nacimientos, una base de datos computarizada que contiene información sobre las características maternas y el desenlace del embarazo.

El presente análisis empleó un diseño de caso y control, en el que un total de 90 casos y 92 controles se seleccionaron aleatoriamente de la población descrita. Las participantes necesitaban una cantidad suficiente de suero del 1er trimestre recogida entre las semanas 5 y 13 de la gestación para su inclusión. Los casos de DMG elegibles incluían cualquier mujer que desarrolló DMG durante el embarazo, identificada por una OGTT de 75 g estándar seguido por determinación de glucosa en plasma a las 2 horas. Se diagnosticó DMG como glucosa en plasma a las 2 horas  $> 140$  mg/dl (7,8 mmol/l), consistente con los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Los controles no diabéticos se seleccionaron de la misma población que los casos, pero no desarrollaron DMG durante el embarazo. Las características maternas y la información del desenlace del embarazo se extrajeron de la misma base de datos para ambos grupos. No se pudieron extraer datos clínicos del registro de nacimientos para 13 controles no diabéticos. No hubo diferencia de material en la concentración de analitos en suero entre controles no diabéticos con y sin datos clínicos.

Además del suero del primer trimestre, 35 controles no diabéticos tenían muestras de suero extraídas durante el 2º y 3er trimestre. Estas participantes se incluyeron en un análisis de medidas en serie para evaluar cambios en la concentración de FN-SNA a través de los trimestres (**figura 4**).

#### *Ejemplo 6: Análisis estadístico para el panel en suero del primer trimestre para predicción/detección de DMG*

Se realizó un análisis descriptivo exhaustivo para cada característica materna y medida de analito en suero. Las distribuciones de características maternas según el grupo de estudio se compararon usando pruebas de la *t* independiente bilaterales para variables continuas y pruebas Chi cuadrado y exacta de Fisher para variables categóricas. Se usó la prueba de la *t* no paramétrica de Wilcoxon para comparaciones a través de grupos para variables continuas con distribuciones sesgadas. En participantes con medidas en serie de fibronectina-SNA, se computaron las medias de mínimos cuadrados por trimestre y se compararon usando modelos mixtos. Las medidas en serie de fibronectina-SNA se representaron y la repetibilidad se cuantificó usando un coeficiente de correlación interclase de efecto mixto, bidireccional.

La asociación independiente entre cada analito en suero y el posterior desarrollo de DMG se evaluó usando regresión logarítmica binomial univariable y multivariable. Los riesgos relativos (RR) e intervalos de confianza (IC) del 95% se pueden derivar de este método usando una distribución de Poisson con estimación de varianza robusta. Los analitos en suero se categorizaron en terciles y se evaluaron en modelos univariados y multivariados. El primer modelo se ajustó para factores maternos basales incluyendo edad materna, nuliparidad, y edad gestacional en la recogida de muestras. El segundo modelo incluía todos los factores maternos basales además de cada analito en suero significativamente asociado con el estado de DMG ( $p < 0,05$ ). Se incluyeron fibronectina-SNA, adiponectina, hs-CRP y lactógeno placentario en análisis de regresión logarítmica binomial multivariable (**figura 4**).

Para evaluar la utilidad clínica de estos analitos en suero como biomarcadores individuales y como un potencial panel del primer trimestre para la predicción de DMG, se generaron curvas de eficacia diagnóstica (ROC) de probabilidades predichas de modelos de regresión logística. El área bajo la curva ROC (AUROC) y el intervalo de confianza (IC) del 95% se computaron de regresión logística simple para describir la capacidad de clasificación de DMG de cada analito en suero individualmente. Un panel de cribado de DMG multi-analito compuesto de fibronectina-SNA, adiponectina, hs-CRP y lactógeno placentario se evaluó para determinar la discriminación del modelo multi-analito comparado con analitos individuales. Se utilizó un proceso de selección hacia atrás para evaluar la contribución de cada analito al panel multi-analito y determinar si los analitos en suero eran aditivos. Se generaron curvas ROC adicionales para determinar si el rendimiento de clasificación de un panel multi-analito variaba por paridad materna o tiempo hasta el diagnóstico de DMG.

Se describen valores de *p* bilaterales, y un valor menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando software SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

#### *Ejemplo 7: 2D-DIGE para el panel en suero del primer trimestre para predicción/detección de DMG*

La DMG se asociaba con cambios en el glucoproteoma de suero materno de DMG evaluado por 2D-DIGE. Esto se ilustra en la **figura 1**, que muestra una comparación de 2D-DIGE de la fracción de glucoproteína total de suero materno control y de DMG agrupados, en el que las manchas de proteínas que eran diferencialmente abundantes en muestras control frente a DMG aparecen como manchas verdes o rojas, mientras que las proteínas presentes a niveles similares aparecen como amarillas. La flecha señala a manchas de proteína individuales que corresponden a biomarcadores candidatos diferencialmente abundantes.

En análisis posteriores, se seleccionó fibronectina para evaluación de cambios potenciales en el estado de glucosilación. El perfil de reactividad de lectina reveló que la glucosilación de fibronectina asociada con unión a lectina de *Sambucus nigra* (SNA) (FN-SNA) estaba significativamente elevada en suero materno de DMG del 1er trimestre frente a suero control. Por tanto, FN-SNA se incluyó en un panel multi-analito con biomarcadores

adicionales previamente demostrados que muestran abundancia diferencial en DMG, incluyendo adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y proteína C reactiva (CRP), así como la proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario. Estos analitos se evaluaron individualmente y en combinación en un conjunto de muestras de suero materno control y DMG de la cohorte descrita en la tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración de proteína y glucosilación de proteína en suero del primer trimestre por estado de diabetes gestacional.

Características maternas	Grupo de estudio (n)			
	Media (DE)	Controles no diabéticas (92)	Diabetes gestacional (90)	valor p <sup>1</sup>
Edad materna (años)		26,2 (4,0)	31,3 (6,0)	<0,0001
Edad gestacional en la recogida de la muestra (semanas)		9,7 (1,4)	10,1 (0,8)	0,009
Edad gestacional en el parto (Semanas) <sup>2</sup>		40,2 (1,1)	39,7 (1,6)	0,03
Peso al nacer del bebé (g) <sup>2</sup>		3563 (401)	3644 (512)	0,26
Número (%)				
Nuliparidad <sup>2</sup>		62 (82)	29 (32)	<0,0001
Macrosomía (>4000 g) <sup>2</sup>		12 (16)	20 (22)	0,36
Concentración de analito en suero				
Media (DE)				
Fibronectina-SNA (mg/l)		80 (35)	132 (36)	<0,0001
Adiponectina (µg/ml)		3,0 (1,2)	2,5 (0,9)	0,001
SHBG (nmol/l)		91 (66)	84 (46)	0,43
Mediana (IQR)				
Proteína C reactiva (mg/l)		0,39 (0,17, 1,24)	1,17 (0,52, 2,04)	<0,0001
Lactógeno placentario (mg/l)		0,22 (0,05, 0,36)	0,34 (0,23, 0,63)	<0,0001
hCG (mUI/ml)		60911 (50655, 72984)	61542 (48287, 70467)	0,65

<sup>1</sup> Las comparaciones se hicieron usando una prueba de la t independiente bilateral y prueba de la t no paramétrica bilateral de Wilcoxon para variables continuas. Se usaron las pruebas chi cuadrado y exacta de Fisher para variables categóricas. <sup>2</sup> La edad gestacional en el parto, peso al nacer y datos de paridad no estaban disponibles para 20, 19 y 16 controles no diabéticas, respectivamente.

