

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 145**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13171544 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2706360**

54 Título: **Método y kit para mejorar el manejo de diabetes al determinar metilglioxal hidroimidazolona (MGH1)**

30 Prioridad:

11.06.2012 US 201261658218 P

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

07.03.2019

73 Titular/es:

**PREVENTAGE HEALTHCARE, LLC (100.0%)
3 Diana Court
Hanover, NH 03755, US**

72 Inventor/es:

BEISSWENGER, PAUL J

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 703 145 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

Método y kit para mejorar el manejo de diabetes al determinar metilgloxal hidroimidazolona (MGH1)

5 La invención abarca métodos para monitorizar o determinar el riesgo de nefropatía diabética.

10 La diabetes mellitus (DM) afecta a más de 25.8 millones de personas solo en los Estados Unidos, es decir, el 8.3% de la población. Alrededor de 1.9 millones de personas de 20 años o más fueron diagnosticadas recientemente con diabetes en 2010. Se estima que 79 millones de personas de 20 años o más tienen prediabetes, lo que constituye el 5% de los adultos de 20 años o más y el 50% de los adultos de 65 años o más. Centro Nacional de Información sobre la Diabetes, Estadísticas Nacionales de Diabetes, 2011.

15 Gran parte de la morbilidad y el coste del manejo de la diabetes se pueden atribuir a complicaciones relacionadas con la diabetes a largo plazo. Por ejemplo, la diabetes es la causa principal de insuficiencia renal, amputaciones no traumáticas de las extremidades inferiores y nuevos casos de ceguera entre los adultos. La diabetes también es una causa importante de enfermedad cardíaca y apoplejía. Después de ajustar las diferencias de edad y sexo de la población, los gastos médicos promedio entre las personas con diabetes diagnosticada fueron 2.3 veces más altos que los gastos esperados sin diabetes. El coste de la diabetes en 2007 fue de USD\$175 mil millones, que incluye USD\$ 116 mil millones en gastos médicos en exceso y USD\$ 58 mil millones en productividad nacional reducida. Dall, et al., *Diabetes Care*, 31 (3): 596-615 (2008). Con base en la incidencia actual de diabetes y datos demográficos, se ha proyectado que la cantidad de estadounidenses con retinopatía diabética se triplicará a 16 millones para 2050, y la principal causa de la dramática expansión de las tasas de enfermedad renal en etapa terminal en este país se debe a nuevos casos de nefropatía diabética. Las personas con diabetes también tienen un aumento dramático en el riesgo de ataque cardíaco y apoplejía. Fue principalmente el tratamiento de estas complicaciones devastadoras lo que llevó el coste del cuidado de la diabetes a USD\$ 245 mil millones en 2012, un aumento del 45% desde 2007. La elevación crónica del nivel de glucosa en la sangre asociado con la DM conduce al daño de los vasos sanguíneos. Los problemas resultantes se agrupan bajo "enfermedad microvascular" (debido al daño a los vasos sanguíneos pequeños) y "enfermedad macrovascular" (debido al daño a las arterias). El daño a los vasos sanguíneos pequeños conduce a una microangiopatía, que puede provocar retinopatía diabética y/o nefropatía diabética. Las complicaciones microvasculares, que incluyen la retinopatía y la nefropatía, representan la morbilidad más frecuente y grave asociada con la diabetes y están implicadas en la mediación del aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular y cerebrovascular. La diabetes también es la causa principal de insuficiencia renal y enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) en los EE.UU. y en el mundo occidental. Aunque las complicaciones microvasculares de la diabetes están claramente asociadas con el grado de hiperglicemia, no todos los individuos diabéticos con un control glicémico deficiente desarrollan complicaciones renales o retinianas avanzadas. A la inversa, algunos pacientes diabéticos desarrollan complicaciones graves a pesar de las concentraciones de glucosa en sangre bien controladas.

40 Es preocupante que no se hayan identificado prácticamente nuevos biomarcadores para la detección temprana de complicaciones diabéticas en los últimos 20-30 años, y los biomarcadores actuales para identificar este subgrupo de "alto riesgo" continúan teniendo limitaciones significativas. Un primer signo de daño renal es la presencia de proteínas en la orina (micro o macroalbuminuria) que se pueden evaluar mediante una prueba de laboratorio clínico o la última con una simple prueba de barra de inmersión. La prueba más común utilizada hasta la fecha sigue siendo la creatinina en suero, a la vez que se reconoce la precisión faltante. Una limitación de las pruebas que se basan en la microalbuminuria, que ocurre cuando el daño renal ya está en su lugar, es que solo es útil para detectar nefropatía diabética en la etapa asintomática. Las pruebas diagnósticas o predictivas tempranas podrían revolucionar el manejo de la diabetes, ya que se podrían establecer estrategias de tratamiento para prevenir o retrasar la nefropatía diabética eventual.

50 La Patente de Estados Unidos No. 6,323,038 divulga un compuesto de piridinio como un reactivo de diagnóstico para detectar complicaciones asociadas con diabetes o insuficiencia renal. La publicación de Estados Unidos número 2011/0079077 divulga proteínas de orina y suero y sus fragmentos, que solo o en combinación se pueden utilizar para diagnosticar la nefropatía diabética en estadio temprano. Los biomarcadores actuales (es decir, medidas de hiperglicemia) para identificar este subgrupo de "alto riesgo" tienen limitaciones significativas. La Prueba de Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT) mostró que la HbA_{1c} (A1C) sola (es decir, los niveles de hemoglobina glicosilada) no determina completamente el riesgo de resultados. (Beisswenger, et al., *Diabetes*, 54: 3274-3281 (2005)). El "Estudio de la historia natural de la nefropatía diabética" ha mostrado que solo el 9% del riesgo de engrosamiento progresivo de la membrana basal glomerular (GBM) en la diabetes tipo 1 se representa por el nivel A1C de valor de referencia. Los biomarcadores para la progresión de la retinopatía diabética (DR) y la nefropatía diabética (DN), que incluyen los cambios morfológicos retinianos o la aparición de albuminuria en los exámenes regulares, no pueden identificar a aquellos que tienen mayor riesgo durante la "fase silenciosa" prolongada de 10 a 20 años cuando el daño evolutivo o incipiente en el riñón, ojos y sistema CV no es clínicamente aparente (Nathan, et al, *New England Journal of Medicine*, 353 (25): p. 2643-53 (2005)). En el momento en que estos marcadores se vuelven positivos, la pérdida sustancial de pericitos y capilares avasculares están frecuentemente presentes en la retina (Ahmed, et al., *Biochem Soc Trans*, 31 (Pt 6): 1417-22 (2003), mientras que un daño irreversible sustancial en el riñón puede estar presente en el momento en que se produce la

microalbuminuria (Nathan, et al., *New England Journal of Medicine*, 353 (25): 2643-53 (2005)). También se reconoce ampliamente que la enfermedad CV puede permanecer silenciosa durante muchos años. a pesar de la acumulación gradual de lesiones graves y potencialmente mortales (Mauer, et al., *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 3: 262-269 (2002); Almuti, et al., *Int. J. of Cardiol.*, 109 (1): 7-15 (2006)). Adicionalmente, el tratamiento más agresivo para el DN con inhibidores de Ace (ACEI) y los bloqueadores de los receptores de angiotensina (BRA) instituidos cuando se detecta albuminuria, es incapaz de ralentizar la progresión de lesiones glomerulares estructurales, como lo muestra el RASS (Koschinsky, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (12): 6474-6479 (1997)), lo que sugiere que la prevención en un individuo altamente susceptible es un enfoque muy superior.

Como resultado de la incapacidad de predecir adecuadamente el riesgo de un paciente diabético de desarrollar complicaciones relacionadas con la diabetes, las decisiones actuales sobre el tratamiento clínico se basan en la premisa de que todos los pacientes diabéticos son igualmente susceptibles a complicaciones. Sin embargo, este enfoque es limitado, ya que solo el 50% de los pacientes con diabetes tipo 2 alcanzan la meta recomendada de tratamiento con A1C de <7% en un gran estudio de población (NHANES) (DCCT/EDIC, *JAMA*, 287 (19): 2563 -9 (2002)), y las tasas de éxito son incluso más bajas en la diabetes tipo 1 (Nathan, et al., *Diabetes Care*, 31 (1): 173-5 (2008); Holman, et al., *New England Journal of Medicine*, 359 (15): 1577-89 (2008)). Las razones de este fracaso a gran escala incluyen la falta de información predictiva específica para el paciente, las tasas abrumadoras de diabetes recién descubiertas, el gasto masivo de brindar atención adecuada, la falta de proveedores médicos suficientes y adecuadamente capacitados y la negación por parte del paciente de las posibles consecuencias de un cumplimiento de tratamiento deficiente que resulta de su falta de información predictiva individualizada y precisa sobre el riesgo. Los tratamientos para diabetes no solo son costosos, sino que algunos están acompañados por un alto riesgo de hipoglucemia y efectos secundarios de los fármacos, así como el gasto y el riesgo de nuevos tratamientos como los trasplantes de páncreas y el páncreas artificial en evolución. Con base en estas consideraciones, será cada vez más difícil aplicar estas terapias a todos los pacientes con diabetes, sin tener una mejor información sobre el riesgo y beneficio individual.

Se han propuesto los productos finales de la glicosilación avanzada (AGE) y los productos de oxidación (OP) como posibles factores para las complicaciones diabéticas. Hasta hace poco, sin embargo, el conocimiento de estos productos se ha limitado a los productos de glicación temprana (EGP), varios productos finales de oxidación y algunos AGE. La mayoría de los estudios anteriores han medido cantidades limitadas de AGE (Yu, et al. *Diabetologia*, 49(10):2488-98 (2006); Monnier, et al., *Annals of the New York Academy of Sciences*, (2008); (Beisswenger, et al., *Journal of Clinical Investigation*, 92(1):212-7 (1993); Dyer, et al., *J. Clin. Invest.*, 91(6): 2463-9 (1993); Monnier, et al., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043:567-581 (2005)), en particular pentosidina y carboximetil-lisina, o se han centrado en unos pocos productos finales que reflejan el estrés oxidativo (Yu, et al. *Diabetologia*, 49 (10): 2488-98 (2006); Baynes, et al., *Free Radical Biology & Medicine.*, 28 (12): 1708-16 (2000)). También se han realizado un número sustancial de estos análisis como inmunoensayos semicuantitativos, que generalmente no han sido validados contra análisis químicos cuantitativos. Aunque algunos de estos estudios han mostrado correlaciones entre los niveles en sangre de estos productos y las complicaciones (Monnier, et al., *Annals of New York Academy of Sciences*, 1043: 567-581 (2005)), ninguno ha validado su valor predictivo en estudios de resultados de diabetes controlados a gran escala. Un estudio reciente de Perkins, et al., *PLoS One*, 7 (4): 335655 (2012), que mide los niveles de AGE y marcadores oxidativos en LC/MS/MS, concluyó que no había correlación entre ninguno de los residuos de aducto de daño proteico de la proteína en plasma ni la concentración de aducto libre relacionado con la tasa de filtrado glomerular (GFR) temprana subsiguiente que conduce a una enfermedad renal en etapa terminal.

