

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 403**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2009 PCT/US2009/067366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10068686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 09832484 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2406636**

54 Título: **Métodos para diagnosticar y predecir una enfermedad renal**

30 Prioridad:

10.12.2008 US 121398 P
11.05.2009 US 177074 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2019

73 Titular/es:

JOSLIN DIABETES CENTER, INC. (100.0%)
One Joslin Place
Boston, MA 02215, US

72 Inventor/es:

NIEWCZAS, MONIKA A. y
KROLEWSKI, ANDRZEJ S.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 706 403 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

Métodos para diagnosticar y predecir una enfermedad renal

5 Campo técnico

Esta descripción se refiere a métodos para diagnosticar y predecir el deterioro temprano de la función renal (ERFD), mediante el uso de los biomarcadores sTNFR1, sTNFR2, sFas, TNF, e IL-6.

10 Antecedentes de la invención

El modelo tradicional del desarrollo de la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) en la diabetes tipo 1 (T1DM), en la cual la microalbuminuria (MA) conduce a proteinuria y después la proteinuria es seguida por la pérdida de la función renal, se ha cuestionado recientemente. El aumento de la excreción de albúmina en orina es un determinante importante de la evolución de la nefropatía diabética, pero no explica completamente este fenómeno. Por ejemplo, la pérdida de la función renal comienza más temprano de lo reconocido anteriormente y precede a la aparición de la proteinuria (Perkins y otros, *J Am Soc Nephrol*. 18:1353-1361, 2007). Un estudio longitudinal de T1DM (el 1er Estudio de Joslin de la Historia Natural de la Microalbuminuria) demostró que el deterioro de la función renal comenzó con la aparición de MA en aproximadamente un tercio de los pacientes y evolucionó de una forma lineal desde la función renal normal hasta la insuficiencia renal (Perkins y otros, 2007, *como arriba*). Además, el deterioro de la función renal se produce en una proporción notable de pacientes con T1DM y excreción de albúmina normal (Perkins y otros, 2007, *como arriba*; Caramori y otros, *Diabetes* 52:1036-1040, 2003).

Resumen

25

Como se muestra en la presente descripción, el deterioro progresivo de la función renal temprana (ERFD), por ejemplo, en la diabetes tipo 1 (T1DM) y la diabetes tipo 2 comienza mientras que la tasa de filtración glomerular (GFR) esté en el intervalo normal o elevado y antes de la aparición de la proteinuria. La inflamación y la apoptosis pueden estar implicadas en este proceso. Los métodos presentes pueden usarse para identificar sujetos diabéticos con deterioro temprano de la función renal, en base a marcadores séricos de la ruta de TNF (por ejemplo, TNFI, sTNFR1, y sTNFR2), de las rutas de Fas (por ejemplo, sFas), e IL-6. Los métodos presentes pueden usarse además para identificar o predecir sujetos diabéticos con riesgo de desarrollar la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), en base a marcadores séricos o plasmáticos de la ruta de TNF (por ejemplo, sTNFR1).

30

35

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un método para determinar (por ejemplo, predecir o diagnosticar) si un sujeto humano tiene un mayor riesgo de desarrollar el deterioro temprano de la función renal (ERFD), el método que comprende medir los niveles de uno o más biomarcadores en una muestra de un sujeto humano con normoalbuminuria (NA), microalbuminuria (MA), o proteinuria (PT), dichos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), receptor de TNF tipo 1 soluble (sTNFR1), TNFR2 soluble (sTNFR2), Fas soluble (sFas), e interleucina-6 (IL-6), comparar los niveles del sujeto con los niveles de referencia de los uno o más biomarcadores, y determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar ERFD en base a la comparación de los niveles del sujeto con los niveles de referencia. Por ejemplo, una diferencia entre los niveles de los uno o más biomarcadores en la muestra del sujeto y los niveles de referencia puede indicar que el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar ERFD. En algunos casos, la diferencia puede ser que los niveles de los uno o más biomarcadores en la muestra del sujeto son mayores (por ejemplo, significativamente mayores) que los niveles de referencia de los mismos biomarcadores. En algunos casos, la muestra del sujeto puede incluir el suero del sujeto. En algunos casos, el sujeto puede ser un sujeto con diabetes, por ejemplo, diabetes tipo 1 o tipo 2. Por ejemplo, el sujeto puede seleccionarse porque tiene diabetes, por ejemplo, diabetes tipo 1 o 2. Además, el sujeto puede ser un sujeto con normoalbuminuria, microalbuminuria, o proteinuria. Por ejemplo, el sujeto puede seleccionarse porque tiene normoalbuminuria, microalbuminuria, o proteinuria. Los métodos para identificar sujetos con normoalbuminuria, microalbuminuria, o proteinuria se conocen en la técnica y se describen más adelante. En algunos casos, los biomarcadores medidos en sujetos con diabetes tipo 1 pueden incluir, por ejemplo, sTNFR1, sTNFR2, y sFas; TNF α , sTNFR1, sTNFR2, y sFas; o TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sFas, e IL-6. En algunos casos, los biomarcadores medidos en sujetos con diabetes tipo 2 pueden incluir, por ejemplo, TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sFas, e IL-6. En algunos casos, el sujeto humano puede ser un sujeto que no presenta ninguno de los signos o síntomas clínicos de la enfermedad cardíaca crónica (CHD) o la enfermedad cardíaca isquémica. Además, en algunos casos, el sujeto humano puede ser un sujeto que tiene una tasa de filtración glomerular (GFR) de 90 ml/minuto o más.

50

55

60

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para determinar si un sujeto humano tiene un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad renal crónica (CKD), o la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), o ambas, el método que comprende medir el nivel de receptor de TNF tipo 1 soluble (sTNFR1) en una muestra de un sujeto humano con proteinuria, comparar los niveles de sTNFR1 del sujeto con los niveles de referencia de sTNFR1, y determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar CKD, ESRD, o ambas, en base a la comparación de los niveles del sujeto con los niveles de referencia. Por ejemplo, una diferencia entre los niveles del sTNFR1 en la muestra del sujeto y los niveles de referencia puede indicar que el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar CKD, ESRD, o ambas. En algunos casos, la diferencia puede ser que los niveles del sTNFR1 en la muestra del sujeto son

65

mayores (por ejemplo, significativamente mayores) que los niveles de referencia. En algunos casos, el sujeto humano puede ser un sujeto con diabetes tipo 1 o tipo 2. En algunos casos, el sujeto humano puede ser un sujeto con diabetes tipo 1 y/o proteinuria.

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el comprendido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen en la presente descripción para el uso en la presente descripción; pueden usarse además otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica.
- 10 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

- 15 Las figuras 1A-1F son gráficas de barras en 3-D que muestran la cC-GFR media en la población de estudio de individuos con diabetes tipo 1 de acuerdo con el estado de la albuminuria (NA = normoalbuminuria y MA = microalbuminuria) y el tercil (T1, T2, T3) de un marcador antiinflamatorio: 1A, sTNFR1; 1B, sTNFR2 ; 1C, TNF α ; 1D, sFas; 1E, sICAM-1; 1F, IP10). Valor de P para la tendencia a través de los terciles en NA (barras gris claro) y en MA (barras gris oscuro), respectivamente.
- 20 Las figuras 2A-2B son gráficas de barra que muestran la proporción del evento = la pérdida de la función renal definida como el cuartil superior de la evolución más rápida en el 2do Estudio Renal de Joslin prospectivo (2A) y en el 1er Estudio Renal de Joslin replicativo (2B), estratificado por los terciles del marcador respectivo.
- 25 Las figuras 3A-3D son gráficas de barras en 3-D que muestran la GFR media ajustada (ml/min/1,73m²) en sujetos con Diabetes tipo 2 de acuerdo con el estado de la Tasa de Excreción de Albúmina (NA = normoalbuminuria, MA = microalbuminuria, y PT = proteinuria) y tercil (T1, T2, T3): 3A, TNF α ; 3B, IL6; 3C, sTNFR1; 3D, sFas.
- La Figura 4 es una gráfica de barras que muestra la asociación entre TNF α , sTNFR1, sTNFR2, IL-6, y sFas en sujetos con diabetes tipo II. Los datos muestran la diferencia en la GFR media (ml/min/1,73m²) entre los terciles más altos y los más bajos de cinco marcadores (TNF α , sTNFR1, sTNFR2, IL6, y sFas) en el análisis bruto después del ajuste por edad, género, y estado de AER.