#### 15 *Ejemplo 8: Análisis de casos y controles del primer trimestre*

La edad media gestacional en la recogida de la muestra fue 9,9 + 1,2 semanas (intervalo: 5,7-13,1) y no era marcadamente diferente entre participantes con DMG y controles no diabéticas (10,2 + 0,8 semanas y 9,7 + 1,4 semanas, respectivamente). Las participantes con DMG eran mayores (31,4 + 5,9 años frente a 26,2 + 4,0 años; p<0,0001) y menos probable que fueran nulíparas (34% frente a 82%; p<0,0001) que las controles no diabéticas (Tabla 3). En participantes con DMG, la edad gestacional media en el diagnóstico fue 22,2 + 6,2 semanas con una media de 12,6 + 6,0 semanas entre la extracción de suero del 1er trimestre y el diagnóstico de DMG.

Las concentraciones del primer trimestre de FN-SNA, adiponectina, hs-CRP, y lactógeno placentario estaban significativamente asociadas con el estado de DMG (p<0,0001; tabla 3). En particular, FN-SNA demostró concentraciones marcadamente mayores en DMG comparadas con controles no diabéticas, con solapamiento mínimo en distribuciones de grupo [media (IC del 95%): 132 (124, 139) mg/l frente a 80 (72, 87) mg/l, respectivamente; p<0,0001].

El riesgo de posterior desarrollo de DMG aumentó con tercil creciente para FN-SNA, hs-CRP, y lactógeno placentario (tabla 4, posteriormente). La adiponectina demostró riesgo significativamente mayor de DMG si las concentraciones en el 1er trimestre estaban por debajo del primer tercil (<2,2 µg/ml), pero sin diferencia significativa en los riesgos relativos entre el 2º y 3er terciles (p=0,15). Los análisis multivariantes demostraron atenuación marcada de los riesgos relativos para todos los analitos en suero tras ajuste para la edad materna, nuliparidad, y edad gestacional en la recogida de la muestra. A pesar de esto, FN-SNA tuvo una fuerte asociación independiente con DMG después del ajuste para estos factores maternos. Además, cuando se usaron concentraciones de FN-SNA < 80 mg/l como el grupo referente, los riesgos relativos aumentaron entre el 2º y 3er tercil [RR (IC del 95%): 4,81 (1,85, 12,49) y 7,62 (2,97, 19,58), respectivamente]. La diferencia entre el 2º y 3er terciles era estadísticamente significativa (p<0,0001). Tras la adición de todos los analitos en suero al modelo de los factores maternos, hubo un cambio mínimo en el riesgo relativo de FN-SNA. En este modelo completamente ajustado, solo FN-SNA y lactógeno placentario demostraron asociaciones independientes significativas con el desarrollo de DMG en esta población.

**Tabla 4.** Riesgo de posterior diabetes gestacional a través de terciles de la concentración en suero del primer trimestre de proteína y glucosilación de proteína.

	Análisis univariable		Análisis multivariable			
			Factores maternos <sup>1</sup>		Factores maternos + analitos en suero	
	RR (IC del 95%) <sup>2</sup>	valor p	RR (IC del 95%) <sup>2</sup>	valor p	RR (IC del 95%) <sup>2</sup>	valor p
Fibronectina-SNA (mg/l)	13,77 (5,33, 35,60)	<0,0001	7,62 (2,97, 19,58)	<0,0001	7,22 (2,86, 18,21)	<0,0001
>122	7,38 (2,77, 19,67)	<0,0001	4,81 (1,85, 12,49)	0,001	4,69 (1,85, 11,90)	0,001
80-122	1,00		1,00		1,00	
<80						
Proteína C reactiva (mg/l)	2,24 (1,47, 3,42)	0,0002	1,41 (0,96, 2,09)	0,08	1,03 (0,76, 1,40)	0,85
>1,30	1,69 (1,07, 2,68)	0,02	1,11 (0,73, 1,67)	0,62	0,99 (0,72, 1,35)	0,94
0,34-1,30	1,00		1,00		1,00	
<0,34						
Lactógeno placentario (ng/ml)	2,31 (1,49, 3,60)	0,0002	1,51 (1,00, 2,30)	0,05	1,43 (1,05, 1,94)	0,02
>0,37	1,91 (1,20, 3,04)	0,006	1,63 (1,10, 2,39)	0,01	1,46 (1,08, 1,98)	0,01
0,20-0,37	1,00		1,00		1,00	
<0,20						
Adiponectina (µg/ml)	1,00		1,00		1,00	
>3,1	1,36 (0,90, 2,08)	0,15	1,18 (0,84, 1,68)	0,34	1,13 (0,85, 1,51)	0,41
2,2-3,1	1,76 (1,19, 2,58)	0,004	1,33 (0,96, 1,83)	0,09	1,30 (0,99, 1,70)	0,06
<2,2						

<sup>1</sup> El ajuste para factores maternos incluye edad materna, edad gestacional en la muestra

5 Puesto que las asociaciones estadísticamente significativas con una enfermedad o desenlace no siempre se traducen en una fuerte precisión diagnóstica, la utilidad clínica de estas pruebas se cuantificó usando análisis ROC. La curva ROC es un gráfico de la sensibilidad de una prueba diagnóstica a través de todas las posibles fracciones de positivos falsos (1-especificidad; **figura 5**). El AUROC es una estadística que se puede usar para comparar el rendimiento de clasificación de las pruebas diagnósticas. Un AUROC de 1,00 refleja discriminación perfecta entre los grupos en estudio mientras que un AUROC de 0,50 indica no discriminación. Como se ilustra en la tabla 5 a continuación, FN-SNA sola tenía un AUROC de 0,91 (IC del 95%: 0,87, 0,96). Esto se traduce a un índice de detección del 82% de los casos de DMG del cribado de suero del 1er trimestre a un índice de positivos falsos del 10%. A pesar de las fuertes asociaciones univariadas con el estado de DMG, hs-CRP, adiponectina, y lactógeno placentario demostraron solo rendimiento de clasificación marginal. Para probar si combinar estas pruebas en un modelo multi-analito mejoraba la precisión diagnóstica, se computó el AUROC para FN-SNA, adiponectina, hs-CRP y lactógeno placentario. El modelo multi-analito dio un AUROC de 0,91 (IC del 95%: 0,88, 0,96), que no era significativamente diferente del rendimiento de FN-SNA sola (p=0,48).

**Tabla 5.** Rendimiento de clasificación de cada proteína y glucosilación de proteínas como una prueba individual del primer trimestre y como un panel multi-analito.

Prueba de cribado	AUROC (IC del 95%)	Sensibilidad a fracciones de positivos falsos fijadas			
		5%	10%	15%	20%
Fibronectina-SNA	0,91 (0,87, 0,96)	64	82	85	94
Proteína C reactiva	0,68 (0,60, 0,96)	6	18	28	46
Lactógeno placentario	0,67 (0,59, 0,75)	7	16	27	42
Adiponectina	0,63 (0,55, 0,71)	12	30	35	38
Modelo multi-analito Fibronectina-SNA Proteína C reactiva Adiponectina Lactógeno placentario	0,92 (0,88, 0,96)	66	78	85	92

<sup>1</sup> El área bajo la curva de eficacia diagnóstica (AUROC) y el IC del 95% se obtuvieron usando modelos de regresión logística univariable y multivariable.

25 La estratificación por características maternas clave se realizó para determinar si el rendimiento de clasificación estaba influido por estos factores. Tras la estratificación por nuliparidad, no se observó diferencia en el AUROC de FN-SNA. Además, el tiempo entre el cribado del primer trimestre y el diagnóstico de DMG puede influir la precisión diagnóstica de la prueba si FN-SNA puede detectar solo la DMG actual o inminente. Cuando el análisis se restringió a casos con un diagnóstico de DMG que se produce más de 10 semanas desde su primera recogida de muestra del 1er trimestre, el AUROC de FN-SNA era similar [AUROC (IC del 95%): 0,92 (0,87, 0,96)]. Además, no se observó correlación entre la concentración de FN-SNA y el tiempo entre la recogida de muestra del 1er trimestre y diagnóstico de DMG (r=-0,06).