Es deseable identificar biomarcadores que se puedan utilizar para predecir el riesgo de que un paciente desarrolle una enfermedad renal relacionada con la diabetes antes de que el paciente presente signos y/o marcadores conocidos de enfermedad o mal funcionamiento renal.

Se divulgan biomarcadores útiles para determinar el riesgo de que un sujeto diabético desarrolle enfermedad renal.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un método, como se define en las reivindicaciones, para identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar enfermedad renal relacionada con la diabetes.

Se divulga un método para identificar el riesgo de diabetes en enfermedades de los ojos o cardiovasculares.

Resumen de la invención

Se ha desarrollado un método para determinar los niveles de biomarcadores, específicamente, productos finales de glicación avanzada (AGEs) y productos de oxidación (OPs) en una muestra biológica, preferiblemente plasma o ultrafiltrado de plasma, o una muestra de orina. El método es útil para detectar los niveles de biomarcadores tales como Nε-carboxi metil-lisina (CML); Nε-carboxi etil-lisina (CEL); Glioxal hidroimidazolona (GH1); Metilglioxal hidroimidazolona (MGH1); 3-Desoxiglucosona hidroimidazolona (3DGH); sulfóxido de metionina (MetSO); y 3-nitrotirosina (3-NT), ditirosina, y ácido 2-aminoadípico. El método de preparación de las muestras es importante. Los niveles de biomarcador en la muestra preferiblemente se determinan mediante Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas de Cuadrupolo Triple (LC-MS/MS). En una realización preferida para medir

biomarcadores que utilizan LC-MS/MS, la fase estacionaria es C18 con ácido heptafluorobutírico que se utiliza como un agente de emparejamiento de iones. Esto permite que el análisis se realice con una sola columna relativa en lugar de 2 columnas opuestas.

5 También se ha desarrollado un método para determinar un sujeto en riesgo de desarrollar DN o un trastorno asociado con DN. El método incluye obtener una muestra de prueba de un sujeto diagnosticado con diabetes, medir los niveles de Nε-(1-carboxietil-lisina (CEL), hidroimidazolona derivada de metilglioxil (MGHI) y Nε-carboximetil-lisina (CML) y comparar los valores con los niveles de metabolitos mostrados por estar asociados con ya sea la progresión o no progresión de nefropatía diabética.

10 También se proporciona un método de cuidado diabético que incluye determinar un riesgo de que un paciente diabético desarrolle enfermedad renal relacionada con la diabetes y ajustar el régimen de tratamiento del paciente para incluir, además de agentes de reducción de glucosa, tratamientos adicionales tales como medicamentos que modifican el sistema de renina-angiotensina, o dietas especializadas con bajos niveles de AGEs o productos oxidativos, para retardar o reducir la gravedad de la enfermedad del riñón, ojo o cardiovascular.

15 Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra las estructuras químicas de los biomarcadores. FL = Nε-Fructosil-lisina; CML = Nε-carboxi metil-lisina; CEL = Nε-carboxi etil-lisina; G-H1 = glioxal hidroimidazolona; MG-H1 = Metilglioxal hidroimidazolona; 3DGH = 3-Desoxiglucosona Hidroimidazolona; MetSO = sulfóxido de metionina; 3-NT = 3-nitrotirosina.

25 Figuras 2A-2D. Se utilizó un modelo de regresión logística para desarrollar ecuaciones predictivas que relacionan cada biomarcador con la probabilidad de la clasificación de un sujeto como una progresión "rápida" (FP) de DN. Los valores de CML y MGHI se transformaron logarítmicamente cuando se utilizaron como predictores y luego se transformaron nuevamente al crear gráficos de probabilidad predictiva. Para los 3 biomarcadores, pero no para la HbA_{1c} (p = 0.28) medida al mismo tiempo, hubo una relación significativa con la probabilidad de clasificación como FP (CML p = 0.02; CEL p = 0.03; MGHI p = 0.048). Para HbA_{1c}, la relación fue significativa cuando se ajustó a toda la muestra (n = 186) durante 5 años (p = 0.006).

30 La Figura 3 es un diagrama estimado de razones de probabilidades (e intervalos de confianza del 95%) para un cambio de una desviación estándar en los tres biomarcadores informativos (CML, CEL y MGHI), y HbA_{1c}, según se calcula a partir del modelo de regresión logística. Por ejemplo, un aumento de SD en CEL conduciría a un aumento de 1.72 en las probabilidades de estar en el grupo de progresión rápida. Los valores de p para estos gráficos se asocian con aquellos que se muestran en las Figuras 2A-D.

35 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

40 "Un trastorno asociado con nefropatía diabética", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un trastorno que se deriva de la angiopatía de los capilares en los glomérulos renales. Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados pueden incluir el síndrome nefrítico, insuficiencia renal crónica y enfermedad renal terminal.

45 La "nefropatía diabética", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un trastorno caracterizado por angiopatía de los capilares en los glomérulos renales. El término abarca el síndrome de Kimmelstiel-Wilson, glomeruloesclerosis nodular diabética y glomerulonefritis intercapilar.

Los individuos con diabetes tipo I tienen un riesgo de 20-40% de desarrollar enfermedad renal.

50 Los biomarcadores descritos en este documento permiten la identificación de esta población, de tal manera que las personas que están identificadas tienen un 10-50% o un mayor riesgo de desarrollar nefropatía diabética.

II. Método para predecir el riesgo de que un paciente desarrolle nefropatía diabética

A. Marcadores que se van a evaluar

55 Se han identificado productos finales químicos específicos en estudios de resultados cuidadosamente documentados basados en la investigación de la activación de la glicación específica y las rutas oxidativas en poblaciones clínicas con nefropatía y retinopatía documentadas. Estas rutas conducen a la formación de un espectro de productos de glicación temprana (EGP), que incluyen los compuestos α dicarbonílicos químicamente reactivos, metilglioxal (MG), 3-desoxiglucosona (3DG) y glioxal (G). Estos α-dicarbonilos, a su vez, conducen a la formación de reacciones químicas en etapas posteriores para formar productos finales de glicación avanzada (AGE), un proceso que es independiente de la formación de HbA_{1c}. El aumento del estrés oxidativo inducido por la glucosa (OS) también se puede deber a diferencias inherentes en los procesos que controlan los mecanismos oxidativos celulares, que pueden activar directa e independientemente las principales rutas que producen complicaciones diabéticas. Se ha encontrado que tanto el estrés con dicarbonilo como el OS se activan selectivamente en aquellos

propensos a las complicaciones diabéticas, lo que resulta en niveles más altos de subproductos lipídicos y de proteínas glicadas y oxidadas, pero no directamente a cambios en la HbA_{1c}.

Se han desarrollado ensayos para evaluar los niveles en sangre y orina de productos finales seleccionados de glicación y productos finales oxidativos de estas rutas químicas para hacer las mediciones más precisas. Debido a que estos productos finales representan un cambio lento de los productos finales sobre las rutas glicativas y oxidativas, su uso en estudios de resultados clínicos debe ser superior a la medición de los precursores químicos de acción corta que no necesariamente reflejarán una sobreproducción a largo plazo cuando se analicen en una o más muestras de sangre y orina

En estos estudios se encontró que los AGEs in vivo cuantitativamente más altos en la diabetes tipo 1 son hidroimidazolonas (HI) derivadas de residuos de arginina modificados por metilgloxal (MG), 3-deoxiglucosona (3DG) y gloxal, producidos a su vez a partir de sus rutas sintéticas individuales. Otros AGE cuantificables en estos estudios incluyen carboximetilo derivado de gloxal-lisina (CML) y el producto de MG-lisina, carboxietil-lisina (CEL). También se han medido marcadores de oxidación y nitración, que incluyen el sulfóxido de metionina (MetSO), formados por la oxidación de metionina, el ácido 2-aminoadípico formado a partir de residuos de lisina, así como otros marcadores de daño nitrosivo que conducen a la producción de 3-nitrotirosina (3-NT) y ditirosina. Existen diferencias sustanciales entre las poblaciones diabéticas y de control (5 a 15 veces). Los aumentos sin precedentes observados en los AGE y OP en la diabetes, y las diferencias sustanciales observadas entre individuos, indican que estos niveles de biomarcadores, solos o además de HbA_{1c}, tienen el potencial de agudizar notablemente la capacidad de diferenciar a los sujetos con un riesgo muy alto versus muy bajo de complicaciones. Los AGE y OP clave que son más predictivos de complicaciones, que incluyen las hidroimidazolonas y MetSO, no mostraron correlación con la HbA_{1c}, lo que sugiere que se producen por rutas químicas que se relacionan con las complicaciones, pero responden únicamente al nivel de glucemia con base en las características individuales del paciente.

Los biomarcadores de AGE y OP se miden en muestras de plasma y orina para evaluar el riesgo de que una persona desarrolle nefropatía diabética u otras complicaciones. Al comparar los niveles en progresores y no progresores de nefropatía cuidadosamente definidos, los niveles de AGE específicos permiten determinar el riesgo de que un sujeto diabético desarrolle DN relacionado con diabetes o un trastorno asociado con DN. En una realización preferida, los niveles de filtrado en plasma de tres AGE, CML = N ϵ -carboxi metil-lisina; CEL = N ϵ -carboxi etil-lisina; y MG-H1= metilgloxal hidroimidazolona, solos o en combinación con HbA_{1c}, son indicadores de la progresión temprana de DN. Se divulga que solo los niveles de MG-H1 son un predictor independiente del riesgo de que un sujeto desarrolle DN.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para cuantificar los siguientes productos, que se muestran en la Figura 1:

AGEs derivados de arginina: estos biomarcadores incluyen las hidroimidazolonas cuantitativamente importantes (HI); que son AGEs derivados de residuos de arginina modificados por gloxal, MG y 3-DG e incluyen G-H1 (gloxal hidroimidazolona de), MG-H1 (metilgloxal hidroimidazolona) y 3DG-H (3-desoxiglucosona hidroimidazolona), respectivamente.

AGEs derivados de lisina: Otros AGE importantes que se pueden medir son a base de lisina e incluyen N ϵ -carboximetil-lisina derivada de gloxal (CML), y N ϵ -carboxietil-lisina derivada de MG (CEL) (Thornalley, et al., *Biochemical Journal*, 375 (Pt 3): 581-92 (2003)). Otros AGE que se pueden medir incluyen el producto más tradicional, pentosidina, que se mide por HPLC y detección de fluorescencia (Sell, et al., *Diabetes*, 40 (Suppl I): 302A (1991)).

Los marcadores cuantitativos del daño oxidativo a proteínas también se pueden medir e incluyen sulfóxido de metionina (MetSO), formado por la oxidación del grupo sulfhidrilo sobre la metionina (Yu, et al., *Diabetologia*, 49 (10): 2488-98 (2006)). El entrecruzamiento de la tirosina, la ditrosina, así como un marcador ampliamente estudiado del daño oxidativo/de nitración combinado a las proteínas, 3-nitrotirosina (3-NT), también se puede medir (Geibauf, *FEBS Letters*, 389: 136-140 (1996)). Para ampliar la información obtenida sobre la función del estrés oxidativo en el desarrollo de complicaciones diabéticas, también se puede medir otro producto oxidativo único, el ácido 2-aminoadípico, un producto que resulta de la oxidación catalizada por metales de residuos de lisilo (Sell, *Biochemical J.*, 404 (2): 269-77 (2007)).