30

Descripción Detallada

- Se piensa que la inflamación crónica de bajo grado está implicada en la patogénesis de la nefropatía diabética (Navarro y otros, Cytokine.Growth Factor. Rev. 17:441-450, 2006, y Galkina y otros, J. Am. Soc. Nephrol., 17:368-377, 2006). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α /TNF) es un mediador clave de la inflamación y juega un papel en la apoptosis. En modelos animales, estos efectos sobre los riñones incluyen la reducción de la tasa de filtración glomerular (GFR) y un aumento de la permeabilidad de la albúmina (Navarro, *como arriba*). El TNF α media esta señal a través de dos receptores diferentes, el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) y el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), que se unen a membrana y están presentes además en la forma soluble en suero (Macewan y otros, Cell. Signal., 14:477-492, 2002). El TNF α media estos efectos inflamatorios mediante la inducción de un amplio espectro de quimiocinas incluidas interleucina 8 (IL8); proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1); proteína inducible por interferón gamma 10 (IP-10) y moléculas de adhesión tales como molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (Segeer y otros, J. Am. Soc. Nephrol., 11:152-176, 2000; Wong y otros, Clin. Exp. Immunol., 149:123-131, 2007).

45

- La ruta de Fas media la apoptosis y puede jugar un papel en la evolución de la nefropatía diabética (Kumar y otros, Nephron. Exp. Nephrol., 96:e77-e88, 2004; Kumar y otros, Mol. Cell. Biochem., 259:67-70, 2004; Schelling y otros, Lab. Invest., 78:813-824, 1998; y Perianayagam y otros, J. Lab. Clin. Med., 136:320-327, 2000). La unión del ligando de Fas (FasL) a Fas, su receptor unido a membrana que también está presente en suero en forma soluble (sFasL, sFas), conduce a una respuesta apoptótica (Baba y otros, Nephrology, 9:94-99, 2004 y Ortiz y otros, Nephrol. Dial. Transplant., 14:1831-1834, 1999).

50

- La interleucina-6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica, proinflamatoria que se ha asociado a complicaciones en la diabetes. Específicamente, los estudios transversales de los sujetos con diabetes tipo 2 demuestran que los niveles séricos elevados de IL-6 se asocian con nefropatía diabética (Shikano y otros, Nephron., 85:81-5, 2000). Sin embargo, no se ha informado una asociación similar entre IL-6 y la nefropatía diabética para la diabetes tipo 1 (Schram y otros, Diabetologia., 48:370-8, 2005; Niewczasz y otros, Clin J Am Soc Nephrol., 4:62-70, 2009).

55

- La mayoría de los estudios sobre los marcadores séricos de la inflamación mediada por TNF α y la apoptosis en la nefropatía diabética han explorado su asociación con MA y proteinuria en lugar de con GFR (Zoppini y otros, J. Clin. Endocrinol. Metab., 86:3805-3808, 2001).

60

- El gran estudio transversal descrito en la presente descripción investigó si las concentraciones séricas de los marcadores incluidos TNF α y los marcadores relacionados con TNF (sTNFR1, sTNFR2, sICAM-1, sVCAM-1, IL8, MCP1, IP10), implicados en la apoptosis relacionada con Fas (sFasL y sFas), IL-6, y CRP, se asocian, independientemente de la albuminuria, con la variación en la función renal en pacientes con T1DM que no tienen

65

proteinuria o deficiencia avanzada de la función renal. Este conocimiento facilitará el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para identificar pacientes con deterioro temprano de la función renal y ayudará en la búsqueda de protocolos de intervención para pacientes con alto riesgo que pueden ser más eficaces si se implementan 5-10 años antes en el transcurso de la enfermedad.

5

Los estudios descritos en la presente descripción también investigaron si las concentraciones séricas de TNFR1 se asocian con GFR en sujetos con diversas etapas de la enfermedad renal crónica (CKD) y si una asociación tal puede usarse como un marcador predictivo de ESRD en tales sujetos.

10

En estos estudios, la tasa de filtración glomerular se estimó mediante una fórmula basada en cistatina C (cC-GFR) que anteriormente se demostró que era una vía segura para evaluar la función renal en pacientes con diabetes (Macisaac y otros, *Diabet. Med.*, 24:443-448, 2007 y Perkins y otros, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16:1404-1412, 2005).

15

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona los métodos para determinar si un sujeto está predispuesto a desarrollar el deterioro temprano de la función renal (ERFD). Estos métodos pueden incluir generar un perfil del sujeto mediante la obtención de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de orina o sangre (por ejemplo, suero y/o plasma), del sujeto, medir el nivel de al menos un biomarcador descrito en la presente descripción en la muestra, y comparar el nivel del biomarcador en la muestra de orina o sangre con un perfil de referencia predeterminado. Un perfil de referencia puede incluir un perfil generado a partir de uno o más sujetos que se conoce que están predispuestos a desarrollar ERFD (por ejemplo, los sujetos en un estudio que después desarrollan ERFD), y/o un perfil generado de uno o más sujetos que no están predispuestos a desarrollar ERFD. Una "predisposición a desarrollar ERFD" es un riesgo significativamente aumentado de desarrollar ERFD, por ejemplo, el sujeto tiene más probabilidades estadísticas de desarrollar ERFD que un sujeto "normal" (por ejemplo, un sujeto con diabetes pero sin un mayor riesgo de desarrollar ERFD). En algunos aspectos, un sujeto con una predisposición a desarrollar ERFD es uno cuya muestra contiene uno o más de los biomarcadores descritos en la presente descripción en cantidades que difieren (por ejemplo, difieren significativamente) de, o están por encima, por debajo, son mayores que o iguales a, menores que o iguales a, o aproximadamente iguales, en dependencia de si la referencia representa un sujeto con riesgo normal o un sujeto con alto riesgo, desde el nivel del mismo o más biomarcadores en un perfil de referencia. En algunos casos, la diferencia en los niveles de los uno o más biomarcadores puede ser por ejemplo, aproximadamente un factor de dos o al menos aproximadamente un factor de dos (por ejemplo, al menos dos veces o la mitad del nivel del biomarcador presente en el perfil de referencia), en donde el perfil de referencia representa un sujeto que no está predispuesto a desarrollar ERFD.

20

25

30

En algunas modalidades, el sujeto puede tener uno o más factores de riesgo para desarrollar ERFD, por ejemplo, duración de la diabetes, niveles elevados de hemoglobina A1c (HbA1c) (por ejemplo, por encima del 8,1 % o por encima del 9 %), edad superior a 35 años, niveles elevados de colesterol plasmático, presión sanguínea media alta, relación elevada de albúmina a creatinina (por ejemplo, por encima de aproximadamente 0,6), e hiperglicemia (por ejemplo, glucosa en sangre de más de aproximadamente 200 mg/dl). En algunas modalidades, el sujeto puede tener microalbuminuria (por ejemplo, excreta albúmina a 30-300 µg/min). En otro aspecto, el sujeto puede no tener microalbuminuria y/o es un sujeto con normoalbuminuria (por ejemplo, excreta aproximadamente menos de 30 µg/min) y/o tiene función renal normal (por ejemplo, tiene niveles de creatinina sérica menores que 1,2 mg/dl). En algunas modalidades, el sujeto puede tener diabetes tipo 1 o tipo 2. Alternativamente o además, el sujeto puede no ser diabético. En algunas modalidades, el sujeto puede tener proteinuria, por ejemplo, macroalbuminaria (por ejemplo, el sujeto excreta albúmina a más de aproximadamente 300 µg/min). En algunas modalidades, el sujeto no tiene, no tiene un diagnóstico de, o no presenta ninguno de los signos o síntomas clínicos de la enfermedad cardíaca crónica (CHD). En algunas modalidades, el sujeto no tiene, no tiene un diagnóstico de, o no presenta ninguno de los signos o síntomas clínicos de la enfermedad cardíaca isquémica.