*Ejemplo 9: Medidas en serie de fibronectina-SNA*

El coeficiente de correlación interclase demostró modesta repetibilidad de FN-SNA a través del trimestre en controles no diabéticas con medidas de suero repetidas ( $r=0,44$ ). Se observó una diferencia significativa en la concentración de FN-SNA a través del primer, segundo y tercer trimestres [media (IC del 95%): 66 (59, 72) mg/l, 56 (50, 63) mg/l y 69 (62, 75) mg/l, respectivamente;  $p=0,003$ ]. No hubo diferencia significativa entre el primer y tercer trimestre con respecto a la concentración de FN-SNA ( $p=0,51$ ). A pesar del cambio a través de los trimestres, solo 4 participantes control no diabéticas tuvieron concentraciones de FN-SNA en el 25° percentil de la población de DMG del 1er trimestre.

Estos análisis ilustran la utilidad de un panel compuesto de analitos proteicos individuales, proporciones de analitos, y glucosilación de proteínas específicas en suero materno para identificar de forma eficaz pacientes de DMG independientemente clasificadas por OGTT. El rendimiento robusto de FN-SNA sola tanto en el 1er, 2° como 3er trimestres, acoplado con su rendimiento aumentado del 1er trimestre con la adición de CRP, SHGB y la proporción hCG/lactógeno placentario, apoya el uso de este panel tanto para cribado temprano como para posterior confirmación/diagnóstico de DMG. De hecho, el rendimiento de fibronectina-SNA sola en términos de especificidad y sensibilidad, sobrepasa la de la prueba de exposición a 50 g de glucosa que se ha propuesto como el precursor de cribado para la OGTT estándar. Estos analitos son todos susceptibles a análisis en manchas de sangre secas, lo que permite el uso de una prueba de cribado mínimamente invasiva, conveniente y económica para DMG que es particularmente útil para la evaluación de poblaciones desatendidas que padecen disparidades significativas en el cuidado de la diabetes.

La mayoría de los componentes del panel multianalito, además de fibronectina-SNA misma, también son glucoproteínas, y se ha descrito que su glucosilación está alterada en estados patológicos para modular la estabilidad en suero o regular su actividad. Por tanto, su utilidad en la identificación de DMG apoya adicionalmente la noción de que el glucoproteoma constituye una clase importante de biomarcadores que está estrechamente conectada a la función celular y patofisiología.

*Ejemplo 10: Marcadores en suero para el diagnóstico de DMG*

Un total de 1463 mujeres consecutivas en el segundo y tercer trimestre del embarazo se sometieron a una prueba de tolerancia oral a glucosa de 75 g (OGTT) seguido por una glucosa en plasma a las 2 horas (GP). Se diagnosticó diabetes gestacional (DMG) como una GP a las 2 horas  $> 7,8$  mmol/l, consistente con los criterios de la OMS. Todas las mujeres restantes se categorizaron como no diabéticas.

Se usó un diseño de caso y control en el que 14 participantes no diabéticas y 15 con DMG se seleccionaron aleatoriamente de la población descrita. Se usaron muestras de sangre de la OGTT para obtener medidas de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), adiponectina, gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno placentario, proteína C reactiva (CRP), glucoproteína específica de embarazo 1 (PSG-1), y fibronectina, así como formas glucosiladas específicas de fibronectina y PSG-1.

Se determinó la glucosilación diferencial de proteínas específicas (por ejemplo, fibronectina y PSG-1) por ensayo de unión a lectina directo, en el que las proteínas se inmunoprecipitaron de suero materno. Los niveles en suero materno de fibronectina y PSG-1 totales, adiponectina, CRP, hCG y lactógeno placentario se ensayaron mediante kits de ELISA comerciales.

Se realizó un análisis descriptivo exhaustivo para cada proteína, proteína glucosilada y características de participantes. Se usaron prueba de la t paramétrica y no paramétrica de Wilcoxon para ensayar las diferencias a través de grupos de estudio para variables con una distribución normal y sesgada, respectivamente. Se computaron las proporciones de proteínas y se ensayaron a través de grupos de estudio usando pruebas de la t no paramétricas de Wilcoxon.

Las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) generadas de las probabilidades predichas de modelos de regresión logística se pueden usar para evaluar la capacidad de clasificación de combinaciones de analitos individuales y múltiples. El área bajo la curva ROC (AUROC) se computó de regresión logística simple para describir la capacidad de clasificación de cada proteína, proporción y proteína glucosilada individualmente. Basado en los resultados de AUROC, se añadieron secuencialmente proteínas individuales, proporciones y proteína glucosilada para construir un modelo multi-analito para rendimientos de clasificación mejorada.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando software SAS versión 9.22 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Las características de la población de muestra se describen en la tabla 6, a continuación. La edad media de las participantes y el IMC pre-embarazo eran 24,4 + 3,5 años y 20,3 + 3,3 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Las medidas de hemoglobina glucosilada no se diferenciaron entre participantes no diabéticas y con DMG [5,2% (IQR: 5,0-5,4%) y 5,4% (IQR: 5,1-5,8%), respectivamente]. Las medidas de glucosa en plasma en ayunas también eran similares entre grupos [80 mg/dl (IQR: 77-85 mg/dl) y 84 mg/dl (IQR: 79-90 mg/dl);  $p=0,20$ ]. Además, no hubo diferencia

estadísticamente significativa observada entre los grupos de estudio con respecto a cualquier otro parámetro clínico que se midió.

**Tabla 6.** Características de las participantes por estado de diabetes gestacional

Características de las participantes	Grupo de estudio (n)		valor p <sup>1</sup>	
	Media (DE)	No diabéticas (14)		Diabetes gestacional (15)
Edad (años)		24,2 (3,7)	24,6 (3,5)	0,78
Índice de masa corporal pre-embarazo (kg/m <sup>2</sup> )		19,6 (3,4)	20,9 (3,2)	0,32
Porcentaje de cambio de peso (%)		15,2 (4,9)	14,2 (3,7)	0,54
Presión sanguínea (mm Hg)				
Sistólica		106 (11)	110 (11)	0,38
Diastólica		71 (6)	69 (7)	0,45
Colesterol total (mg/dl)		213 (44)	190 (28)	0,11
Lipoproteína de baja densidad (mg/dl)		120 (41)	104 (30)	0,23
Lipoproteína de alta densidad (mg/dl)		51 (3)	49 (4)	0,11
Mediana (IQR)				
Triglicéridos (mg/dl)		222 (178, 238)	189 (133, 227)	0,36
Glucosa en plasma en ayunas (mg/dl)		80 (77, 85)	84 (79, 90)	0,2
Hemoglobina glucosilada (%)		5,2 (5,0, 5,4)	5,4 (5,1, 5,8)	0,23
Péptido C (ng/ml)		0,9 (0,6, 1,2)	0,7 (0,4, 1,1)	0,25

<sup>1</sup> Pruebas de la t para variables continuas normalmente distribuidas y el equivalente no paramétrico de Wilcoxon para variables con una distribución sesgada. Se usaron pruebas chi cuadrado y exacta de Fisher para variables categóricas.

10 Como se muestra en la tabla 7, a continuación, los niveles de PSG-AAL y fibronectina-SNA estaban cada uno significativamente elevados en el grupo de DMG, como lo estaba la proporción hCG/lactógeno placentario. Mientras se ha descrito que hCG y lactógeno placentario muestran niveles alterados en suero materno de DMG, su proporción era claramente muy discriminante en este conjunto de muestras.