Los niveles de creatinina en orina también se pueden determinar para proporcionar una expresión uniforme del contenido de analito en orina de producto/creatinina. Las determinaciones de "fracción libre" en orina y suero permiten el cálculo de las tasas de depuración renal de cada analito.

Los estudios realizados en estudios de resultados de punto de referencia con diabetes tipo 1, también son aplicables a pacientes con diabetes tipo 2. Es bien reconocido que los ensayos clínicos más importantes han mostrado una relación similar significativa entre el control glicémico y la progresión de DN y DR en la diabetes tipo 1 y tipo 2 en DCCT y UKPDS (DCCT/EDIC, *JAMA*, 287 (19): 2563-9 (2002); Holman, et al., *New England Journal of Medicine*, 359 (15): 1577-89 (2008), sugiriendo similitudes en la patogénesis para ambos tipos de diabetes. Estas consideraciones han llevado a la American Diabetes Association (ADA), American Association of Clinical

Endocrinologists (AACE), y European association for the Study of Diabetes (EASD) a recomendar directrices similares de HbA1c para prevenir el DR y el DN en la diabetes tipo 1 y 2 (Nathan, et al., Diabetes Care, 31 (1): 173-5 (2008); Rodbard, et al., Endocrine Practice, 14 (6): 791-5. (2008).

5 B. Recolección de muestras

Los métodos de recolección, almacenamiento y procesamiento de muestras son todos importantes, ya que un manejo inadecuado puede llevar a una oxidación artificial de la muestra. Muchos AGE medidos en muestras de plasma almacenadas son estables durante varios años. Se ha confirmado una estabilidad aceptable al observar niveles similares de analitos, cuando comparamos los niveles en muestras de plasma almacenadas a -80°C durante 10-15 años con aquellos de plasma recién extraído de sujetos diabéticos.

15 Durante la preparación de la muestra, es importante tomar medidas para evitar la formación de artefactos. Por ejemplo, la rápida separación de los glóbulos rojos del plasma a 4°C, el uso de agentes quelantes como el EDTA en la muestra de sangre, la adición de un conservante o un antioxidante tal como el hidroxitolueno butilado (BHT), la congelación inmediata tal como en el hielo seco, y el almacenamiento a - 80°C son ejemplos de etapas que se pueden tomar para minimizar la formación de artefactos.

20 En la realización preferida, las muestras de plasma que se habían recolectado mediante un protocolo cuidadosamente definido, al recolectar en EDTA, hilar inmediatamente para sedimentar glóbulos rojos (RBC), separar el plasma de RBC a 4°C, seguido de congelación inmediata y almacenamiento a largo plazo a -80°C. Utilizando este proceso, los niveles de MetSO estaban en el rango esperado cuando se compararon con las mismas muestras que mostraron OS artificiales en suero. Ninguna de estas modificaciones se observó en muestras de orina que se recolectaron y almacenaron mediante protocolos estándar. Con base en estas observaciones, el plasma es una mejor opción para la medición de OP y AGE en muestras almacenadas, ya que contiene el agente quelante (EDTA) y se hila y se separa inmediatamente de los RBC después de la recolección y se congela instantáneamente. El suero, por otro lado, tiene que someterse a coagulación a temperatura ambiente antes de la separación y el almacenamiento, exponiendo de esta manera las proteínas a la mieloperoxidasa de leucocitos y otras enzimas prooxidantes. El suero tampoco contiene quelantes de metales traza (Fe y Cu), los cuales pueden promover el estrés oxidativo in vitro espontáneo.

35 Se recolecta una muestra de plasma de un sujeto diagnosticado con DM y se determinan los niveles de uno o más de los biomarcadores. La muestra preferida es un ultrafiltrado de plasma. Esta "fracción libre" se puede preparar mediante centrifugación a 4°C a través de filtros microgiro (corte de filtro de 10.000 MW, alícuota de 50 µl). Lo racional para medir esta fracción es porque las células mantienen la calidad y la integridad funcional de las proteínas mediante la degradación y reemplazo de las proteínas dañadas por la oxidación y la glicación (Thornalley, et al., Biochemical Journal, 375 (Pt 3): 581-92 (2003) y Goldberg, et al., Nature, 426 (6968): 895-9 (2003)). Esto ocurre por proteólisis, liberando los aminoácidos oxidados, glicosilados y nitrados como aductos libres, que a su vez se liberan en el plasma sanguíneo y se excretan en la orina (Thornalley, et al., Biochemical Journal, 375 (Pt3): 581- 92 (2003)). Dado que estos aductos libres se liberan en el plasma sanguíneo a medida que se produce la degradación de tejidos de los AGE, los cambios en las concentraciones en plasma reflejan el daño de tejidos en la diabetes, al tiempo que proporcionan nuevos marcadores que indican los efectos dañinos de la hiperglicemia.

45 Los residuos de aductos reaccionan químicamente con y se unen a proteínas en plasma: dado que algunos de los productos son lábiles a los ácidos, los productos químicamente unidos se determinan después de digerir enzimáticos secuenciales exhaustivos utilizando enzimas adecuadas. Los ejemplos de enzimas que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, pepsina, pronasa E, aminopeptidasa y prolidasa. Los métodos para digerir productos químicamente unidos a proteínas en plasma se describen en Ahmed et al., Biochemical Journal, 364 (Pt 1): 1-14 (2002).

50 Los biomarcadores en la orina se miden preferiblemente a partir de un filtrado de orina, preparado por centrifugación a 4°C a través de filtros microgiro (corte de filtro de 10.000 MW). Los métodos para preparar un filtrado de orina se describen, por ejemplo, en Ahmed, et al., Diabetologia, 48: 1590-1603 (2005).

55 Los métodos para la medición cuantitativa concurrente de biomarcadores indicativos de glicación de proteínas, oxidación y daño nitrosante pueden utilizar un sistema tal como el Sistema MS Cuadrupolo Triple 6410 modelo Agilent con sistema de LC de resolución rápida 1200. La HPLC se realiza con un método de columna múltiple anterior modificado, utilizando una sola columna 80A Synergy de 4 micras de 2.0 x 250 mm (Phenomenex, EE.UU.) con una fase móvil de gradiente de metanol/H₂O con ácido heptafluorobutírico al 0.29% para el emparejamiento de iones. Esta metodología tiene un tiempo total de ejecución de 60 min. El método no tiene la sensibilidad para medir con precisión los OP basados en tirosina en muestras de filtrado de plasma

65 Un sistema tal como el sistema de cuadrupolo triple MS de Agilent modelo 6490 con un sistema LC Infinity 1290 para cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) (Wilmington, Delaware) proporciona un aumento de 1000 veces en la sensibilidad analítica sobre nuestro instrumento anterior, y una mejora de cuatro veces en el rendimiento de la muestra.

La metodología de HPLC que utiliza el emparejamiento de iones se puede utilizar para resolver la mezcla compleja de compuestos, pero tiene varios inconvenientes. Los agentes de emparejamiento de iones tienden a provocar dificultades con el rendimiento de la bomba de HPLC y se necesita vigilancia constante y un lavado frecuente de la bomba para que el sistema funcione correctamente. Los sistemas de emparejamiento de iones requieren largos tiempos de reequilibrio, lo que dificulta el diseño de un entorno de alto rendimiento. Los agentes de emparejamiento de iones pueden provocar la supresión de iones y la pérdida potencial de la señal de los compuestos objetivo.

Otra metodología es la cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), que recientemente se ha convertido en una nueva estrategia de separación aceptada. Al igual que en la cromatografía de fase normal, el orden de elución para los compuestos se invierte, ya que los compuestos más hidrófobos se eluyen temprano y los compuestos más hidrófilos se retienen en la columna, lo que brinda varias ventajas, que incluye la retención mejorada de los compuestos hidrófilos presentes en la mezcla de compuestos y selectividad única que puede ayudar a resolver algunos de los picos de coelución previamente. Los tampones utilizados en este sistema son ideales para la detección de MS/MS (fondos bajos y supresión de iones). Cambiar el pH del sistema puede proporcionar un método alternativo para modificar la selectividad del sistema. Las columnas ahora están disponibles en la tecnología de núcleo-cubierta avanzada o en las configuraciones UHPLC, que son muy susceptibles a las aplicaciones de alto rendimiento, que incluye la tecnología de cubierta porosa de Agilent.

Otro sistema son las fases estacionarias C18, que se han modificado para diferentes selectividades y retención mejorada de compuestos polares. La modificación del pH del tampón con algunos de estos sistemas alternativos debería conducir a una mejor retención y diferentes selectividades de compuestos. Algunos ejemplos de esta tecnología incluyen Synergi Polar-RP con un grupo fenilo unido a éter para la retención de compuestos polares sin emparejamiento de iones, o fase de Luna NH₂ para la selectividad polar y una capacidad de intercambio aniónico débil, que se puede utilizar a un pH de tampón más alto para aumentar la retención de compuestos polares.

Las fases estacionarias en modo mixto son muy nuevas para HPLC. Estas columnas combinan C18 y las capacidades de intercambio iónico en una columna. Muchas veces, la capacidad de intercambio de iones puede imitar los efectos de un agente de emparejamiento de iones. Una columna de modo mixto con capacidad de intercambio de cationes también debería ser útil.

C. Ensayo de biomarcadores y determinación del riesgo de desarrollar DN

En una realización preferida, el nivel de biomarcadores en el plasma y la orina preparados como se discutió anteriormente se determina mediante cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS). Utilizar métodos que involucren condiciones cuidadosamente modificadas, los biomarcadores se pueden medir utilizando la estandarización interna mediante estándares sustituidos con isótopos estables.

Para determinar el número de muestra óptimo requerido para proporcionar una estimación representativa de cada uno de los biomarcadores urinarios y de plasma a lo largo del tiempo, se utilizaron múltiples mediciones para calcular una estimación cuantitativa aceptable de cada analito. A continuación, se realiza un cálculo representativo mediante este enfoque basado en los niveles de pentosidina en orina en 4-6 muestras/sujeto diabético para diez sujetos, durante 5 años. Para estas mediciones, se determinó que entre varianza de la persona = 7.64×10^{-7} y varianza dentro de la persona = 2.06×10^{-6} . Por lo tanto, la varianza total = varianza entre personas + la varianza dentro de la persona = $7.64 \times 10^{-7} + 2.06 \times 10^{-6} = 2.82 \times 10^{-6}$. Para la media de N observaciones de la misma persona, la Varianza de la media sería entonces = entre varianza persona + dentro de varianza de persona/N o $7.64 \times 10^{-7} + 2.06 \times 10^{-6}/N$.

En base a estos cálculos, uno puede determinar si la variación dentro de la persona de la media es menor que el componente entre personas. Como se muestra en la tabla anterior, N = 3 logrará este objetivo ya que $2.06 \times 10^{-6}/3 = 6.87 \times 10^{-7}$, que es menor que la varianza de 1.45×10^{-6} del valor medio (tercera línea en la tabla). Para tamaños de muestra más de cuatro, poco se gana en estos estudios al aumentar el número de análisis, ya que cada observación adicional proporciona <5% de reducción total de un tamaño de muestra de 1.