35

40

45

50

55

60

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona los métodos para determinar si un sujeto está predispuesto a desarrollar la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). Estos métodos pueden incluir generar un perfil del sujeto mediante la obtención de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de orina o sangre (por ejemplo, suero)) del sujeto, medir el nivel de al menos un biomarcador descrito en la presente descripción en la muestra, y comparar el nivel del biomarcador en la muestra de orina o sangre con un perfil de referencia predeterminado. En algunas modalidades, estos métodos incluyen generar un perfil del sujeto mediante la obtención de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de orina o sangre (por ejemplo, suero)) del sujeto, medir el nivel de TNFR1 en la muestra, y comparar el nivel de TNFR1 en la muestra con un perfil de referencia de TNFR1 predeterminado. Los perfiles de referencia pueden incluir un perfil generado de uno o más sujetos que se conoce que están predispuestos a desarrollar ESRD (por ejemplo, los sujetos en un estudio que más tarde desarrollan ESRD), y/o perfiles generados de uno o más sujetos que no están predispuestos a desarrollar ESRD. Una "predisposición a desarrollar ESRD" es un riesgo significativamente aumentado de desarrollar ESRD, es decir, el sujeto tiene más probabilidades de desarrollar ESRD que un sujeto "normal", es decir, un sujeto que tiene diabetes pero no tiene un mayor riesgo de desarrollar ESRD. En algunas modalidades, un sujeto con una predisposición a desarrollar ESRD es uno cuya muestra tiene un biomarcador mencionado (por ejemplo, TNFR1) en cantidades que difieren significativamente de, o están por encima de, por debajo de, son mayores que o iguales a, menores que o iguales a, o de aproximadamente el mismo nivel que el nivel del mismo biomarcador en el perfil de referencia, en dependencia de si la referencia representa un sujeto con riesgo normal o un sujeto con alto riesgo. En algunos casos, la diferencia en los niveles de los uno o más biomarcadores

65

puede ser, por ejemplo, aproximadamente un factor de dos o al menos aproximadamente un factor de dos (por ejemplo, al menos dos veces o la mitad del nivel del biomarcador presente en el perfil de referencia), en donde el perfil de referencia representa un sujeto que no está predispuesto a desarrollar ESRD.

5 En algunas modalidades, el sujeto puede tener uno o más factores de riesgo para desarrollar ESRD. Tales factores puede incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, duración de la diabetes, niveles elevados de hemoglobina A1c (HbA1c) (por ejemplo, por encima del 8,1 % o por encima del 9 %), edad superior a 35 años, niveles elevados de colesterol plasmático, presión sanguínea media alta, relación elevada de albúmina a creatinina (por ejemplo, > 0,6), e hiperglicemia (por ejemplo, glucosa en sangre superior a 200 mg/dl). En algunas modalidades, el sujeto puede tener una
10 función renal normal (por ejemplo, GFR = 90 ml/min o más). En algunas modalidades, el sujeto puede tener la enfermedad renal crónica (CKD) (por ejemplo, CKD en etapa 1 (por ejemplo, GFR = 90 ml/minuto o más)), CKD en etapa 2 (por ejemplo, GFR = 60 a 89 ml/minuto), CKD en etapa 3 (por ejemplo, GFR = 30 a 59 ml/minuto), CKD en etapa 4 (por ejemplo, GFR = 15 a 29 ml/min), o CKD en etapa 5 (por ejemplo, GFR = menos de 15 ml/min o en diálisis). En algunas modalidades, el sujeto tiene proteinuria (por ejemplo, excreción de albúmina mayor que o igual a 300
15 µg/min). En algunas modalidades, el sujeto tiene CKD (por ejemplo, CKD en etapa 1, 2, 3, 4, o 5) y proteinuria. En algunas modalidades, el sujeto tiene diabetes (por ejemplo, diabetes tipo 1 o tipo 2). En algunas modalidades, el sujeto no es diabético.

20 En algunas modalidades, los métodos pueden incluir medir el nivel de una pluralidad de los biomarcadores descritos en la presente descripción, por ejemplo, pueden medirse uno o más biomarcadores (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o todos los biomarcadores). El(los) nivel(es) del(de los) biomarcador(es) puede(n) usarse para generar un perfil del biomarcador para el sujeto.

25 Los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir además obtener una muestra de un sujeto, por ejemplo, una muestra de sangre u orina, y determinar el nivel del(de los) biomarcador(es) en la muestra.

En algunas modalidades, los métodos incluyen normalizar para las concentraciones de creatinina en orina.

30 Los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir poner en contacto una muestra obtenida de un sujeto con biomoléculas específicas de biomarcadores, por ejemplo, un arreglo de biomoléculas específicas de biomarcadores inmovilizadas, y detectar la unión estable o transiente de la biomolécula al biomarcador, que es indicativa de la presencia y/o el nivel de un biomarcador en la muestra. Los niveles de biomarcadores del sujeto pueden compararse con los niveles de biomarcadores de referencia obtenidos de los sujetos de referencia. Los niveles de biomarcadores de referencia pueden usarse además para generar un perfil de referencia de uno o más sujetos de referencia. En un
35 aspecto, las biomoléculas específicas de biomarcadores son anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, las biomoléculas específicas de biomarcadores son antígenos, tales como antígenos virales que reconocen específicamente los biomarcadores. Aún en otro aspecto, las biomoléculas específicas de biomarcadores son receptores (por ejemplo, el receptor de TNF).

40 La descripción también presenta un kit diagnóstico preempaquetado para detectar una predisposición a ERFD. El kit puede incluir biomoléculas específicas de biomarcadores como se describe en la presente descripción y las instrucciones para el uso del kit para probar una muestra para detectar una predisposición a ERFD. El kit puede usarse además para determinar la eficacia de una terapia administrada para evitar la ERFD mediante el contacto de las biomoléculas específicas de biomarcadores con una muestra obtenida de un sujeto que experimenta una terapia
45 seleccionada. El nivel de uno o más biomarcadores en la muestra puede determinarse y compararse con el nivel del mismo o más biomarcadores detectados en una muestra obtenida del sujeto antes de, o después de, la administración de la terapia. Posteriormente, puede proporcionarse un asistente con la información de comparación para la evaluación adicional.

50 Biomarcadores

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción incluyen la medición de los niveles de determinados biomarcadores solubles, incluidos uno o más de sTNFR1, sTNFR2, sFAS, TNF, e IL-6. Las alteraciones específicas de uno o más de los biomarcadores enumerados en la presente descripción se relacionan estadísticamente
55 con el desarrollo de ERFD. Estos biomarcadores sirven como biomarcadores tempranos para una enfermedad, y caracterizan sujetos como en alto riesgo de una futura enfermedad. Los nombres sistemáticos de las moléculas son como sigue:

60 TNFa: Factor de necrosis tumoral; TNF (superfamilia de TNF, miembro 2); Entrez GeneID: 7124; ARNm: NM_000594.2; proteína: NP_000585.2.

receptor de TNF tipo 1 soluble (sTNFR1): subfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral solubles, miembro 1A; sTNFRSF1A; Entrez GeneID: 7132; ARNm: NM_001065.2; proteína: NP_001056.1; ver además el documento WO9531544; Fernandez-Botran y otros, FASEB J. 5(11):2567, 1991; y US2006039857.

65

receptor de TNF tipo 2 soluble (sTNFR2): subfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral solubles, miembro 1B; sTNFRSF1B; Entrez GeneID: 7133; ARNm: NM_001066.2; proteína: NP_001057.1; ver además el documento WO9531544; Fernandez-Botran y otros, FASEB J. 5(11):2567, 1991; y US2006039857.

5 Fas soluble (sFas): superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral solubles, miembro 6 (sTNFRSF6); Entrez GeneID: 355; ARNm: NM_000043.3, NM_152871.1, NM_152872.1, NM_152873.1, NM_152874.1, NM_152875.1, NM_152876.1, o NM_152877.1; Proteína: NP_000034.1, NP_690610.1, NP_690611.1, NP_690612.1, NP_690613.1, NP_690614.1, NP_690615.1, o NP_690616.1. Ver además la patente de Estados Unidos núm. 5652210; Chen y otros, Science, 263:1759-1762, 1994; Hachiya y otros, y el documento WO 96/01277.