15 **Tabla 7.** Concentración de proteínas y glucosilación por estado de diabetes gestacional

Concentración de proteína	Grupo de estudio		valor p <sup>1</sup>	
	Mediana (IQR)	No diabéticas (14)		Diabetes gestacional (15)
Proteína C reactiva (mg/l)		2,1 (1,0, 4,0)	5,7 (2,2, 9,0)	0,05
SHBG (mg/l)		276 (252, 304)	240 (173, 278)	0,12
Adiponectina (µg/ml)		4,1 (3,3, 5,0)	3,4 (2,3, 5,2)	0,28
Proporción hCG/lactógeno placentario		1,6 (1,0, 2,3)	3,2 (1,6, 4,3)	0,03
PSG-1 (UA)		1,16 (0,96, 1,52)	1,21 (0,80, 1,40)	0,95
Fibronectina (mg/l)		96,0 (78,8, 151,9)	151,5 (55,4, 238,6)	0,33
Glucosilación de proteínas (unidades arbitrarias)				
PSG-AAL		52,5 (46,7, 71,0)	85,7 (69,9, 99,5)	0,004
Fibronectina-SNA		51,0 (45,8, 55,1)	67,0 (53,5, 84,0)	0,006

<sup>1</sup> Prueba de la t no paramétrica de Wilcoxon.

20 Las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) que utilizan fibronectina-SNA y PSG-AAL, así como la combinación se muestran en la **figura 6**. Mientras que la sensibilidad y especificidad de estos dos analitos para detectar DMG es buena, la adición de analitos adicionales en la tabla 7 en un modelo multi-analito (**figura 7**) demostró claramente rendimiento superior, incluso aunque estos analitos mismos no eran significativamente diferencialmente abundantes individualmente en suero materno no diabético frente a DMG.

25 **Ejemplo 11: Inmunoensayo de flujo lateral de fibronectina (FN LFIA)**

30 Se pueden utilizar varios métodos de ensayo de flujo lateral para ensayar la presencia o ausencia o la cantidad de un analito en una muestra biológica. En un ejemplo, un método de ensayo "sándwich" usa un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido, que forma parte de un complejo con un anticuerpo marcado, para determinar la presencia de un analito diana observando la presencia y cantidad de complejo analito-anticuerpo marcado unido. Para los fines de un inmunoensayo de flujo lateral, el marcador puede ser una enzima, microesferas coloreadas, microesferas marcadas con fluorescencia, o puede usar otros métodos de detección similares que proporcionan la detección y/o cuantificación de analito unido a la línea de prueba.

35 Las tiras de prueba de flujo lateral convencionales presentan un soporte sólido sobre el que el área de recepción de la muestra y las zonas de captura de la diana están apoyadas. El material del soporte sólido es uno que es capaz de

soportar el área de recepción de la muestra y las zonas de captura de la diana y proporcionar el flujo por capilaridad de la muestra fuera del área de recepción de la muestra a las zonas de captura de la diana cuando la tira de prueba de flujo lateral se expone a un solvente o tampón apropiado que actúa como un líquido portador para la muestra. Las clases generales de materiales que se pueden usar como soporte incluyen polímeros orgánicos o inorgánicos, y polímeros naturales y sintéticos. Ejemplos más específicos de soportes sólidos adecuados incluyen, sin limitación, fibra de vidrio, celulosa, nailon, dextrano entrecruzado, varios papeles cromatográficos y nitrocelulosa. Un material particularmente útil es nitrocelulosa.

Las **figuras 8A** y **8B** ilustran un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de un inmunoensayo de flujo lateral (**figura 8A**) y un dispositivo de prueba de flujo lateral (**figura 8B**) que se pueden usar según varias formas de realización divulgadas en el presente documento. Brevemente, se inmovilizaron 200 µg/ml de anti-fibronectina de conejo en la membrana como una línea de prueba (0,5 µl/tira) y se inmovilizaron 300 µg/ml de anti-IgG de ratón de cabra como la línea de control de procedimiento (0,5 µl/tira). Se secaron microesferas conjugadas con anti-fibronectina de ratón (10 µl de anti-fibronectina de ratón 150 µg/ml, 1 mg/ml de sólidos) en una almohadilla conjugada que se había tratado con una solución que contenía (por litro): 3,81 g de borato de sodio, 2,0 g de dextrano, 5,0 g de BSA, 1,0 g de Tween-20, y 0,5 g de azida sódica, pH 8,0, seguido por secado durante 1 hora a 50°C.

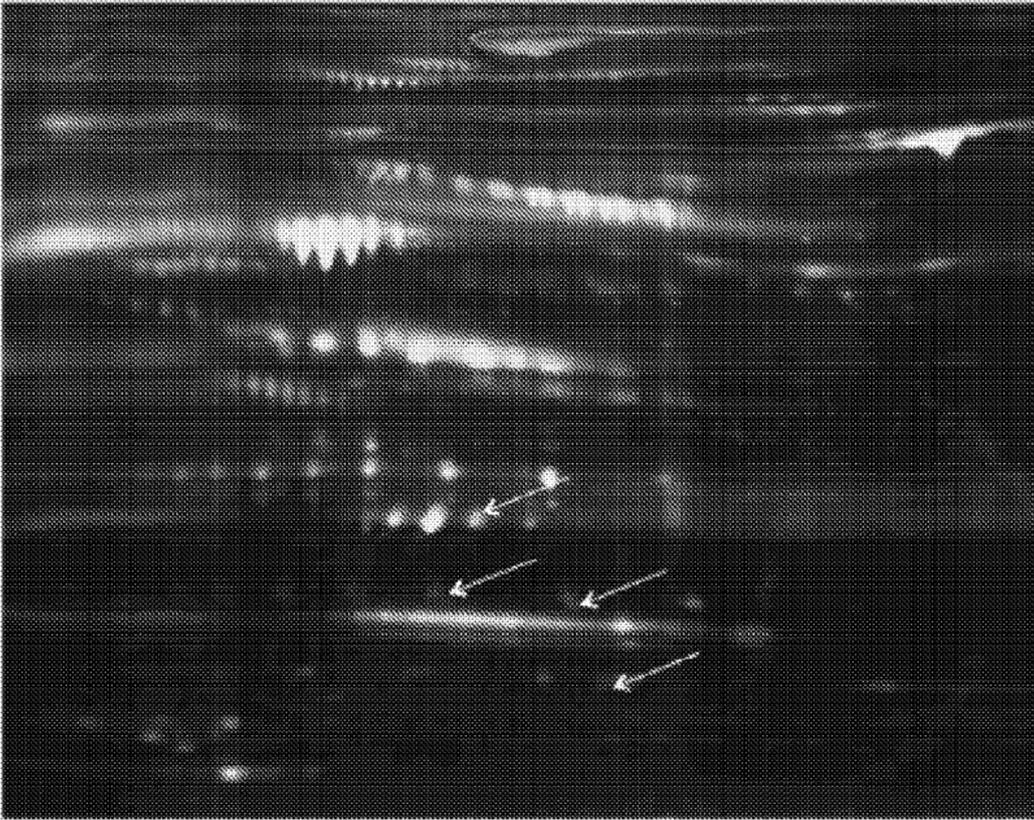
La muestra se diluyó después 1:500 en tampón de carrera HEPES (HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, NaCl 155 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,1%, Tween-20 al 0,75%, y alcohol polivinílico al 0,01%). Cuando la muestra se aplicó a la almohadilla de muestra, el flujo capilar permitió que la muestra que contenía fibronectina se hidratara e interaccionara con las microesferas marcadas, formando complejos fibronectina-microesferas marcadas, que migraron adicionalmente a la línea de prueba, donde fueron capturadas por el anti-fibronectina de conejo.

Después de la terminación de la migración por capilaridad, el dispositivo se examinó, y la cantidad de fibronectina en la muestra se determinó por densitometría cuantitativa relativa a una curva estándar usando fibronectina purificada como estándar. La **figura 9** es un gráfico que ilustra una comparación de los resultados de un ELISA de fibronectina con los resultados de la prueba de FN-LFIA descrita anteriormente. Como se puede ver en la **figura 9**, los resultados de las dos pruebas se corresponden entre sí bastante estrechamente, lo que indica que la prueba de FN-LFIA es sensible y precisa.