Se ha compilado una base de datos de los niveles de los diversos biomarcadores que son indicativos de los pacientes con riesgo de desarrollar enfermedad renal u otras complicaciones. Los niveles no diabéticos son aproximadamente 1/3 a 1/4 de aquellos observados en diabéticos, como se muestra en la Tabla 1. En una realización, los niveles de CEL <0.042 (0.020-0.042), MGHI <0.103 (0.030-0.103) y CML <0.062 (0.033-0.062) indica una probabilidad del 94% de que el individuo esté protegido contra el DN (en el tercil más bajo del cambio).

Los niveles de los tres productos fueron significativamente más altos en los progresores rápidos (cuartil superior del cambio de GBM) en relación con los no progresores. Este análisis se realizó mediante un método de Wilcoxon.

TABLA 1. AGEs como indicadores tempranos de DN

Biomarcador (Todos nM)	Media de FP ± SD	Media de SP ± SD	Valor P (Wilcoxon)
CML	0.088±0022	0.075±0023	0.003
MGHI	0.200±0099	0.165±0127	0.040
CEL	0.058±0015	0.049±0015	0.026

5 El análisis de regresión lineal de cualquier producto o productos frente al engrosamiento progresivo de GBM (progresión de DN) muestra que el cuadrado de la R (coeficiente de correlación), que es una medida del grado de predicción para cada biomarcador, fue mayor para los tres biomarcadores con Hbg A1c en relación con Hbg A1c solo. Por ejemplo, en la Tabla 2, HbA1c representa el 4.7% del valor predictivo (0.047), CML 0.026%, etc. La suma de los tres biomarcadores más A1c fue de 11.6%. El valor de medir un biomarcador una vez es aditivo a A1c.

TABLA 2. Regresión lineal de AGEs como indicadores tempranos de DN

Variables en el Modelo de Regresión	% de la variación explicada (r-cuadrado)	
	GBM	MES
CEL	0.026	0.002
CML	0.026	0.01
MGH1	0.006	0.005
HbA1c	0.047	0.027
A1c + CEL	0.073	0.029
A1c + CML	0.065	0.034
A1c + MGH1	0.051	0.031
A1c + CEL, CML, MGH1	0.116	0.052

10 El otro tipo de análisis es el análisis de regresión logística que permite calcular una razón de probabilidad. Esto permite predecir el aumento del riesgo de progresión a dN de forma lineal en relación con el nivel de cada producto. Esta es probablemente la más cercana a la predicción cuantitativa de riesgo y, como se describe en este documento, predice un riesgo de 10 a 50%.

15 El tercil inferior de los valores para los tres biomarcadores mostró que para CEL <0.042 (0.020-0.042), MGHI <0.103 (0.030-0.103) y CML <0.062 (0.033-0.062), hubo un 94% de probabilidad de que el individuo esté protegido de DN (en el tercil más bajo del cambio).

20 Cada uno de los tres biomarcadores predice individualmente la progresión a DN en combinación con HbA1c, y la suma del aumento del poder predictivo del cambio renal (aumento del ancho de GMB) se incrementa de 4.7% para una medición de A1c a 11.6% para los tres biomarcadores. Esto representa un aumento del 7.9%, que es 2.5 veces o 247% mayor que A1c solo.

25 Los análisis realizados por regresión logística muestran las probabilidades de progresión de DN (eje y) en relación con los niveles de los 3 biomarcadores (eje X) (Figuras 2B-D), HbA1c relativa (Figura 2A).

La razón de probabilidades para la progresión de los biomarcadores CEL, MGH1 y CML es de 68 a 92% para cada desviación estándar de cambio que se proporciona en la Tabla 3, a continuación.

30 TABLA 3. Razones de probabilidades para la predicción de progresión rápida de DN por A_{1c} o AGE

Biomarcador	Razón de probabilidades	95% de Intervalo de confianza	Valor de 1 Cambio de SD
HbA1C	1.29	(0.82, 2.02)	1.74
CML (log)	1.95	(1.14, 3.35)	0.0157
CEL	1.72	(1.06, 2.77)	0.303
MGH1 (log)	1.68	(1.004, 2.81)	0.561

35 Se obtuvieron diez estándares AGE y OP con isótopos pesados estables nativos e internos a partir de fuentes disponibles comercialmente, o mediante síntesis personalizada, para crear una base de datos. Los estándares disponibles comercialmente incluyen carboximetil lisina (CML), carboxietil lisina (CEL), glioxal-hidroimidazolona (G-HI), metilglioxal hidroimidazolona (MG-HI) y 3-desoxiglucosona hidroimidazolona (3DG-H). Los productos finales oxidativos (OP) incluyen el sulfóxido de metionina (MetSO), 3-nitrotirosina (3-NT), ácido 2-aminoadípico (AAA) y ditrosina.

40 Estas pruebas diagnósticas de precisión evalúan el riesgo de que un paciente diabético individual desarrolle complicaciones específicas asociadas con su enfermedad. Estas pruebas de diagnóstico de precisión se realizan preferiblemente sobre muestras de sangre enviadas a un laboratorio clínico central. Las pruebas identifican la presencia y la cantidad de 10 biomoléculas de AGE y OP (biomarcadores). Se construye un perfil de riesgo para el desarrollo de complicaciones diabéticas, con base en una comparación con datos obtenidos de individuos sin enfermedad, así como en varias etapas confirmadas de la enfermedad. Esta información se envía al médico que realiza el pedido para brindar una mejor atención al ajustar específicamente de los tratamientos al perfil de un

paciente individual. Al centrarse cada vez más en los planes de tratamiento individualizados y rentables para los pacientes, el acceso a esta información se vuelve cada vez más valioso y necesario en el mercado.

III. Método de atención diabética

5 Los métodos descritos en el presente documento permiten la selección de regímenes terapéuticos apropiados para el riesgo y el coste para los individuos diabéticos para lograr niveles apropiados de control glicémico y retardar o prevenir las complicaciones asociadas de DN.

10 Estos biomarcadores tienen más de tres veces el valor predictivo para las complicaciones renales del "estándar de oro" actual, la hemoglobina A1C. Existe una fuerte evidencia científica de que estos y otros biomarcadores identificados podrían ser predictores tempranos de la propensión a la retinopatía, la enfermedad vascular y el riesgo de ataque cardíaco y apoplejía. Las pruebas de diagnóstico que predicen la progresión temprana de estas complicaciones antes de que los síntomas sean visibles permiten a los médicos y pacientes realizar ajustes individuales en los tratamientos y el comportamiento que podrían mejorar significativamente los resultados. Los resultados mejorados mejorarán las vidas y podrían ahorrar miles de millones de dólares en atención médica anualmente.

20 El paradigma actual para el cuidado de la diabetes es uno de "talla única". Los parámetros se establecen para todos los pacientes y se ofrecen tratamientos especializados agresivos para quienes pueden pagarlos o para quienes ya están experimentando complicaciones importantes. El tratamiento de la diabetes a menudo se realiza con pruebas que brindan información retrospectiva sobre lo que ya sucedió, seguido de tratamientos de "recuperación" para tratar los problemas, en lugar de tratamientos individualizados proactivos para prevenir los que vendrán. Aunque los tratamientos agresivos para la diabetes que se requieren para individuos altamente susceptibles pueden ser rentables a largo plazo, a veces son más caros a corto plazo y es probable que estén acompañados por un mayor riesgo de hipoglicemia y efectos secundarios de los fármacos. Por lo tanto, la identificación temprana de individuos de alto riesgo es necesaria para equilibrar el beneficio potencial contra el aumento del riesgo y el coste de los nuevos agentes farmacológicos y los nuevos tratamientos de alta tecnología que evolucionan. Los ensayos de diagnóstico basados en la glicación/oxidación deberían cambiar significativamente las intervenciones preventivas al permitir la identificación de aquellos con alto o bajo riesgo de complicaciones diabéticas durante las primeras etapas de la diabetes. Se pueden implementar regímenes terapéuticos apropiados de riesgo y coste para alcanzar niveles apropiados de control glicémico. Por ejemplo, aquellos identificados como más susceptibles a las complicaciones podrían tener objetivos más estrictos para el control glicémico de lo que generalmente se logra (A1c <6.0%), al iniciar sistemas de suministro y monitorización de insulina intensivos, trasplantes de páncreas o el páncreas artificial más cerca del inicio de la diabetes. Estos objetivos riesgosos se pueden justificar por la observación de que los individuos con niveles de azúcar en la sangre tan cerca de lo normal, no desarrollan complicaciones diabéticas independientemente de la predisposición genética.

40 También se podría considerar un tratamiento temprano más agresivo de otros factores de riesgo vascular o dietas especializadas con bajos niveles de AGE. Teniendo en cuenta los perfiles de alto riesgo de los individuos detectados con las pruebas, también se pueden justificar diferentes pautas para el riesgo de nuevos agentes terapéuticos. El desarrollo de enfoques terapéuticos que podrían bloquear la ofensiva de rutas químicas tóxicas para retardar o detener las complicaciones también podría ser estimulado por la información proporcionada por estos estudios sobre los mecanismos bioquímicos básicos y las rutas responsables de las complicaciones diabéticas.

45 A estos individuos se les pueden administrar medicamentos que modifican el sistema renina-angiotensina (Mauer, et al., *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 3:262-269 (2002)), se pueden iniciar los niveles de colesterol y VLDL. (Almuti et al., *International Journal of Cardiology*, 109 (1): 7-15 (2006); Degenhardt, et al., *Cellular & Molecular Biology*, 44 (7): 1139-45 (1998); Rosario, et al., *Current Diabetes Reports*, 6 (6): 455-62 (2006)). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden utilizar dietas especializadas con bajos niveles de AGE o productos oxidantes (Koschinsky, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94 (12): 6474-6479 (1997)). La información importante proporcionada por estos estudios sobre los mecanismos bioquímicos básicos y las rutas responsables de las complicaciones diabéticas también podría estimular el desarrollo de enfoques terapéuticos que podrían modificar las rutas químicas tóxicas ofensivas para retardar o detener el DN, la DR y la ECV.

55 Los ejemplos de fármacos que se pueden utilizar para modificar el manejo de la diabetes en función del riesgo de que los sujetos desarrollen DN incluyen, pero no se limitan a, metformina (Beisswenger et al., *Diabetes and Metabolism*, 29: 6S95-6S103 (2003); Beisswenger, et al., *Diabetes*, 48: 198-202 (1999)); Aminoguanidina (Lo, *Amino Acids*, 5:172 (1993); Hirsh, et al., *Carbohydr Res.*, 232: 125-130 (1992); Brownlee, et al., *Diabetes Care*, 15 (12): 1835- 43 (1992); Hammes, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88: 11555-11558 (1991); tiamina y benfotiamina (Hammes, et al., *Nature Med.*, 9 (3): 294- 299 (2003)).