10 Interleucina-6 (IL6); Entrez GeneID; 3569; ARNm: NM_000600.3; Proteína: NP_000591.1.

En algunas modalidades, pueden usarse además otros marcadores, por ejemplo, biomarcadores de orina o suero, de insuficiencia renal, como se conocen en la técnica.

15 Un nivel de "sujeto" puede denominarse además un perfil de "prueba". Un nivel del sujeto puede generarse de una muestra tomada de un sujeto antes del desarrollo de microalbuminuria (por ejemplo, cuando el sujeto excreta menos de 30 mg de albúmina al día o tiene una relación de albúmina-creatinina (A/C) menor de 30 en una especie de orina aleatoria). Por lo tanto, un nivel de "sujeto" se genera de un sujeto que se prueba para la predisposición a DN.

20 Un nivel de "referencia" puede denominarse un nivel de "control". Un nivel de referencia puede generarse a partir de una muestra tomada de un individuo normal o de un individuo conocido por tener una predisposición a ERFD, o de un individuo conocido por tener ESRD y/o CKD. El nivel de referencia, o la pluralidad de los niveles de referencia, pueden usarse para establecer los valores umbrales de los niveles de, por ejemplo, los biomarcadores específicos en una muestra. Un nivel de "referencia" incluye los niveles generados de uno o más sujetos que tienen una predisposición a ERFD, los niveles generados de uno o más sujetos que tienen ESRD y/o CKD, o los niveles generados de uno o más sujetos normales.

30 Un nivel de referencia puede estar en la forma de un valor umbral o una serie de valores umbrales. Por ejemplo, un valor umbral único puede determinarse mediante el promedio de los valores de una serie de niveles de un biomarcador único de sujetos que no tienen predisposición a ERFD. De manera similar, un valor umbral único puede determinarse mediante el promedio de los valores de una serie de niveles de un biomarcador único de sujetos que tienen una predisposición a ERFD. Por lo tanto, un valor umbral puede tener un valor único o una pluralidad de valores, cada valor que representa un nivel de un biomarcador específico, detectado en una muestra de orina, por ejemplo, de un individuo, o de múltiples individuos, que tienen una predisposición a ERFD.

35 Como se describe en la presente descripción, un nivel del sujeto puede usarse para identificar un sujeto con riesgo de desarrollar ERFD basado en una comparación con el nivel o los niveles de referencia apropiados. Los sujetos predispuestos a tener ERFD pueden identificarse antes del desarrollo de microalbuminuria o con microalbuminuria mediante un método descrito en la presente descripción. Por ejemplo, un nivel del sujeto de un biomarcador descrito en la presente descripción detectado en una muestra de un sujeto puede compararse a un nivel de "referencia" del mismo biomarcador detectado en una muestra obtenida de un sujeto de referencia. Si el nivel de referencia se deriva de una muestra (o muestras) obtenida de un sujeto de referencia que tiene una predisposición a ERFD, después la similitud del nivel del sujeto al nivel de referencia es indicativa de una predisposición a ERFD para el sujeto analizado. Alternativamente, si el nivel de referencia se deriva de una muestra (o muestras) obtenida de un sujeto de referencia que no tiene una predisposición a ERFD, después la similitud del nivel del sujeto al nivel de referencia no es indicativa de una predisposición a ERFD para el sujeto analizado. Como se usa en la presente descripción un nivel del sujeto es "similar" a un nivel de referencia si no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los dos niveles. En algunas modalidades, un nivel del sujeto difiere significativamente del nivel de referencia del(de los) mismo(s) biomarcador(es), cuando el nivel de referencia es de un sujeto de referencia que no tiene una predisposición a ERFD, es indicativa de una predisposición a ERFD en el sujeto.

50 En algunas modalidades, el biomarcador para ERFD puede incluir uno o más de, por ejemplo, TNF α , sTNFR1, sTNFR2, Fas, e IL-6, incluida cualquier combinación de TNF α , sTNFR1, sTNFR2, Fas, e IL-6. En algunas modalidades, el biomarcador para ERFD puede incluir TNF α , sTNFR1, sTNFR2, Fas, e IL-6.

En algunas modalidades, el biomarcador para la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) puede incluir sTNFR1.

Métodos de detección

60 Pueden usarse cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para determinar los niveles de un analito en una muestra biológica. Una prueba bioquímica ilustrativa para identificar los niveles de biomarcadores emplea un formato de prueba estandarizado, tal como el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) (ver, por ejemplo, Molecular Immunology: A Textbook, editado por Atassi y otros; Marcel Dekker Inc., Nueva York y Basel 1984, para una descripción de las pruebas ELISA). En algunas modalidades, la prueba bioquímica puede incluir un inmunoensayo múltiple potenciado con partículas con un sistema de detección basado en citometría de flujo (por ejemplo, LUMINEX®).

Se comprende que están disponibles los kit de ensayos comerciales (por ejemplo, ELISA) para diversas citocinas y factores de crecimiento. Por ejemplo, los kit de ELISA están disponibles de R&D systems. Puede medirse sFas, por ejemplo, mediante el uso del inmunoensayo para sFas humano Quantikine de R&D Systems. Pueden usarse además los arreglos y chips conocidos en la técnica.

EJEMPLOS

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Concentraciones de marcadores de TNF α y rutas mediadas por Fas y función renal en pacientes no proteinúricos con diabetes tipo 1

15 *Características de la población de estudio*

El grupo de estudio se seleccionó de la población que asistía a la Clínica Joslin, un centro importante para el tratamiento de pacientes de todas las edades con T1DM o T2DM. La población es aproximadamente 90 % caucásica, y la mayoría reside en el este de Massachusetts. Las descripciones detalladas de la población de la Clínica Joslin y el protocolo de reclutamiento para este estudio se han publicado anteriormente (Rosolowsky y otros, Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2008). Los criterios de elegibilidad incluían la residencia en Nueva Inglaterra, diabetes diagnosticada antes de los 40 años de edad, tratamiento con insulina, edad actual 18-64 años, duración de la diabetes 3-39 años, y mediciones múltiples en el intervalo de dos años anterior de hemoglobina A1c (HbA1c) y relación de albúmina a creatinina en orina (ACR). Para cada paciente, las mediciones de HbA1c se resumen por la media, y las mediciones de ACR por la mediana. Los criterios de exclusión incluían proteinuria (mediana de ACR \geq 250 para hombres y \geq 355 μ g/min para mujeres), ESRD, otras enfermedades graves, obesidad extrema (índice de masa corporal $>$ 40 kg/m²), o una mediana de HbA1c menor que 6,5 % (cerca de la normoglicemia).

Los reclutadores capacitados administraron una entrevista estructurada y un breve examen a los pacientes elegibles en una visita de rutina a la clínica, la visita de inscripción. La entrevista solicitó el antecedente de diabetes y su tratamiento, otros problemas de salud y el uso de medicamentos. El reclutador midió dos veces la presión sanguínea en posición de sentado (con cinco minutos de diferencia) con un monitor automático (Omron Healthcare, Inc) y las promedió para reducir la variabilidad y también obtuvo muestras de sangre y orina.

El uso actual y pasado de los medicamentos (particularmente los inhibidores de ACE, los bloqueadores de receptores de angiotensina II y otros medicamentos antihipertensivos) se registró durante la entrevista de inscripción y se complementó con el examen de los registros clínicos para confirmar las fechas de prescripción. Se extrajeron además todas las mediciones archivadas de laboratorio clínico de HbA1c, ACR y colesterol sérico. Los detalles de los ensayos usados se describieron anteriormente (Ficociello y otros, Clin J. Am. Soc. Nephrol., 2:461-469, 2007, y Krolewski y otros, N. Engl. J. Med., 332:1251-1255, 1995). Los valores de ACR se convirtieron a Tasa de Excreción de Albúmina (AER) de acuerdo con una fórmula publicada anteriormente (Krolewski, *arriba*). Para caracterizar las exposiciones recientes de los pacientes, las mediciones repetidas se resumen por su mediana (AER) o media (HbA1c, colesterol, lípidos).