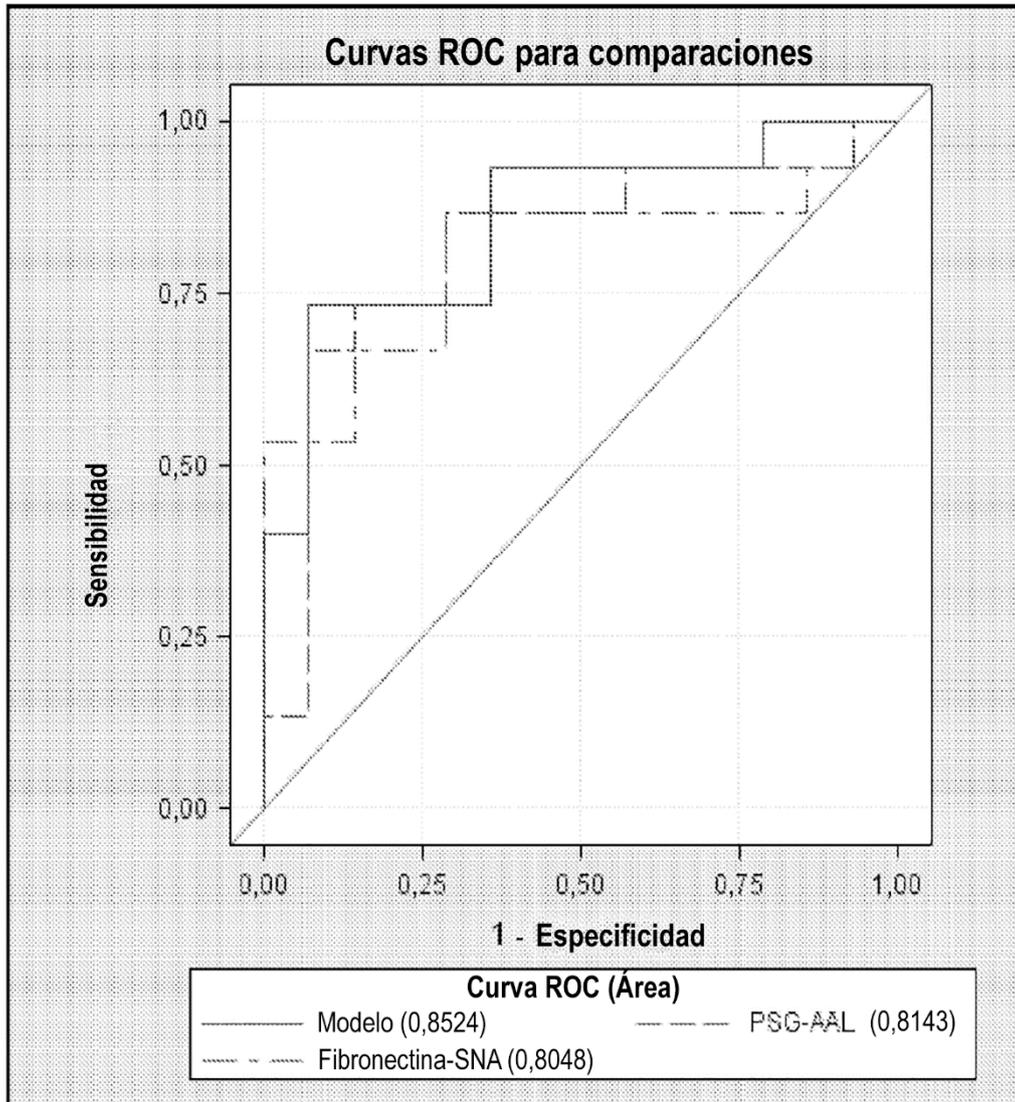
Aunque se han ilustrado y descrito ciertas formas de realización en el presente documento, los expertos en la materia apreciarán que una amplia variedad de formas de realización alternativas y/o equivalentes o implementaciones calculadas para lograr los mismos fines se pueden sustituir por las formas de realización mostradas y descritas. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que las formas de realización se pueden implementar en una amplia variedad de maneras. Se pretende que esta solicitud cubra cualquier adaptación o variación de las formas de realización discutidas en el presente documento. Por tanto, se pretende manifiestamente que las formas de realización estén limitadas solo por las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

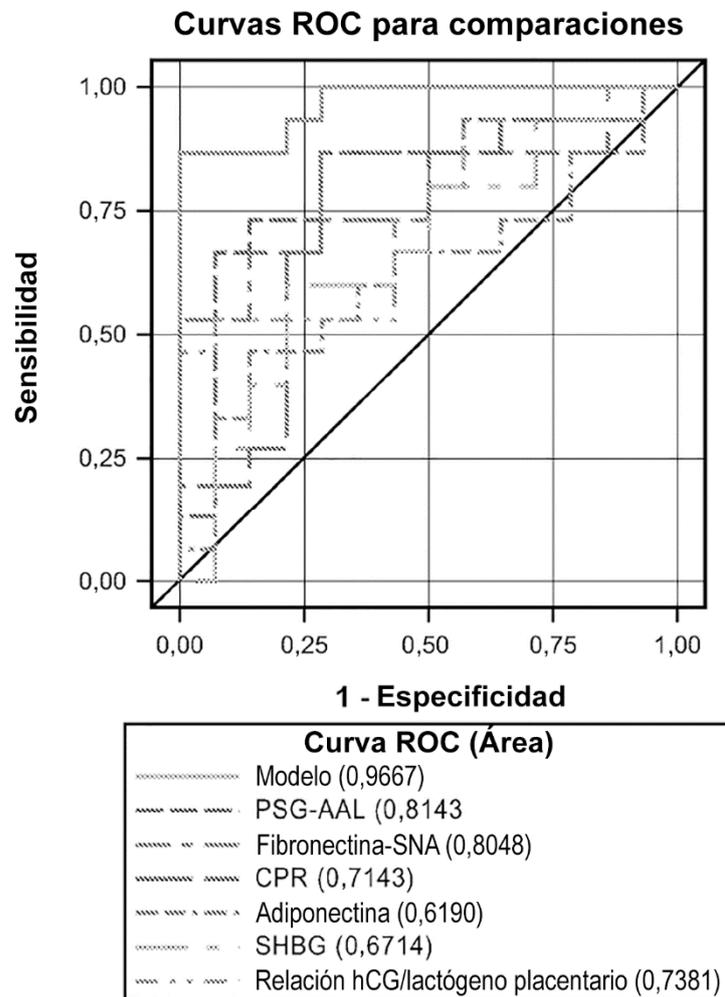
1. Un método in vitro para detectar diabetes gestacional, que comprende:  
5 medir un nivel de fibronectina glucosilada en una muestra de un sujeto embarazada; y determinar si el nivel de fibronectina glucosilada está elevado en la muestra relativo a un control.
2. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde el método además comprende:  
10 medir el nivel de glucoproteína específica de embarazo 1 (PSG-1) glucosilada en la muestra; y determinar si el nivel de PSG-1 glucosilada está elevado en la muestra relativa a un control.
3. El método in vitro de la reivindicación 1 o 2, en donde medir el nivel de fibronectina glucosilada en la muestra comprende detectar fibronectina glucosilada usando lectina de Sambucas Nigra (SNA).  
15
4. El método in vitro de la reivindicación 2, en donde medir el nivel de PSG-1 glucosilada en la muestra comprende detectar PSG-1 glucosilada usando lectina de Aleuria Aurantia (AAL).
5. El método in vitro de la reivindicación 2 o 4, en donde el método comprende además medir una o más de:  
20 adiponectina, globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), proteína C reactiva (CRP), una proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario, o una combinación de las mismas en la muestra.
6. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el control comprende un valor  
25 de referencia, tal como una muestra de referencia control de un sujeto que no tiene diabetes gestacional.
7. El método in vitro de una de las reivindicaciones 2, 4 o 5, en donde el método comprende además determinar si un nivel de proteína C reactiva (CRP), y/o una proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario está elevado en la muestra relativo a un control y/o determinar si  
30 adiponectina y/o globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) están disminuidas en la muestra relativo a un control.
8. El método in vitro de una de las reivindicaciones 2, 4, 5 o 7, en donde un aumento relativo al control en el nivel de fibronectina glucosilada y/o el nivel de PSG-1 glucosilada en la muestra indica que el sujeto tiene  
35 diabetes gestacional.
9. El método in vitro de una de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7, o 8, en donde un aumento relativo al control en el nivel de proteína C reactiva (CRP), y/o una proporción de gonadotropina coriónica humana (hCG) respecto a lactógeno placentario, tal como al menos un aumento del 10%, o una disminución relativa al control en el nivel  
40 de adiponectina y/o globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), tal como una disminución del 10%, indica que el sujeto tiene diabetes gestacional.
10. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra de prueba  
45 comprende suero.
11. El método in vitro de una de las reivindicaciones 2, 4, 5, 7, 8, o 9, en donde el nivel de fibronectina glucosilada y/o el nivel de PSG-1 glucosilada en la muestra se determina usando un ensayo ELISA o un dispositivo de flujo lateral.