65 Los niveles de biomarcadores de glicación y estrés oxidativo son factores de riesgo para la tasa de desarrollo y progresión a retinopatía diabética avanzada (DR) y nefropatía (DN) a lo largo del tiempo. Los niveles de glicación y biomarcadores del estrés oxidativo también son factores de riesgo para el desarrollo final de la enfermedad cardiovascular (ECV) en la diabetes tipo 1. Los efectos de los biomarcadores bioquímicos de la glicación y la

oxidación sobre los resultados definidos se pueden evaluar utilizando un diseño de caso-cohorte que incluye casos y controles de DR, DN y ECV. Para cada sujeto seleccionado, se emplean muestras de plasma sanguíneo y orina obtenidas en múltiples momentos específicos, por ejemplo, aleatorización DCCT; visita de un año DCCT; cierre DCCT (= valor de referencia EDIC); y EDIC año uno. Esto proporcionará números de muestra y distribución adecuados para ser representativos de cada biomarcador.

Esto puede utilizarse para evaluar los factores de riesgo para la progresión de la enfermedad microvascular y cardiovascular en la diabetes tipo 1. Los tres resultados primarios son el desarrollo de retinopatía avanzada; (retinopatía diabética proliferativa (PDR) detectable a través de la fotografía del fondo o el requisito de fotocoagulación panretinal (láser)), nefropatía; (el desarrollo (macro) albuminuria (> 300 mg de albúmina/24 h) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)); y la ocurrencia de un evento de enfermedad cardiovascular. La tasa de excreción de albúmina se evalúa a partir de una medición cronometrada de cuatro horas de la tasa de excreción de albúmina anualmente durante el DCCT y cada dos años (medio/año) durante el EDIC. El resultado cardiovascular compuesto incluye infarto de miocardio o apoplejía fatal o no fatal, angina isquémica, revascularización o MI silente detectado en un ECG anual.

Un diseño de casos y controles proporciona un método eficiente para probar los objetivos anteriores para cada uno de los tres resultados (definiciones de casos). Sin embargo, una muestra aleatoria simple de controles de entre aquellos que no tienen eventos al final del ensayo estaría sesgada por tener una duración promedio de exposición más larga que la de los casos. Un estudio de casos y controles anidado evita este sesgo mediante el muestreo aleatorio de los controles de aquellos en riesgo en el momento en que se observa cada caso seleccionado. Luego, los datos se analizan utilizando un modelo de regresión condicional estratificado por conjunto de casos y controles, o de manera equivalente, un modelo de riesgos proporcionales de Cox estratificado por igual. Para cada resultado, 125 casos con 250 controles proporcionarán un 85% de potencia para detectar una razón de posibilidades de 1.39 por diferencia de SD en el nivel 0.05 a dos caras. Con tres definiciones de casos separadas, tres subestudios de control de casos anidados separados podrían requerir hasta $3 \times 375 = 1125$ sujetos. Alternativamente, se puede emplear un enfoque de caso-cohorte en el que se selecciona una "sub-cohorte" muestreada aleatoriamente de valor de referencia la cohorte completa para proporcionar una base para los controles para cada definición de caso. La eficiencia (potencia) de este diseño para determinados tamaños de muestra de casos y controles es equivalente a aquella de un estudio anidado de casos y controles del mismo tamaño. Por lo tanto, un diseño de cohorte de casos que produzca aproximadamente 250 controles para cada definición de caso proporcionará un excelente poder para detectar asociaciones significativas de biomarcadores con cada uno de estos resultados.

Se seleccionó aleatoriamente un caso-cohorte de 350 sujetos con una relación de 2: 1 de secundaria a primaria, ya que casi el doble de los casos de cada tipo ocurrieron en las cohortes secundarias que en las primarias. Esto proporcionó algunos casos de DR, DN y CVD. Se seleccionaron casos adicionales de cada tipo de los 1091 sujetos restantes necesarios para obtener por lo menos 125 casos de cada tipo. No fue posible hacerlo exactamente porque algunos sujetos que eran casos según un criterio también eran casos de otro. Luego, para cada definición de caso, se muestrearon unos 250 controles. La tabla proporciona el número de casos y controles dentro de las cohortes primaria y secundaria, y el total que se seleccionó.

TABLA 4: Números de casos y controles con cohortes primarias y secundarias.

	total	primaria	secundaria
CVD	381	159	222
Casos	127	53	74
Control	254	106	148
PDR	375	108	267
Casos	125	27	98
Control	250	81	169
Albuminuria	375	148	227
Casos	125	48	77
Control	250	100	150

Como muchos casos y controles para un resultado son también casos o controles para otro resultado, el estudio total con tres conjuntos de casos y controles comprende un total de solo 546 sujetos, 200 de la cohorte de prevención primaria y 346 de la cohorte de intervención secundaria. Incluye todos los casos de CVD observados en el momento en que se extrajo la muestra y muestras aleatorias de 125 casos de DR y DN observados en ese momento. Para cada una de las tres definiciones de caso, se utilizará una modificación del modelo de riesgos proporcionales de Cox para el muestreo de casos y cohortes para evaluar el riesgo relativo por SD de los biomarcadores en cada momento cuando se agregan individualmente a modelos con y sin las medidas longitudinales correspondientes de HbA_{1c}. Los modelos también se ajustarán según la cohorte primaria/secundaria, la duración de la diabetes al ingresar y el nivel de ingreso de HbA_{1c}. Los modelos se ajustarán utilizando solo los niveles de referencia de un biomarcador y luego también los valores del biomarcador en los tres puntos de tiempo adicionales como una covariable dependiente del tiempo. Este último se utilizará para evaluar si el biomarcador de referencia solo confiere un riesgo adicional independientemente de la HbA_{1c} longitudinal.

Los modelos también se pueden utilizar para evaluar los efectos del conjunto de biomarcadores. Antes de hacerlo, se aplicarán los diagnósticos de colinealidad para asegurar que no haya un grado de dependencia lineal (inter-correlación) que conduzca a una inflación de varianza en las estimaciones. Si es así, dentro de cada grupo de marcadores relacionados, el que tenga los efectos más fuertes se empleará conjuntamente con los de otros grupos.

5 Una prueba de relación de probabilidad evaluará si el conjunto final de biomarcadores contribuye significativamente a un modelo que también contiene los valores de HbA_{1c} longitudinales.

La presente invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

10 Ejemplo 1. La relación entre los niveles en plasma de AGE y OP y la progresión/no progresión de nefropatía

Materiales y métodos

Instrumentación:

15 bomba binaria HPLC-Agilent Serie 1200, inyector automático, desgasificador y cámara de columna termostatzada; QQQ-Agilent 6410.

Materiales:

20 El agua de grado MS y el metanol son de Honeywell.
 Ácido Heptafluorobutírico (HFBA), grado LC, Fisher, (Pierce Chemical) # PI-53104
 Columna HPLC - Gemini-NX 3u C18, 4.6 mm x 250 mm Phenomenex # 00G-4453-E0.

25 Dado que el análisis de 9 biomarcadores propuestos por LC-MS/MS se realiza sobre una sola ejecución, y requiere la adición de estándares internos de isótopos pesados para una cuantificación precisa, los estándares ligeros y pesados requeridos para nueve biomarcadores se obtuvieron de la siguiente manera: Ligero y pesado (N¹⁵) 3DG-HI se obtuvo de Organix en Essex Reino Unido. MG-HI y GHI pesado, fue producido por NeoMPS en Francia. Se sintetizaron sulfóxido de metionina y ditirosina, y se compraron estándares ligeros y pesados de los 5 biomarcadores restantes (Pentosidina, CEL, CML, MGHI y GH) de las fuentes comerciales disponibles. El ácido 2-amino adípico, un producto final derivado de lisina estable que es un excelente indicador del estrés oxidativo, se obtuvo de Sell and Monnier at Case Western Reserve University en Cleveland OH. (Beisswenger, et al., Diabetes, 54: 3274-3281 (2005)). Se requiere la adición de estándares internos de isótopos pesados para una cuantificación precisa ya que el análisis de estos 9 biomarcadores propuestos por LC-MS/MS se realiza en una sola serie.

35 Métodos:

Medición de biomarcadores:

40 Los métodos desarrollados para la medición cuantitativa concurrente de biomarcadores indicativos de la glicosilación de proteínas, la oxidación y el daño nitrosante (Ahmed, et al., Biochemical Journal, 364 (Pt 1): 1-14 (2002) se modificaron al emplear una Columna 80A de 4 micras Synergy de 2.0 x 250 mm (Phenomenex, EE.UU.) con una fase móvil de gradiente de metanol/H₂O con 0.29% de ácido heptafluorobutírico en la HPLC Modelo 1200 Agilent, con un tiempo de análisis total de 60 min sobre un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple Agilent Model 6410 (QQQ), y enfoque no utilizado en la técnica para medir AGE o productos de oxidación.

50 Un cambio importante en este protocolo en relación con los métodos conocidos para medir los AGE es la fase estacionaria completamente diferente utilizada, es decir, C18 (es decir, la columna Synergy de 4 micra 80A). Este cambio de columna dio como resultado el uso de condiciones de fase móvil que difieren de los métodos de la técnica anterior, es decir, el uso de ácido heptafluorobutírico como agente de emparejamiento iónico. La combinación del tipo de columna y la fase móvil también permitió que el análisis de la muestra se realizara con una columna única relativa en lugar de 2 columnas, es decir, las muestras se podrían ejecutar con éxito utilizando una columna; no se requirieron dos columnas.

55 Las condiciones de HPLC y QQQ se muestran a continuación.

Condiciones de HPLC:

Fase móvil: Solvente A = 95% HFBA al 0.29% en agua/5% HFBA al 0.29% en metanol.
 Solvente B = HFBA al 0.29% en metanol. Índice de flujo = 0.25 ml/min

60 Tabla de tiempo de la bomba:

Tiempo	Relación de Solvente B
0	0
3	0
6	13

ES 2 703 145 T3

25	29
35	100
45	100
50	0
70	0

Temperatura de la columna: 28°C

Parámetros de adquisición de QQQ:

5 El Agilent 6410 MS/MS, equipado con una fuente ESI, estaba funcionando en modo positivo bajo las siguientes condiciones: el gas de secado estaba a 350°C con un índice de flujo de 10 L/min.

10 La presión del nebulizador fue de 40 psi y el voltaje capilar se estableció en 4000 para todos los compuestos.

Los parámetros analíticos compuestos detallados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros analíticos de compuestos para espectrometría de masas			
Compuesto ¹	Transición	Fragmentador V	Colisión V
CML (cuantificador) ²	205.1-84.1	100	22
CML (calificador) ²	205.1-130.1	100	8
CML d4 (isótopo) ²	209.1-88.1	100	22
CEL	219.1-84.1	100	22
CEL	219.1-130.1	100	8
CEL d4	223.1-88.1	100	22
MetSO	166.1-74.1	80	7
MetSO	166.1-102.1	80	10
MetSO d3	169.1-74.1	80	7
3-NT	227-181	94	8
3-NT	227-117	94	20
6C ¹³ 3-NT	233- 187	94	8
MG-H1	229-166.1	104	13
MG-H1	229-114	87	12
d3 MG-H1	232.1-169.2	104	13
MG-H2	229-116	87	12
MG-H2	229-114	87	12
d3 MG-H1	232.1- 169.2	104	13
MG-H3	229-114.1	87	12
MG-H3	229-116	87	12
d3 MG-H1	232.1-169.2	104	13
DiTyr	361.1-315.1	100	10
DiTyr	361.1-254.1	100	18
2C ¹³ DiTyr	363.1-316.1	118	12
G-H1	215-152	80	9
G-H1	215-116	80	5
2C ¹³ G-H1	217.2-154.1	104	12
G-H2	215.1-116.1	80	5
G-H2	215.1-100.1	100	10
2C ¹³ G-H1	217.2-154.1	104	12
G-H3	215.1-100.1	100	10
G-H3	215.1-116.1	80	5
2C ¹³ G-H1	217.2-154.1	104	12
3DG-H	319.1-204.2	120	14
3DG-H	319.1-116.1	120	22
6C ¹³ 4N ¹⁵ 3DG-H	329.1-208.1	120	14
AAA	162.2- 98.1	52	12
AAA	162.2-144.2	52	4
d3 AAA	165.2-101.2	55	12
1. El voltaje capilar se estableció en 4000 para todas las transiciones			
2. Las transiciones permanecen en el mismo orden en toda la tabla.			