Las muestras de sangre de la inscripción se extrajeron mediante venopunción en tubos de recolección estériles (SST Plus BD Vacutainer) (BD, NJ, Estados Unidos), se centrifugaron a 3600 rpm durante 10 minutos a 6 °C (Centrifuge 5810 R, Estados Unidos) y después se separaron en alícuotas en tubos criogénicos no pirogénicos no tóxicos, estériles de 1,5 ml (CRYOTUBES™ CRYOLINE™ System) [NUNC TM Serving Life Science, Estados Unidos] y se congelaron a -80 °C hasta el análisis adicional. La duración del almacenamiento, definida como el intervalo entre las fechas de recolección de la muestra y la determinación del ensayo (intervalo de 2 a 5 años), se incluyó como una covariable en el análisis para estimar el grado de degradación de cada analito durante el almacenamiento.

La concentración sérica de cistatina C (Dade Behring Diagnostics) se analizó en un nefelómetro BN PROSPEC™ System (Dade Behring Incorporated, Newark, DE, Estados Unidos). El intervalo de detección fue de 0,30 a 7,50 mg/L, y el intervalo de referencia informado para personas jóvenes, sanas fue de 0,53 a 0,95 mg/L. El coeficiente de variación intraindividuos para sujetos con diabetes fue de 3,8 y 3,0 por ciento en muestras de los cuartiles más bajos y más altos de la distribución de cistatina C, respectivamente (Perkins y otros, J. Am. Soc. Nephrol., 18:1353-1361, 2007).

La tasa de filtración glomerular estimada (cC-GFR ml/min) es el recíproco de cistatina C (mg/L) multiplicado por 86,7 y reducido al sustraer 4,2. Esta fórmula se desarrolló recientemente por Maclsaac y otros, *como arriba*, como un estimado confiable de GFR en pacientes con diabetes. El método usado para medir cistatina-C fue similar con respecto al ensayo, el equipo, y el coeficiente de variación según lo informado por Maclsaac, *arriba*.

El grupo de estudio incluía 667 participantes: 304 con MA y 363 con normoalbuminuria. Las características seleccionadas en su inscripción se resumen en la Tabla 1 de acuerdo con el grupo de AER. En el grupo de NA, los percentiles 25, 50 y 75 de la distribución de AER (11, 15, y 21 μ g/min) se centraron en el intervalo de NA ($<$ 30 μ g/min)], pero en el grupo de MA estos percentiles de AER (45, 69, 131 μ g/min) estuvieron completamente en la mitad inferior del

intervalo de MA (30-300 $\mu\text{g}/\text{min}$). En comparación con el grupo de NA, el grupo de MA tenía una edad más avanzada, una mayor proporción de hombres, una mayor duración de la diabetes, una mayor HbA1c y una cC-GFR significativamente menor. La diferencia en cC-GFR entre los dos grupos de estudio fue más clara cuando la función renal se agrupó en categorías, las dos últimas de las cuatro que corresponden a deficiencia leve y moderada de la función renal, presente en el 36 % del grupo de MA pero solo en el 10 % del grupo de NA.

Tabla 1. Características del grupo de estudio de acuerdo con el estado de albuminuria.

Características	NORMO-ALBUMINURIA (n=363)	MICRO-ALBUMINURIA (n=304)	P
AER* ($\mu\text{g}/\text{min}$)	15 (11-21)	69 (45-131)	por diseño
Edad (años)	39 \pm 12	41 \pm 12	<0,05
Varón (%)	44 %	61 %	<0,0001
Duración de la diabetes (años)	20 \pm 9	23 \pm 10	<0,0001
HbA1c† (%)	8,3 \pm 1,2	8,6 \pm 1,5	<0,01
cC-GFR‡ (ml/min/ 1,73 m ²)	118 \pm 24	99 \pm 27	<0,0001
categorías de cC-GFR:			
>130 ml/min	30 %	10%	
90-130	61 %	54 %	
60-89	9 %	28 %	
<60	1 %	8 %	
Los datos son la media \pm desviación estándar o mediana (cuartiles) o %.			
* AER: mediana de la tasa de excreción de albúmina durante la ventana de 2 años anterior			
† HbA1c: media de hemoglobina A1c durante la ventana de 2 años anterior			
‡ cC-GFR: tasa de filtración glomerular estimada en base a la cistatina-C sérica			

35

40

45

50

Para distinguir las contribuciones relativas de AER y de diversas características clínicas a la gran variación en la función renal dentro del grupo de estudio, los grupos de NA y MA se dividieron en la mediana de cC-GFR específica de grupo (115 y 101 ml/min, respectivamente) en grupos con mayor y menor cC-GFR (Tabla 2). Las medianas (percentiles 25, 75) de las distribuciones resultantes de cC-GFR en los grupos de NA fueron 136 (125, 148) y 102 (92, 109) ml/min y en los grupos de MA fueron de 115 (108, 124) y 82 (64, 91) ml/min. Todas las características de la [Tabla 2](#) fueron significativamente diferentes entre los grupos de NA y MA, pero muchas no fueron significativamente diferentes entre los grupos con mayor y menor cC-GFR (ANOVA de dos vías). Por ejemplo, las asociaciones esperadas de HbA1c más alta, presión sanguínea sistólica y colesterol sérico con MA estuvieron presentes, al igual que las asociaciones de fumar cigarrillos y el tratamiento con un ACEi o ARB. Sin embargo, ninguna de estas características se asoció con menor cC-GFR. Por el contrario, la edad avanzada y la duración más prolongada de la diabetes se asociaron significativamente tanto con MA como con menor CC-GFR, al igual que la evidencia de la atención médica representada por el tratamiento con agentes antihipertensivos o hipolipemiantes.

Tabla 2. Características del grupo de estudio de acuerdo con el estado de albuminuria y la mediana de cC-GFR específica de grupo.

Característica	NORMOALBUMINURIA		MICROALBUMINURIA		GRUPO DE CONTRASTE	
	cC-GFR > 115	cC-GFR < 115	cC-GFR > 101	cC-GFR < 101	AER	cC-GFR
	(n=183)	(n=180)	(n=152)	(n=152)	P*	P†
(µg/min)	13 (10-18)	18 (12-23)	56 (42-100)	85 (51-161)	<i>Por diseño</i>	<0,0001
Edad (años)	37 ± 11	40 ± 13	36 ± 12	45 ± 11	<0,05	<0,0001 ‡
Duración de la diabetes (años)	19 ± 9	21 ± 10	20 ± 9	26 ± 9	<0,0001	<0,0001 ‡
HbA1c (%)	8,3 ± 1,2	8,3 ± 1,2	8,7 ± 1,6	8,4 ± 1,4	<0,005	ns
BMI (kg/m ²)	25,6 ± 3,6	26,7 ± 4,3	27,2 ± 4,8	27,7 ± 5,2	<0,0005	<0,05
BP sistólica (mmHg)	118 ± 12	120 ± 13	124 ± 12	125 ± 15	<0,0001	ns
Rx ACEI o ARB (%)	18 %	21 %	49 %	55%	<0,0001	ns
Rx antihipertensivo (%)	7 %	16 %	14 %	30 %	<0,001	<0,0001
Colesterol sérico (mg/dl)	183 ± 29	181 ± 29	190 ± 33	193 ± 30	<0,0001	ns
Rx hipolipemiente (%)	24%	34%	31 %	42 %	<0,05	<0,005
Fumador actual (%)	9 %	12 %	19 %	18 %	<0,005	ns

Los datos son la media± desviación estándar o mediana (cuartiles) o %.
 * Valor de P para el efecto principal de la albuminuria en una ANOVA
 † Valor de P para el efecto principal de la cC-GFR en una ANOVA;