**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

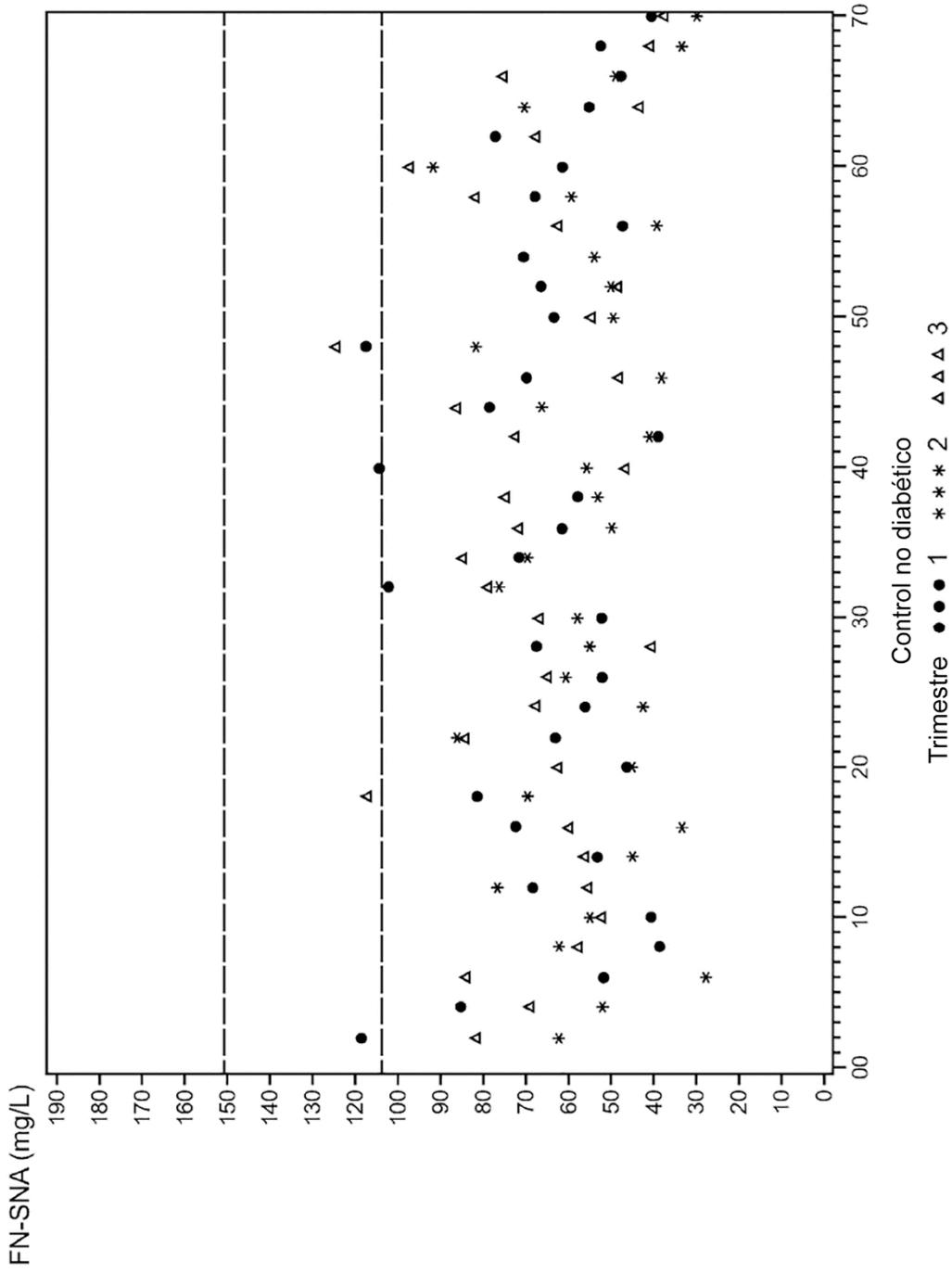
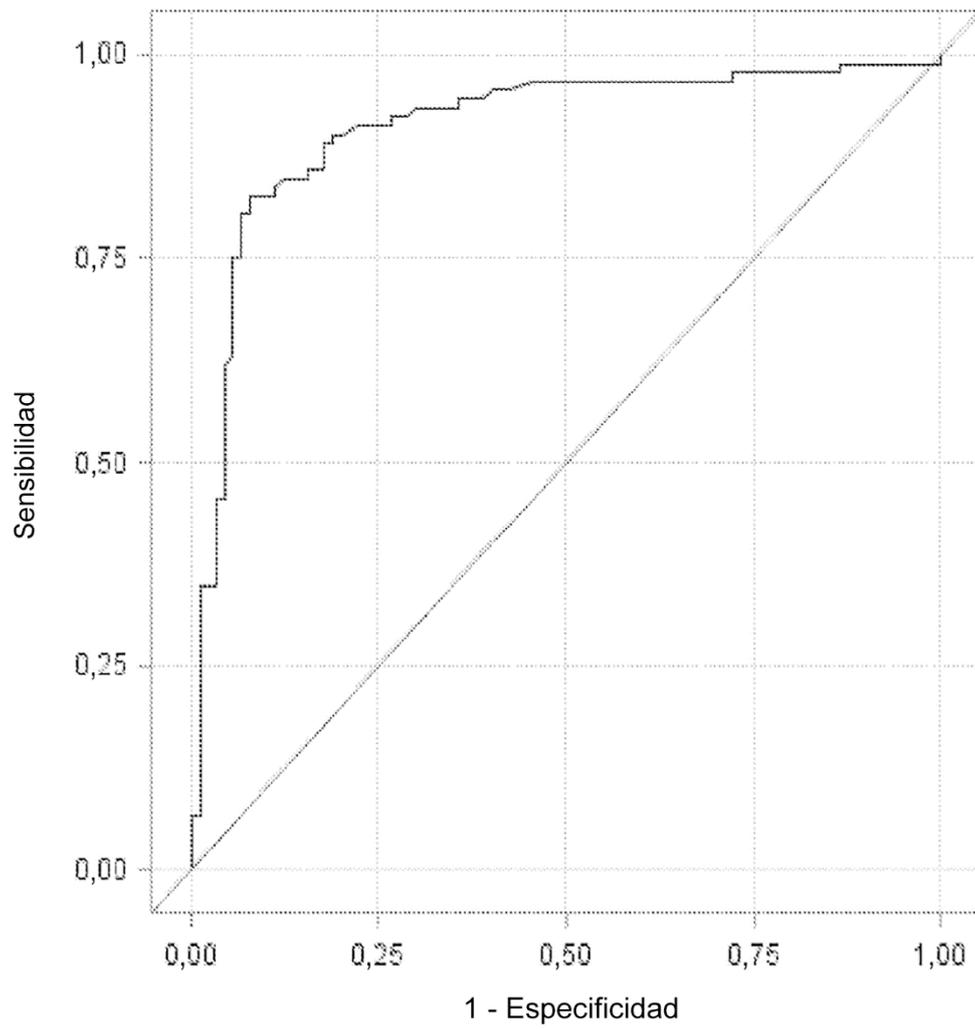
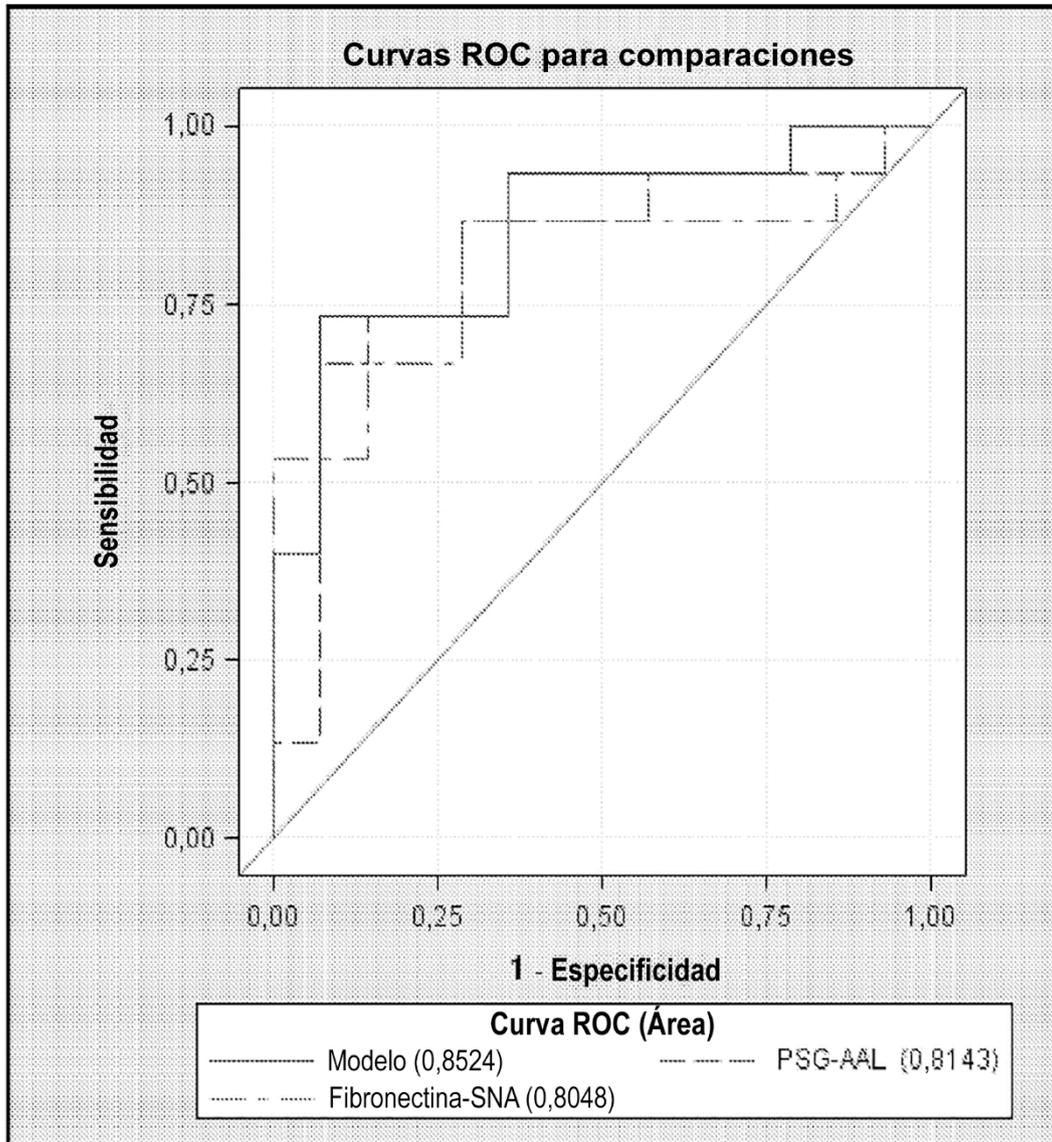