Tabla 5: Validación del método analítico

Compuesto	Media (nM) ¹	Entre día COV% ¹	LLOD ² (nM)	LLOQ ² (nM)
MethSO	1610	11.2	64	210
AAA	1380	9.6	81	270
CML	110	10.1	10	34
CEL	62	10	8.6	28
3DG-H	450	10.9	40	130
G-H1	22	11.6	3.1	10
MG-H1	303	8.6	5.8	19
3-NT	<LLOQ	-	2.2	7.1
DiTyr	<LLOQ	-	2.9	9.5
1. Calculado a partir de inyecciones repetidas de un filtrado de plasma combinado n = 18				
2. Calculado a partir de la desviación estándar de la respuesta (SD) y la pendiente (S) de las curvas de calibración. LLOD = 3.3 (SD/S) LLOQ = 10 (SD/S) Los valores representan la media de cinco curvas de calibración.				
El valor R ² excede 0.99 para todas las curvas de calibración				

Utilizando la cuantificación del análisis de dilución isotópica de las muestras se logró mediante la lectura de las curvas de calibración derivadas de la respuesta relativa frente a la concentración relativa a la norma pesada. Se agregaron estándares pesados a los filtrados de plasma u orina en concentraciones finales de 1 a 6 uM en concordancia con las concentraciones fisiológicas esperadas y el rango de las curvas estándar.

El orden de elución de los compuestos es el que se muestra en la Tabla 5. Esta tabla también muestra el coeficiente de variación (COV) para mediciones diarias repetidas de los, así como el límite inferior de detección (LLOD) y menor Límite de cuantificación (LLOQ) para cada analito.

Métodos para preparación de la muestra:

Preparación de la muestra de plasma: Todas las muestras utilizadas en este estudio se recolectaron al final de los 5 años del estudio de visita del NHS mediante un riguroso protocolo, en el que se recolectó sangre en tubos que contenían EDTA y se congelaron y centrifugaron inmediatamente. Después de la centrifugación, el plasma se separó inmediatamente de los glóbulos rojos (glóbulos rojos) y se congeló rápidamente en hielo seco, y posteriormente se almacenó a -80°C hasta que se realizaron estos análisis.

Ultrafiltrados (aductos libres): los análisis de LC-MS/MS se realizaron inicialmente sobre la "fracción libre" de plasma, preparada como el filtrado después de la centrifugación a través de filtros Amicon de corte de 10K.

Residuos de aductos unidos químicamente a proteínas en plasma: dado que algunos de los productos son lábiles a los ácidos, los productos químicamente unidos se determinan después de digerir enzimáticos secuenciales exhaustivos con pepsina, pronasa E y aminopeptidasa/prolidasa (50 µg de proteína equivalente) bajo nitrógeno, con los controles para la autólisis de proteasas, como se describe por Ahmed, et al., Biochem J., 364 (Pt 1): 1-14 (2002). Los análisis de AGE/OP se realizaron después de una extensa digestión con plasma secuencial durante 36 horas con 3 enzimas proteolíticas bajo una atmósfera de nitrógeno (Ahmed, et al., Diabetologia, 48: 1590-1603 (2005)) para investigar la fracción "unida" a proteína.

Preparación de la muestra de orina: Para el análisis de los biomarcadores en la orina, se probaron 4 muestras por sujeto distribuidas a lo largo del estudio de NHS de 5 años.

Preparación de muestras de orina para medir la excreción de aductos: Para la determinación del perfil de biomarcadores AGE y OP en orina, se utilizó un filtrado preparado por centrifugación a 4°C a través de filtros microgiro (corte de filtro de 10.000 MW) como lo describe Ahmed, et al., Diabetologia, 48: 1590-1603 (2005) fueron utilizados. Los niveles de creatinina en orina se pueden determinar para proporcionar una expresión uniforme del contenido de analito en orina producto/creatinina.

La LC-MS/MS se realizó sobre las muestras de orina NHS que proporcionaron una población total inicial de 107 sujetos que consistían en progresores (n = 37) y no progresores (n = 70) de nefropatía. Los estudios se completaron (220 (55x4) análisis adicionales) durante un período de 10 semanas, utilizando un rendimiento de 24 muestras por semana. Las pruebas estadísticas se realizaron en la muestra completa (n = 107 sujetos) con un alfa de dos caras = 0.01. Se asumió que la SD en toda la muestra de estudio es la misma que la submuestra (N = 52).

Las determinaciones de "fracción libre" de orina y suero también permiten el cálculo de las tasas de depuración renal de cada analito.

Resultados

A. Filtrados de plasma (Fracción libre):

Dado que es el mejor predictor estructural temprano de la progresión clínica del DN, el criterio de valoración principal fue el cambio en el ancho de la membrana basal glomerular (GBM) desde el valor de referencia hasta los 5 años en la población de NHS medida en micrografías electrónicas de biopsias renales. También se midió el volumen fraccional mesangial. Los progresores rápidos (FP) se definieron como el cuartil superior (n = 24) del engrosamiento de GBM y otros como progresores lentos (SP). Las AGE [3-desoxiglucosona y metilglioxal hidroimidazonas (DG3H1, MGH1)] y carboximetil y etilisina (CML, CEL), y los productos de oxidación [sulfóxido de metionina y ácido 2 aminoadípico] se midieron mediante cromatografía líquida, espectroscopia de masa de cuadrupolo triple sobre filtrados de plasma 10 K en 102 muestras en el año 5. Se encontró que los niveles de MGHI, CEL y CML eran significativamente más altos en el FP definido por GBM en relación con el SP. Ningún AGE u OP predijo la expansión mesangial en estos estudios.

Estos resultados muestran tres AGE (Tabla 6; Figura 3), como indicadores tempranos de la progresión de lesiones importantes de DN. Los otros AGE y los biomarcadores oxidativos medidos en este estudio no se correlacionaron con la progresión de DN (Tabla 6).

TABLA 6. Niveles de biomarcadores en plasma en progresores de nefropatía rápida y lenta: según las tasas de engrosamiento de GBM durante 5 años

Biomarcador (todos nM)	Media rápida ± SD	Media lenta ± SD	Valor P Wilcoxon	Progresores/No progresores
CML	0.088±0.022	0.075±0.023	0.003*	22/79
GHI	0.013±0.002	0.013±0.001	0.16	22/79
MGHI	0.200±0.099	0.165±0.127	0.04*	22/79
CEL	0.058±0.015	0.049±0.015	0.026*	22/79
3DGHI	0.382±0.154	0.330±0.156	0.28	22/79
MethSO	0.931±0.304	0.979±0.348	0.97	22/79

Análisis adicionales que apoyan el valor de estos tres biomarcadores para predecir la nefropatía diabética temprana son las observaciones de que la HbA1c en el año 5 representó el 4.7% de la variación en el ancho de GBM (R²), pero la proporción de variación en el ancho de GBM explicada se aumentó al 11.6% cuando se agregaron MGHI, CEL y CML al modelo (aumento del 7.9%). Adicionalmente, estos análisis revelaron que MGHI era un factor predictivo independiente significativo del aumento de GBM.

Estos hallazgos indican que MGHI, CEL y CML son consistentemente bajos en aquellos que están protegidos de la progresión; por lo tanto los biomarcadores deben identificar aquellos protegidos de DN. Los datos ordenados para MGHI muestran que 2 de 31 (6% DE TERTIL INFERIOR) valores de MGHI de los progresores de nefropatía rápida están en el 30% inferior (31 de 103) de los valores ordenados, pero los valores de MGHI de 29 de 31 (94%) los progresores de nefropatía lenta constituyen este 30% inferior. Esto también fue cierto para los hallazgos de CEL y CML, en los que 30 de 32 (94%) de los valores más bajos se observaron en progresores lentos para ambos biomarcadores. Los niveles de estos 3 biomarcadores también se compararon con los niveles obtenidos previamente para No progresores (Ahmed, et al., Diabetologia, 48: 1590-1603 (2005); Ahmed, et al., Science, 44 (12): 5287- 92 (2003)). Como se muestra en la Tabla 7, estos estudios muestran que los niveles medios para el grupo protegido (DN no progresores) son similares o ligeramente superiores a los niveles observados en los controles no diabéticos.

TABLA 7- AGEs en sujetos diabéticos en comparación con sujetos no diabéticos

	CML	CEL	MG-H1
# Diabetes Tipo 1 n = 106	78	51	172
‡ Diabetes tipo 1 n = 21	97	72	331
* Sujetos no diabéticos. N = 6	23	35	110
‡ Sujetos no diabéticos	27	25	43
Tercil inferior de la progresión de DN n = 32	52.4±7.5	34.5±6.1	71.9±23.2
# Datos del presente estudio			
* Datos de Ahmed, Biochem Soc Trans, 31 (Pt 6): 1417-22 (2003)			
‡ Datos de Ahmed, et al., Diabetologia, 48: 1590-1603 (2005)			

Los resultados muestran que el nivel de tres AGE en los filtrados de plasma (pero sin OP), solo o además de la combinación de HbA1c, que los tres AGE principales, son predictores importantes (además de HbA1c) de la progresión a DN.

B. Resultados sobre biomarcadores en muestras de plasma extensamente digeridas para investigar su relación con la progresión de DN.

Se realizaron análisis estadísticos similares para determinar si los AGE y OP (medidos en digestos extensos de plasma de 102 muestras, realizados según lo descrito por Ahmed, et al., Diabetologia, 48: 1590-1603 (2005),

5 muestran cualquier correlación con la progresión del DN definido por el engrosamiento de GBM o la expansión mesangial. Los progresores rápidos (FP) se definieron como el cuartil superior (n = 24) del engrosamiento de GBM y el resto como progresores lentos (SP). Los mismos productos se midieron como se realizaron en el "filtrado de plasma" excepto por el ácido 2-amino adipico (AAA) que no se pudo medir sobre los digestos, y el GHI que estuvo por debajo de los límites de detectabilidad. Véase la Tabla 8. Como se muestra en la Tabla 8 a continuación, no hubo correlación entre los niveles de biomarcadores en plasma Digestiones y progresión de DN.