40 *Marcadores séricos de inflamación o apoptosis y función renal insuficiente*

45 Todos los marcadores se midieron mediante un inmunoensayo Las muestras se descongelaron, se agitaron en vórtex y se centrifugaron, y las mediciones se realizaron en el sobrenadante. Se midieron sTNFR1, sTNFR2 e IL-6 mediante el uso de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (DRT100, DRT200 e inmunoensayo de alta sensibilidad HS600B, respectivamente) (R&D, Minneapolis, MN, Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La interleucina-6 (IL-6) se midió solo en un subconjunto del grupo de estudio (156 individuos). Las concentraciones séricas de los otros marcadores proteicos se midieron en una corrida de ensayos múltiples en una plataforma de Luminex. Este es un inmunoensayo múltiple en fase líquida, de tipo sandwich, potenciado con partículas con un sistema de detección basado en láser en base a citometría de flujo. El panel de adipocina B (HADK2-61K-B) [Linco-Milipore, Estados Unidos] se usó para medir TNFα; el Panel de Sepsis-Apoptosis humana (HSEP-63K) [Linco-Milipore, Estados Unidos] se usó para medir sFas, sFasL, sICAM-1 y sVCAM-1; y e kit Beadlyte® Human Multi-Cytokine Detection (48-011) [Upstate-Milipore, Estados Unidos] con el protocolo B se usó para medir IL8, IP10, MCP1. Los protocolos proporcionados por los vendedores fueron los siguientes. En resumen, el método incluía el uso de placas de filtro de 96 pocillos [Milipore, Estados Unidos], los anticuerpos de captura específicos para cada analito unidos covalentemente a microesferas fluorescentemente marcadas, anticuerpos de detección biotinilados y estreptavidina-ficoeritrina. La detección incorpora dos láseres y un sistema de fluidos de alta tecnología [Luminex 100S, Austin, Tx, Estados Unidos]. Los valores de la mediana de la intensidad de fluorescencia se ajustaron a una curva estándar logística de 5 parámetros (Gottschalk y otros, Anal. Biochem., 343:54-65, 2005).

60 Las sensibilidades del ensayo fueron: TNFα, 0,14 pg/ml; sTNFR1 y sTNFR2, 0,77 pg/ml; sFas, 7 pg/ml; sFasL, 6 pg/ml; sICAM-1, 30 pg/ml; sVCAM-1, 33 pg/ml; IL8, 0,7 pg/ml; IP10, 1,2 pg/ml; MCP1, 1,9 pg/ml; IL-6, 0,04 pg/ml. Si se requería, las muestras se diluyeron (sTNFR1, sTNFR2, sFAS, sFASL, sICAM-1, y sVCAM-1). El número de ciclos de congelación y descongelación fue uno para todas las mediciones de TNFα, IL8, IP10, MCP1 y para la mayoría de las mediciones de los otros analitos. El número no excedió a dos para ninguna medida.

65

5 Se prepararon dos controles séricos internos de la misma forma que las muestras de estudio y se almacenaron en un gran número de alícuotas a -80 °C. Las alícuotas de los dos controles se incluyeron en cada ensayo (Aziz y otros, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 5:755-761, 1998) para estimar el CV inter-ensayo. Para la mayoría de los ensayos, el CV inter-ensayo estuvo entre 8,5 % y 15,8 % (15,8 % para TNF α , 13,0 % para sTNFR1, 12,7 % para sTNFR2, 8,5 % para sFas, 13,5 % para sFasL, 8,1 % para sVCAM-1, y 14,7 % para IP10). Este fue superior para los tres restantes (25,2 % para sICAM-1, 33,3 % para IL8, y 28,4 % para MCP1). El inmunoensayo para TNF α , sFas y sFasL detecta las tres formas de la proteína, mientras que el ELISA para sTNFR1 y sTNFR2 detecta la cantidad total de proteína, libre y unida a su ligando TNF α , (información proporcionada por el fabricante).

10 Las concentraciones séricas de los marcadores de inflamación o apoptosis se examinaron de la misma forma que las características mostradas en la Tabla 2. Cuatro marcadores (sTNFR1, sTNRF2, sFas, y sICAM-1) se asociaron significativamente tanto con AER como con cC-GFR (Tabla 3). TNF α y IP-10) se asociaron significativamente solo con el grupo de cC-GFR y dos (IL-8 y CRP) se asociaron significativamente solo con el grupo de AER.

15 Los análisis se hicieron en SAS (Instituto SAS, Cary, NC, versión 9.1.3). Las pruebas T y las pruebas de Chi-cuadrado con alfa=0,05 se usaron para variables y frecuencias continuas, respectivamente. Los análisis en las Tablas 2 y 3 y la Figura 1 fueron las ANOVA para el diseño desequilibrado. La regresión lineal con cC-GFR como variable dependiente se usó para el análisis multivariado. AER y las concentraciones séricas de los marcadores se transformaron a sus logaritmos para el análisis. Los datos faltantes para los marcadores séricos nunca disminuyeron la muestra del estudio
20 en más del 5 % en ningún modelo, por lo tanto no se tomó ninguna acción para remediarlo.

Para los seis marcadores asociados significativamente con cC-GFR en la Tabla 3, los patrones de asociación se ilustran en las Figuras 1A-F. Por separado para los grupos de NA y MA, los pacientes se agruparon de acuerdo con los terciles de la distribución de cada marcador, y la cC-GFR media para cada subgrupo se representó como una barra vertical. En
25 ambos grupos de AER, la disminución de cC-GFR con la concentración de marcador en aumento fue más pronunciada para sTNFR1 y sTNFR2. El patrón fue similar para TNF α pero las diferencias entre los subgrupos fueron menores. Para los tres marcadores, la disminución parece más pronunciada en el grupo de MA que en el grupo de NA. Para los tres marcadores restantes (sICAM-1, IP10 y sFas), un patrón de diferencias entre los subgrupos fue menos aparente.

30 **Tabla 3: Concentraciones séricas de los marcadores de inflamación o apoptosis de acuerdo con el grupo de AER y cC-GFR por encima de o por debajo de la mediana**

		NORMOALBUMINURIA		MICROALBUMINURIA		GRUPO DE CONTRASTE	
		cC-GFR > 115	cC-GFR < 115	cC-GFR > 101	cC-GFR < 101	AER	cC-GFR
		(n=182)	(n=181)	(n=152)	(n=152)	P*	P†
<i>ruta mediada por TNF</i>							
TNF α	pg/ml	3,6 (2,3, 4,8)	3,9 (2,8, 5,8)	4,0 (2,6, 5,4)	4,8 (3,3, 6,4)	ns	<0,005
sTNFR1	ng/ml	1,2 (1,0, 1,4)	1,4 (1,2, 1,7)	1,4 (1,2, 1,6)	2,0 (1,6, 2,5)	<0,0001	<0,0001
sTNFR2	ng/ml	2,1 (1,7, 2,6)	2,6 (2,1, 3,6)	2,3 (1,9, 2,9)	3,2 (2,5, 5,4)	<0,0001	<0,0001
<i>Efectores potenciales de regulación negativa:</i>							
Quimiocinas							
IL-8	pg/ml	4,4 (2,4, 10,4)	6,1 (3,4, 13,3)	7,6 (3,8, 18,3)	7,0 (4,0, 15,5)	<0,05	ns
IP-10	pg/ml	107 (79, 136)	122 (88, 171)	102 (75, 141)	115 (80, 158)	ns	<0,001
MCP-1	pg/ml	124 (75, 184)	120 (77, 184)	113 (78, 191)	105 (77, 174)	ns	ns

Moléculas de adhesión							
5	sICAM-1	ng/ml	133 (109, 152)	137 (119, 169)	149 (123, 173)	152 (123, 191)	<0,0005 <0,005
	sVCAM-1	ng/ml	386 (301, 481)	389 (303, 489)	376 (295, 467)	394 (330, 495)	ns ns
10	<i>ruta mediada por Fas</i>						
	sFasL	pg/ml	0,12 (0,08, 0,19)	0,13 (0,07, 0,20)	0,12 (0,08, 0,18)	0,11 (0,06, 0,16)	ns ns
15	sFas	ng/ml	3,8 (3,0, 4,7)	4,5 (3,7, 5,5)	4,5 (3,6, 5,6)	5,4 (3,7, 6,9)	<0,0001 <0,0001
	<i>Otros marcadores inflamatorios</i>						
20	CRP	µg/ml	1,2 (0,5, 3,2)	1,1 (0,6, 2,7)	1,4 (0,5, 3,9)	1,6 (0,8, 3,2)	<0,05 ns
	IL-6	pg/ml	0,8 (0,6, 1,4)	0,9 (0,7, 1,5)	0,8 (0,4, 1,3)	0,9 (0,6, 2,2)	ns ns
Los datos son medianas (cuartiles); los análisis se hacen sobre concentraciones transformadas a sus logaritmos. * Valor de P para el efecto principal de la albuminuria en una ANOVA; † Valor de P para el efecto principal de cC-GFR en una ANOVA;							

Estos marcadores se estudiaron aún más mediante el examen de sus correlaciones entre sí, y con las dos medidas de nefropatía, cC-GFR y AER (Tabla 4). Las correlaciones negativas entre los seis marcadores y cC-GFR recapitulan las asociaciones negativas mostradas en la Tabla 3 y la Figura 1. Todos los pares de marcadores están significativamente correlacionados, pero los coeficientes son generalmente modestos. Solo la correlación de los dos receptores (sTNFR1 y sTNFR2) con cC-GFR y entre sí excedió a 0,50. Note las correlaciones bajas (aunque significativas) entre TNFα y sus receptores (r=0,11 para TNFα/sTNFR1 y r=0,20 para TNFα/sTNFR2).