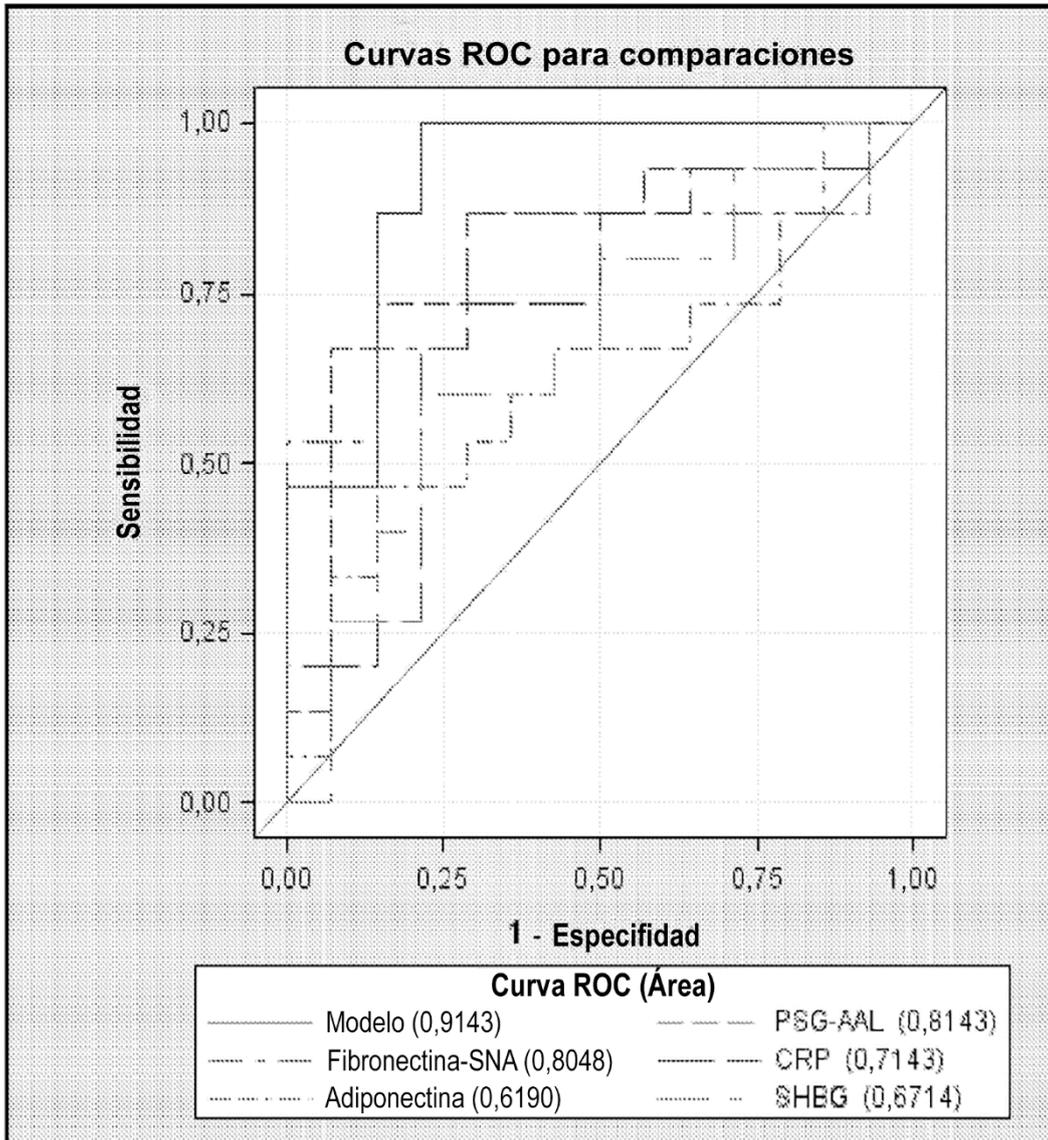
Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