TABLA 8 - Datos estadísticos de los niveles de biomarcadores en los digestos en plasma

	prueba t	Wilcoxon
CML	0.62	0.75
MethSO	0.28	0.36
3DG-H1	0.61	0.50
CEL	0.70	0.61
MG-H1	0.22	0.30

10 El grado de elevación en los AGE y OPs unidos a proteínas fue modesto, en relación con aquel que se observó en el plasma de las fracciones "libres" urinarias, lo que sugiere una menor modificación de proteínas en plasma de vida media relativamente cortas en la diabetes. Ver tabla 9.

TABLA 9. Niveles de biomarcadores de hidrolizados en plasma en diabetes tipo 1 y controles

	CML	MetSO	3DG-H	CEL	G-H1	MG-H1
muestras DMS NHS (Diabetes tipo 1)	0.031	12.8	1.03	0.0019		0.024
DMS controles normales n = 8	0.024	9.94	0.93	0.0011		0.022

15 Valores expresados como mmoles/mol AA promedios

20 Los datos en la Tabla 8 muestran que ninguno de estos biomarcadores AGE u OP unidos a proteínas en plasma estaban relacionados con la progresión o no progresión de la nefropatía, con base en el grado de cambio de GBM o cambio de MES.

C. Resultados de la finalización del análisis de AGE urinario y productos de oxidación.

25 Para estos estudios, los progresores rápidos (FP) se definieron como los 37 sujetos superiores con el mayor grado de engrosamiento de GBM y los progresores lentos (SP) como el resto. Los análisis se realizaron en el conjunto de datos que se corrigió para algunos valores atípicos en los que se excluyó un valor si era > 2 SD más allá de la media individual de esa persona.

30 Los valores medios para los 8 biomarcadores medidos por el Progresor (rápido)/No Progresor (lento) se muestran en la Tabla 10. De esos 8, solo los niveles urinarios de CEL (p = 0.04) mostraron una diferencia significativa entre grupos. La CML es la más cercana (p = 0.10), luego DiTir (p = 0.16), con todos los demás valores de p > 0.25. Para confirmar adicionalmente estos resultados, los análisis se repitieron utilizando métodos no paramétricos (Prueba Rango-Suma Wilcoxon), y solo CEL (p = 0.02) fue diferente entre grupos. No se correlaciona el biomarcador con el grado de expansión mesangial durante 5 años.

35 TABLA 10. Niveles de biomarcadores urinarios en progresadores (rápidos) y no progresadores (lentos) de nefropatías

Variable de Análisis: gh1						
Grp	N Obs	N	Media	Std Dev	Mín.	Máx.
Rápido	35	35	1.35	0.63	0.76	4.20
Lento	89	89	1.30	0.47	0.59	3.10
Variable de análisis: ditir						
Grp	N Obs	N	Media	Std Dev	Mínimo	Máximo
rápido	35	34	0.058	0.012	0.042	0.093
Lento	89	89	0.055	0.013	0.036	0.100
Variable de análisis: mgh1						
Grp	N Obs	N	Promedio	Std Dev	Mín.	Máximo
rápido	35	35	41.4	17.6	19.2	89.4
Lento	89	89	38.7	19.3	10.8	100.9
Variable de análisis: aaa						
H6t grp	N Obs	N	Media	Std Dev	Mín.	Máxima
rápida	35	35	96.9	46.9	30.9	208.5

Lenta	89	89	93.8	53.5	17.9	400.1
Variable de análisis: cml						
Grp	N Obs	N	Media	Std Dev	Mínima	Máxima
rápida	35	35	15.1	5.4	8.3	25.7
Lenta	89	88	13.3	5.5	5.0	30.8
Variable de análisis: metso						
Grp	N Obs	N	Media	Std Dev	Mín.	Máximo
rápido	35	35	5.54	4.09	1.23	16.43
Lento	89	89	5.09	3.36	0.65	15.01
Variable de análisis: dgh3						
Grp	N Obs	N	Media	Std Dev	Máx.	Máximo
rápido	35	35	51.2	18.5	233	89.5
Lento	89	89	47.5	21.9	20.2	164.2
Variable de análisis: cel						
Grp	N Obs	N	Media	Desv. Est.	Mín.	Máx.
Rápido	35	35	7.29	1.83	3.99	11.65
Lento	89	88	6.46	2.05	2.83	13.14

Aunque se obtuvo significación estadística con CEL, cuando estos resultados se ajustaron para otras variables que se sabe afectan la progresión de DN (género, duración de la diabetes, edad y HbA1c), estas correlaciones entre CEL y DN Progresión/No Progresión no fueron ya estadísticamente significativo (Tabla 11).

5

TABLA 11. Análisis univariado y multivariado de CEL en el espesamiento de orina y GBM

var única (GBM, edad adj.)	CEL	
	Beta	p-valores
Biomarcador (CEL)	1.17	0.039
Multivariable (GBM, edad adj.)		
Biomarcador (CEL)	-0.118	0.82
HbA1c	4.43	<0.0001
Duración	-1.15	<0.0001
Género (si F)	-6.45	0.0033

Estos resultados indican que los AGE urinarios específicos y los biomarcadores oxidativos cuidadosamente cuantificados no muestran una relación independiente estadísticamente significativa con la progresión de la nefropatía diabética probada mediante biopsia.

10

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención divulgada

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el riesgo o tasa de un individuo para desarrollar nefropatía diabética, que comprende:
- 5 determinar los niveles de dos o más biomarcadores purificados a partir de una muestra de orina o una muestra de plasma, en la que se utiliza un modelo que representa los niveles de dichos dos o más biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste de productos finales de glicación avanzada de lisina, productos finales de glicación avanzada de arginina, y productos de oxidación, y
- 10 comparar los niveles de biomarcador con los valores estándar, en los que el nivel de los biomarcadores indica el riesgo de desarrollar o la tasa de desarrollar nefropatía diabética, en el que los individuos no han sido diagnosticados con nefropatía diabética, y en el que los dos o más biomarcadores comprenden metilglioxal hidroimidazolona (MGH1).
2. El método de la reivindicación 1, en el que el biomarcador no MGH1 se selecciona del grupo que consiste de Na-carboxi metil-lisina (CML), Ng-carboxi etil-lisina (CEL), glioxal hidroimidazolona (GH1), 3-desoxiglucosona hidroimidazolona (3DGH), sulfóxido de metionina (MetSO), y 3-nitrotirosina (3-NT).
3. El método de la reivindicación 1 en el que los productos finales de glicación avanzada son MGH1, y NE-(1-carboxietil-lisina (CEL), o Na_carboximetilisina (CML).
- 20 4. El método de la reivindicación 3 en el que los niveles de plasma de CML, CEL, y MGH1, solos o en combinación con el nivel de HbA1c, se miden como indicadores de progresión temprana de nefropatía diabética.
5. El método de la reivindicación 4 en el que en el que los valores de CEL de menos de 0.042 nM (preferiblemente 0.020-menos de 0.042 nM), MGH1 menos de 0.103 nM (preferiblemente 0.030-menos de 0.103 nM) y CML menos de 0.062 nM (preferiblemente 0.033-menos de 0.062 nM), indican que el individuo tiene un bajo riesgo o tasa lenta de desarrollo de nefropatía diabética.
- 30 6. El método de cualquier reivindicación precedente que comprende determinar el nivel de los biomarcadores utilizando Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas de Cuadrupolo Triple (LC- MS/MS) para purificar y cuantificar los biomarcadores.
7. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la muestra es un ultrafiltrado de plasma.
- 35 8. El método de la reivindicación 7 en el que la fase estacionaria de LC-MS/MS es C18 con ácido heptafluorobutírico que es el agente de emparejamiento de iones.
9. El método de cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente proporcionar un informe con el riesgo o tasa de desarrollo de complicaciones diabéticas, y opcionalmente proporcionar opciones de tratamiento recomendado para el individuo en riesgo o que tiene una tasa elevada de desarrollo de complicaciones diabéticas.
- 40 10. El método de la reivindicación 9 en el que las opciones de tratamiento se seleccionan del grupo que consiste de agentes de reducción de glucosa, medicamentos que modifican el sistema de renina-angiotensina, y dietas especializadas con bajos niveles de AGEs o productos oxidativos.
- 45 11. Uso de un kit que comprende reactivos para probar una muestra en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 50 12. El uso de la reivindicación 11 en el que el kit comprende reactivos para probar el nivel de metilglioxal hidroimidazolona (MGH1) y los niveles de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste de NE-carboxi metilisina (CML), NE-carboxi etil-lisina (CEL), glioxal hidroimidazolona (GH1), 3-desoxiglucosona hidroimidazolona (3DGH), sulfóxido de metionina (MetSO), y 3-nitrotirosina (3-NT).
- 55 13. El uso de la reivindicación 11 o 12 en el que el kit comprende reactivos para determinar el nivel de los biomarcadores que utilizan Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas de Cuadrupolo Triple (LC- MS/MS).