Tabla 4: Coeficientes de correlación de Spearman entre cC-GFR, AER y marcadores séricos de inflamación y apoptosis en el grupo de estudio

	AER	TNFα	sTNFR1	sTNFR2	sFas	IP-10	sICAM
cC-GFR	-0,31	-0,15	-0,57	-0,56	-0,27	-0,13*	-0,17
AER	1,00	0,11	0,41	0,28	0,04‡	-0,12†	0,20
TNFα		1,00	0,11*	0,20	0,34	0,19	0,17
sTNFR1			1,00	0,81	0,26	0,20	0,21
sTNFR2				1,00	0,32	0,26	0,27
sFas					1,00	0,14*	0,12*
IP-10						1,00	0,14*
sICAM							1,00

* p<0,01, † p<0,05 ‡ p=ns, por el contrario todos los demás p<0,0001,

La independencia de las asociaciones de estos seis marcadores de inflamación o apoptosis con cC-GFR se examinó en modelos de regresión múltiple. Solo sTNFR1, sTNFR2 y sFAS permanecieron significativos cuando se incluyeron todos en el modelo. Si bien sTNFR2 fue estadísticamente significativo en este modelo, su contribución fue pequeña debido a su alta colinealidad con sTNFR1, por lo que no se mantuvo en el modelo posterior. Lo más notable sobre este modelo fue que los marcadores séricos solos (sTNFR1 y Fas) explicaron el 41 % de la variación en cC-GFR (r2 ajustado) y la adición de la edad y AER al modelo aumentó el r2 ajustado a solo el 45 % (Tabla 5). La adición de las covariables clínicas de la Tabla 2 no mejoró el r2 ajustado. La influencia relativa de estas covariables sobre cC-GFR se resume en la Tabla 5 mediante el cC-GFR estimado en los percentiles 25, 50 y 75 de cada covariable, con y sin el ajuste para otras covariables.

Tabla 5: cC-GFR media en los percentiles 25, 50 y 75 de cada covariable significativa y los estimados correspondientes ajustados para las otras covariables

Covariado	Percentil	Análisis univariado		Análisis multivariado*	
		cC-GFR (ml/min/1,73m ²)	valor de p	cC-GFR (ml/min/1,73m ²)	valor de p
Edad [años]			<0,0001		<0,002
31	25	115		114	
40	50	109		112	
48	75	104		110	
AER [µg/min]			<0,0001		<0,0001
22	25	119		115	
39	50	111		112	
79	75	102		108	
sTNFR1 [pg/ml]			<0,0001		<0,0001
1216	25	121		120	
1442	50	112		112	
1764	75	101		103	
sFas [pg/ml]			<0,0001		<0,008
3.63	25	112		113	
4.50	50	110		112	
5.72	75	107		111	

*r² ajustado para el modelo multivariado fue de 0,45, mientras que fue de 0,41 después del ajuste para sTNFR1 y sFas solo. Los ajustes para género, HbA1c, bmi, tratamiento antihipertensivo e hipolipemiente, y la duración de almacenamiento de las muestras no modificaron las asociaciones significativamente.

El efecto sobre cC-GFR es el más pronunciado para sTNFR1, y apenas se modifica por el ajuste multivariado. El ajuste para las otras covariables clínicas potencialmente relevantes - tales como el género, la hemoglobina A1c, el índice de masa corporal, el tratamiento renoprotector y otro tratamiento antihipertensivo y tratamiento hipolipemiente, y la duración del almacenamiento de las muestras séricas no modificaron la asociación de sTNFR1 y Fas con cC-GFR. Cuando se repitió el análisis mediante el uso de sTNFR2 en lugar de sTNFR1, el resultado fue similar, lo que indica que la medición de cada receptor produce aproximadamente la misma información.

El enfoque principal de este estudio estuvo en cC-GFR (no sobre albuminuria) como un resultado en la nefropatía diabética temprana y en su intento de diferenciar el efecto observado de los marcadores sobre GFR a partir de sus asociaciones potenciales con AER. Se realizaron los análisis uni y multivariados. En los análisis univariados, seis marcadores no se relacionaron con la función renal (CRP, IL-6, IL-8, MCP-1, sVCAM-1, y sFasL) y seis se asociaron significativamente con la variación en cC-GFR (TNFα, sTNFR1, sTNFR2, sFas, sICAM-1, e IP10). Entre los seis, la asociaciones de los receptores de TNF con la disminución de cC-GFR fueron las más fuertes.

En base al análisis multivariado, de los seis marcadores, solo las concentraciones de sTNFR1, sTNFR2 y sFas contribuyeron independientemente a cC-GFR. El efecto de los receptores de TNF sobre cC-GFR fue mucho más pronunciado que los efectos de las covariables clínicas como la edad y AER (Tabla 5). Además, las concentraciones séricas de sTNFR1 y sTNFR2 se correlacionan altamente (Spearman r=0,81) y muestran aproximadamente las mismas asociaciones con cC-GFR.

Este estudio proporciona por primera vez evidencia de que los marcadores de las rutas mediadas por TNFα y Fas se asocian fuertemente con la variación de cC-GFR en pacientes con T1DM y nefropatía diabética temprana. Esta asociación es independiente de la asociación de estos marcadores con AER. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la inflamación y la apoptosis están implicadas en el deterioro temprano de la función renal en T1DM.

Otros estudios transversales en T1DM informaron que las concentraciones séricas de marcadores relacionados con TNFα se elevaron en comparación con sujetos sanos y que las concentraciones más altas de estos marcadores se asociaron con excreción elevada de albúmina en orina (Zoppini, como arriba, y Schram y otros, Diabetologia, 48:370-378, 2005). La asociación transversal entre las concentraciones séricas de sTNFRs y la variación de GFR se ha

demostrado en T2DM (Lin y otros, *Kidney. Int.*, 69:336-342, 2006) así como en individuos no diabéticos (Keller y otros, *Kidney. Int.*, 71:239-244, 2007 y Knight y otros, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:1897-1903, 2004). En el estudio prospectivo CARE, se encontró que las altas concentraciones séricas de sTNFR2 estaban asociadas con una evolución más rápida de la pérdida de la función renal (Tonelli y otros, *Kidney. Int.*, 68:237-245, 2005). Sin embargo, todos los sujetos en ese estudio tenían enfermedad renal crónica (GFR<60ml/min/1,73m²) al inicio del mismo.

Se puede argumentar que la asociación de receptores de TNF α y cC-GFR simplemente refleja un manejo renal deficiente de estas proteínas. De hecho, estos receptores son eliminados principalmente por los riñones como lo demuestran los estudios con trazadores de sTNFR2 radiomarcado en animales (Bemelmans y otros, *Cytokine*, 6:608-615, 1994). Además las concentraciones séricas de receptores de TNF solubles aumentan en la insuficiencia renal avanzada, como se demuestra en los estudios en ratones bi-nefrectomizados (Bemelmans, arriba) y en seres humanos (Brockhaus y otros, *Kidney. Int.*, 42:663-667, 1992). Sin embargo, la mayoría de los pacientes en este estudio tenían una función renal normal, e incluso la pérdida de la función renal que resulta de la uni-nefrectomía no eleva las concentraciones de receptores de sTNF séricas en animales. Además, las concentraciones séricas de sFasL, que tiene una masa molecular similar a los receptores de TNF solubles, no se asocian con cC-GFR, mientras que los receptores se asocian fuertemente con la variación de cC-GFR. En base a estos datos la eliminación potencialmente disminuida de esas moléculas no es la explicación más probable de estos hallazgos.