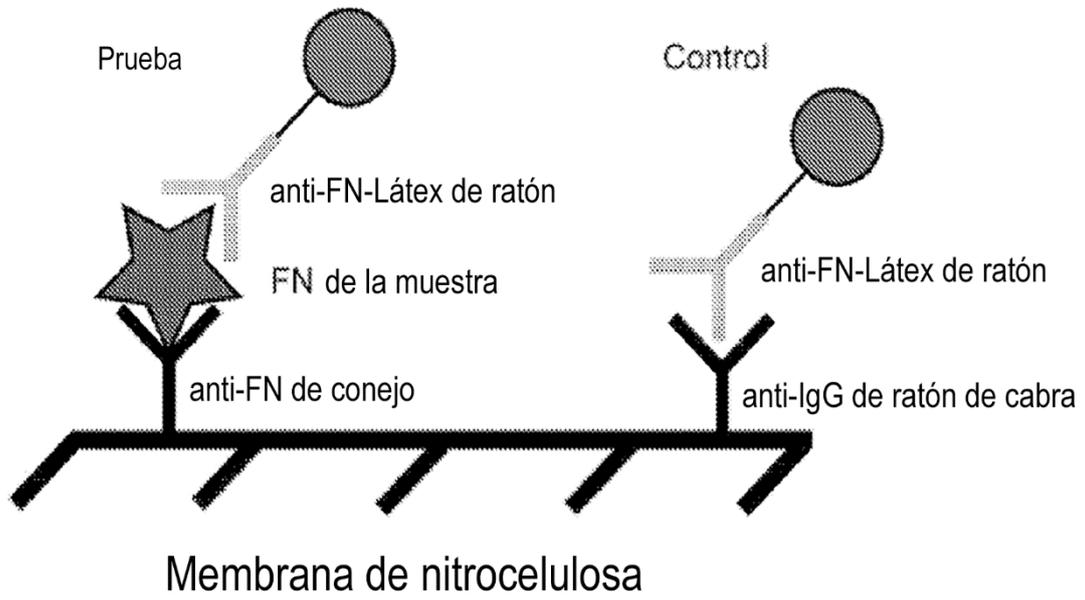
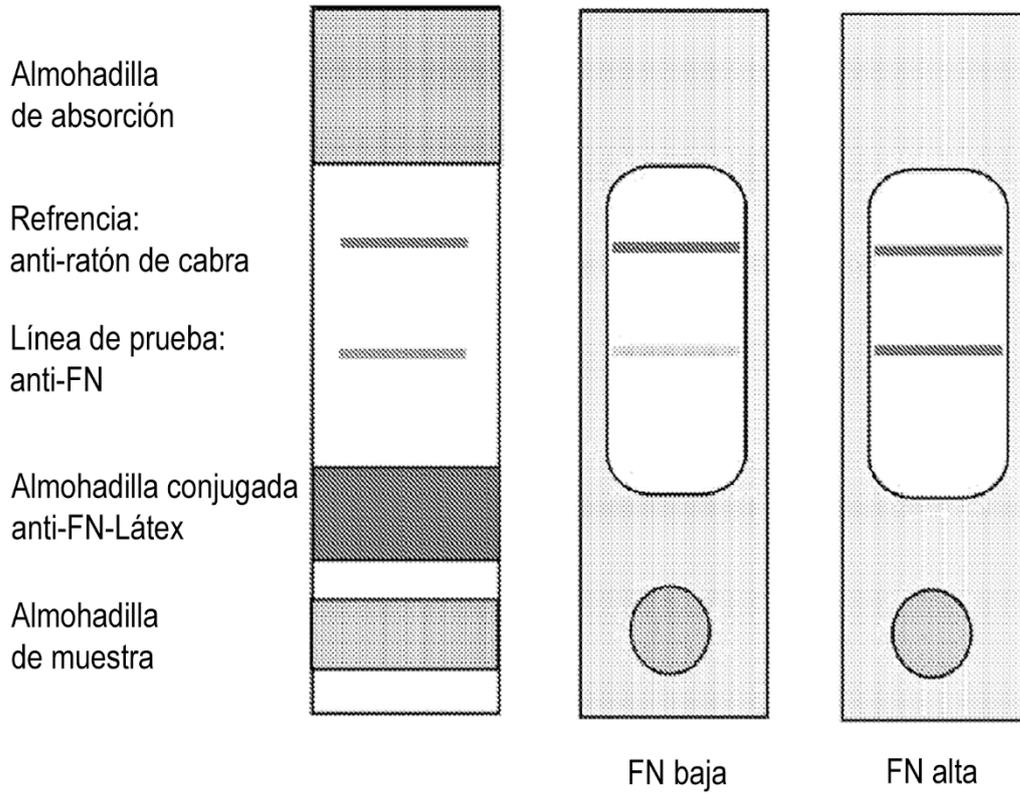
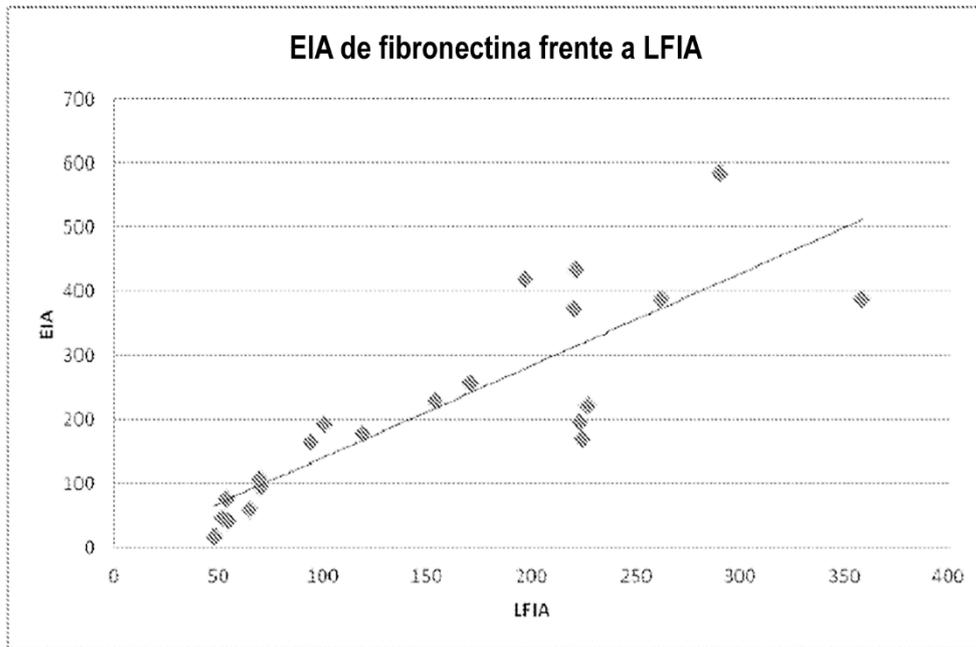


Figura 8A



**Figura 8B**



**Figura 9**