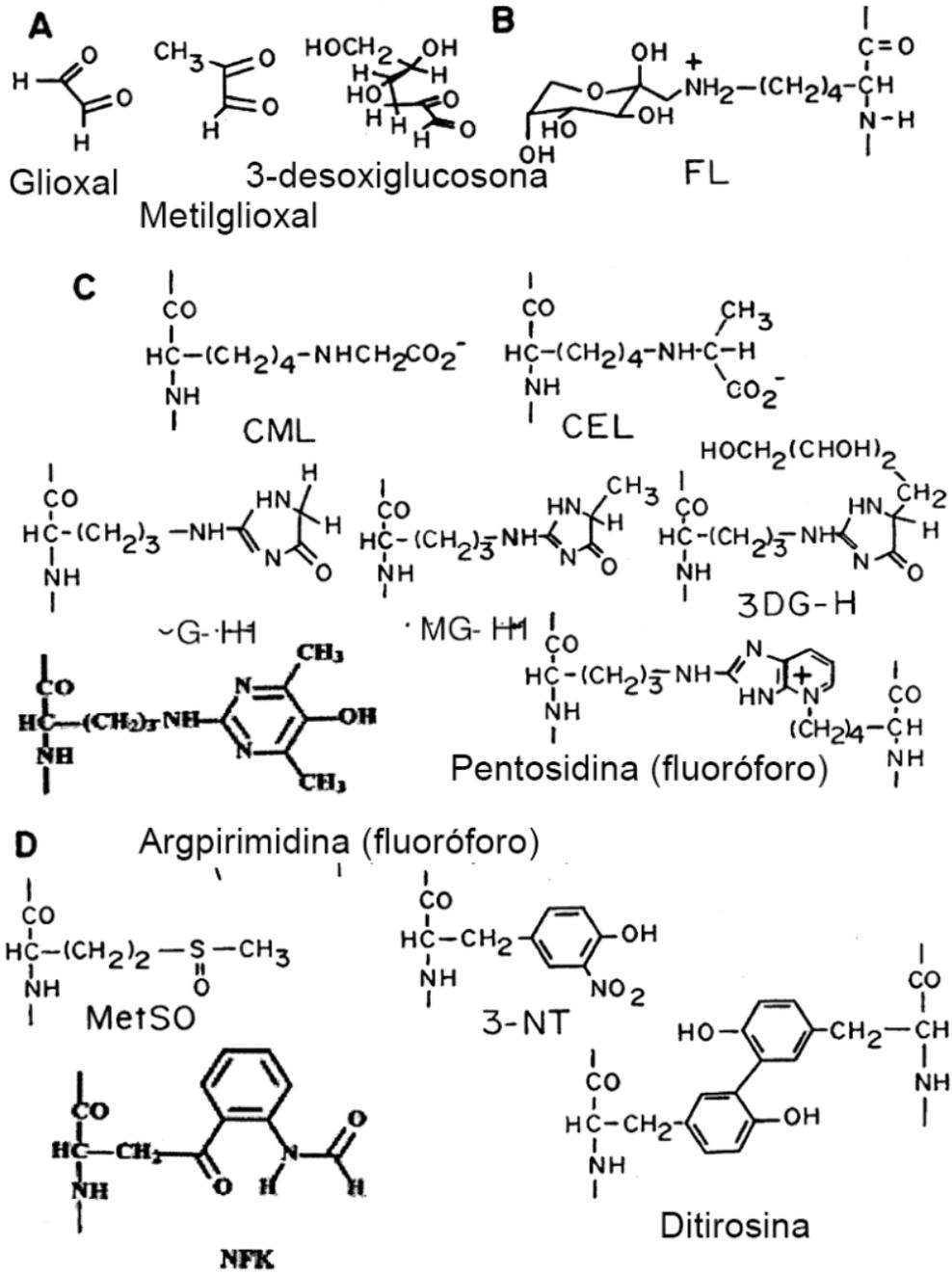


FIG. 1

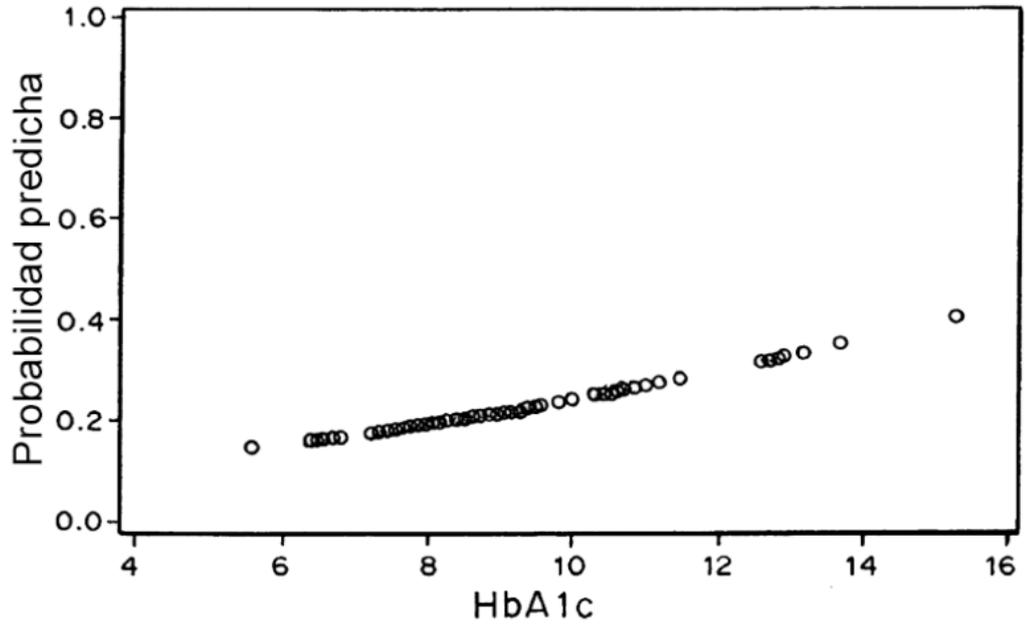


FIG. 2A

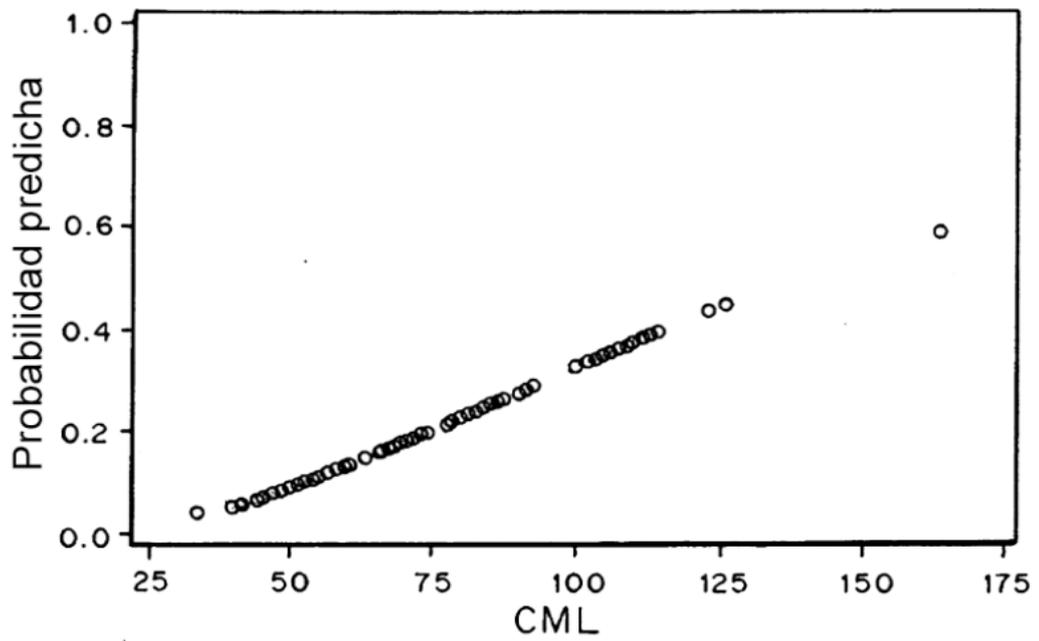


FIG. 2B

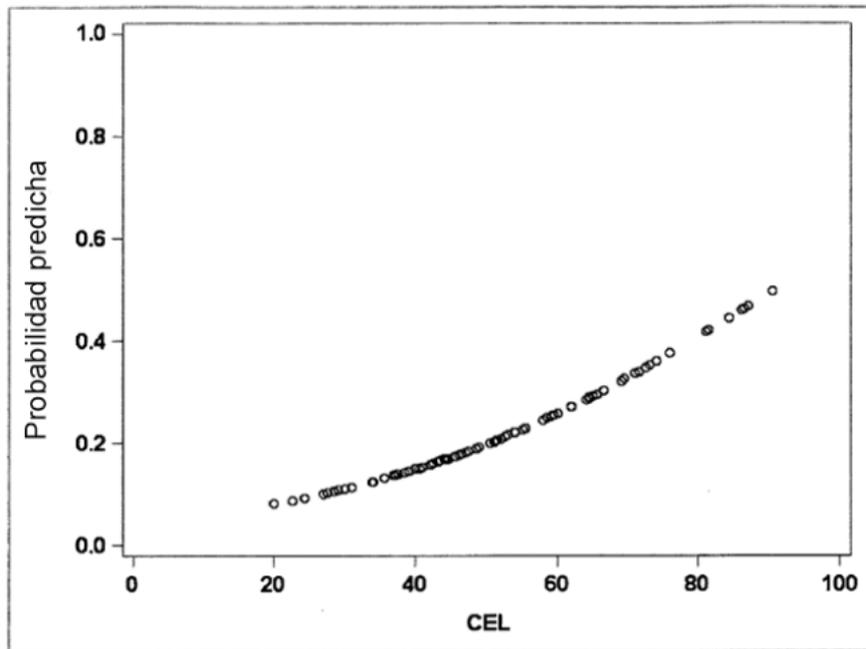


FIG. 2C

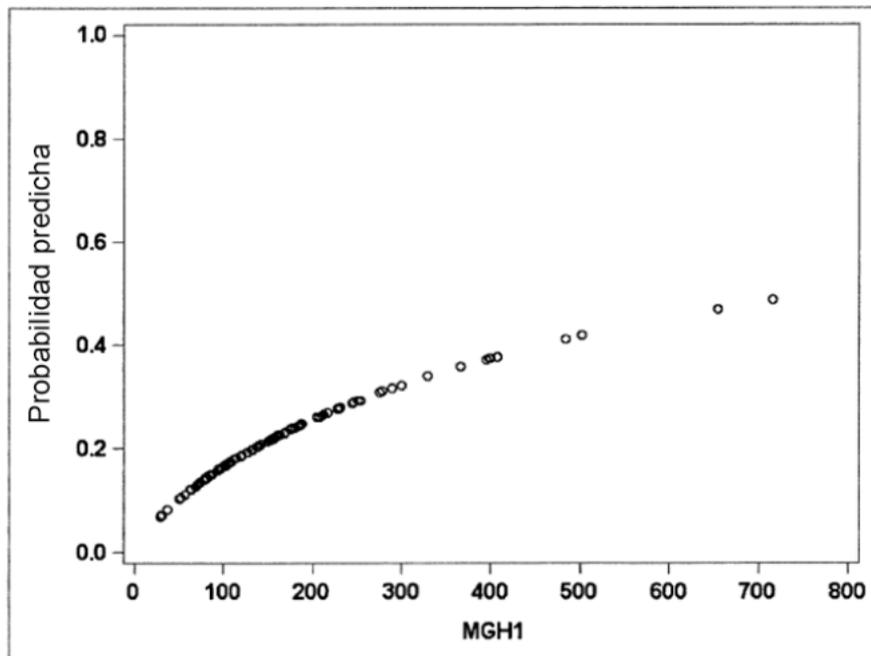


FIG. 2D

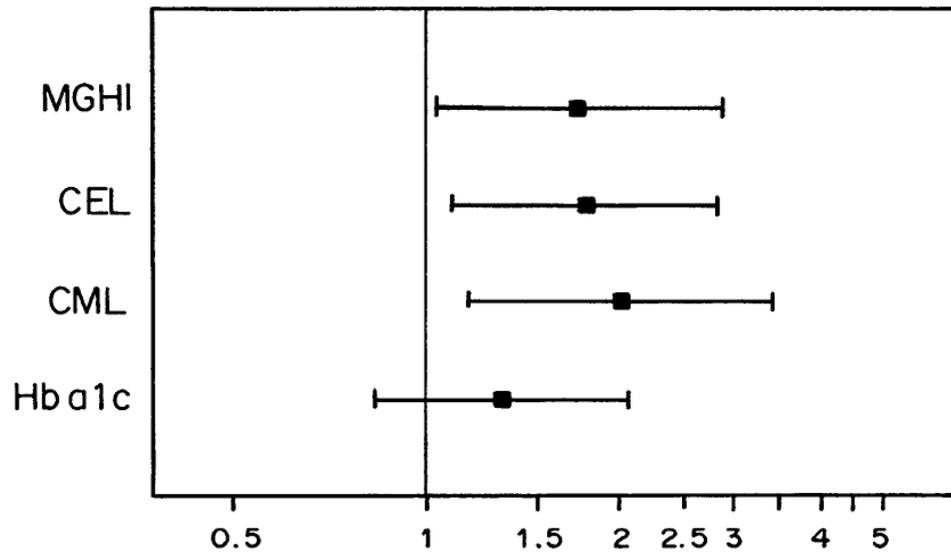


FIG. 3