Las moléculas de adhesión y las quimiocinas son efectores potenciales de regulación negativa de la ruta inflamatoria de TNF - sTNFRs (Segeer, *arriba*). La expresión del ARNm de IL-8, MCP-1, e IP-10 se induce en PBMNC activada por TNF α tomada de individuos con diabetes, pero no de individuos sanos (Wong, *como arriba*). La expresión y las concentraciones séricas de quimiocinas y moléculas de adhesión, VCAM-1 e ICAM-1, aumenta a medida que se desarrolla la nefropatía diabética (Wong, *como arriba*, y Nelson y otros, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20:2420-2426, 2005). En el análisis multivariado descrito aquí, las concentraciones séricas de IP-10 y sICAM-1 se asociaron con la variación de cC-GFR y se correlacionaron con sus reguladores potenciales de regulación positiva. Sin embargo, los efectos observados fueron débiles, y desaparecieron en el análisis multivariado, como podría esperarse si su efecto no fuera independiente de los receptores de TNF o sFas.

El análisis de la ruta mediada por Fas reveló un efecto independiente de la concentración sérica de sFas en la variación de cC-GFR y la falta de un efecto de la concentración sérica de sFasL. Un patrón similar de efectos dispares de sFas y sFasL se demostró anteriormente en individuos con enfermedad renal avanzada (Perianayagam, *arriba*). Además, en un pequeño número de individuos con T1DM y sin proteinuria, se informó que sFas se correlacionaba tanto con ACR como con GFR (Protopsaltis y otros, *Med. Princ. Pract.*, 16:222-225, 2007).

El mecanismo de acción del receptor de Fas soluble no se conoce bien, pero puede ser similar al de los receptores de TNF en que conduce a una mayor respuesta mediada por Fas en el riñón. El sistema relacionado con Fas está implicado principalmente en la regulación de la apoptosis. (Schelling, *arriba*), mientras que el sistema de TNF regula las respuestas apoptóticas e inflamatorias. Consistente con esto es la apoptosis tubulointerstitial observada en ratas diabéticas inducidas por estreptozocina (Kumar, *arriba*) y en riñones diabéticos humanos (Kumar, *arriba*). Alguna evidencia sugiere también que TNF α puede inducir la apoptosis medida por Fas (Elzey y otros, *J. Immunol.* 167:3049-3056, 2001 y Boldin y otros, *J. Biol. Chem.*, 270:387-391, 1995). En este estudio las concentraciones séricas de TNF α y sFas se correlacionaron marcadamente.

Las correlaciones relativamente bajas entre TNF α y sus receptores puede ser el resultado de una baja detección de TNF α unido a sus receptores y su asociación con cC-GFR que es más débil que la de sus receptores.

En conclusión, este estudio proporciona la primera evidencia clínica de que los marcadores de las rutas mediadas por TNF y Fas están fuertemente asociados con la tasa de filtración glomerular en pacientes con T1DM y NA o MA. sTNFR1, sTNFR2 y sFas son los marcadores que representan estas asociaciones con mayor fuerza.

Ejemplo 2: Las concentraciones séricas de TNF α , el receptor de TNF tipo 1 y 2 soluble y Fas predicen fuertemente el deterioro temprano de la función renal en sujetos humanos con diabetes tipo 1 y sin proteinuria y conllevan un fuerte potencial diagnóstico.

La tasa de filtración glomerular (GFR) comienza a deteriorarse antes de que se produzca la proteinuria en la diabetes tipo 1 (Perkins y otros, *J Am Soc Nephrol.* 18:1353-1361, 2007). Este fenómeno se denomina "deterioro temprano de la función renal" (ERFD). El marcador diagnóstico clínicamente aprobado para la evolución de la nefropatía diabética, microalbuminuria (MA), no predice el deterioro de la función renal suficientemente en esta etapa temprana. En primer lugar, la presencia de MA no es necesaria para que se produzca el deterioro de la función renal. En segundo lugar, solo una proporción de personas con MA desarrolla el deterioro de la función renal (Perkins y otros, 2007, *arriba*). Existe una necesidad urgente de nuevas herramientas de diagnóstico que puedan identificar pacientes con un alto riesgo de evolución e implementar estrategias terapéuticas mejoradas.

En la población de 667 pacientes con diabetes tipo 1 y sin proteinuria descritos en el Ejemplo 1, las concentraciones séricas de TNF α , receptor de TNF tipo 1 soluble (sTNFR1), TNFR2 soluble, y Fas soluble se asociaron con menos GFR en la fase transversal. La siguiente fase prospectiva del estudio incluía el subconjunto de 398 pacientes a los que se les

dio seguimiento durante 3-5 años. Las concentraciones séricas de TNF α , sTNFR1, sTNFR2 y Fas surgieron como predictores fuertes del deterioro de GFR con una fuerza al menos comparable con la microalbuminuria. Las mediciones repetidas en el tiempo se realizaron para evaluar la variación intraindividuo y su impacto en la predicción.

5 Para validar estos hallazgos el estudio se replicó en una muestra poblacional independiente de la población diabética de tipo 1 del 1er Estudio Renal de Joslin (n= 299, periodo de observación de 8-12 años). Los resultados, mostrados en las Figuras 2A-2B, demuestran que el efecto predictivo de estos cuatro marcadores es comparablemente fuerte.

10 En resumen, la asociación de las concentraciones séricas de TNF α , STNFR1, STNFR2, y sFas con ERFD se validó en sujetos con diabetes tipo 1 en el estudio transversal (ver el Ejemplo 1), un estudio prospectivo que incluía mediciones repetidas y la consideración de los factores clínicos de confusión, y se replicaron más aún en la muestra poblacional independiente. Esto demuestra fuertemente que la implementación de estos marcadores fortalecerá significativamente el algoritmo de diagnóstico para identificar sujetos con diabetes tipo 1 y nefropatía diabética temprana con riesgo de deterioro de la función renal.

15 Los estudios anteriores sobre marcadores inflamatorios se enfocaron en la excreción de albúmina, o en etapas mucho más avanzadas de la nefropatía diabética. Los presentes resultados demuestran el fuerte potencial de diagnóstico de estos marcadores para la predicción de GFR, el lugar de albuminuria; como se analizó anteriormente, GFR es un marcador de ERFD mucho más preciso que la albuminaria. Además, estos resultados (es decir, los estudios prospectivos y de replicación) demuestran la utilidad de estos marcadores en las etapas muy tempranas de la nefropatía diabética.

20 Ejemplo 3: Las concentraciones séricas de TNF α , receptores de TNF de tipo 1 y 2 solubles, Fas soluble, e IL-6 predicen el deterioro de la función renal en sujetos humanos con diabetes tipo 2

25 *Selección de sujetos*

El grupo de estudio incluía 404 individuos con diabetes tipo 2 y normoalbuminuria (NA), microalbuminuria (MA), y proteinuria (PT), que asistieron a la clínica Joslin. Las características del grupo de estudio, clasificadas de acuerdo con la Tasa de Excreción de Albúmina (AER), se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Características del grupo de estudio de acuerdo con el estado de AER.

Características	NA (n=217)	MA (n=127)	PT (n=60)
Edad (años)	55± 10	56± 9	58± 10
Duración de la DM (años)	12± 8	14± 8	16± 8
cC-GFR (ml/min/1,73m ²)	110± 30	95± 34	76± 32
categorías de cC-GFR			
>120 ml/min	32,3 %	22,1 %	13,3 %
>90 ml/min	44,2 %	29,9 %	15,0 %
60 a 89 ml/min	19,8 %	32,3 %	36,7 %
<60 ml/min	3,7 %	15,8 %	35,0 %

50 *Análisis de marcadores séricos*

Las concentraciones séricas de TNF α , receptor de TNF 1 soluble (sTNFR1), receptor de TNF 2 soluble (sTNFR2), moléculas de adhesión intracelulares y vasculares solubles (sICAM-1 y sVCAM-1, respectivamente), Fas soluble (sFas), IL-6, y CRP se midieron en cada uno de los sujetos mediante ELISA o mediante el uso de la plataforma Luminex®. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 7: Mediana de las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores de inflamación, apoptosis, y función endotelial de acuerdo con el estado de AER y la mediana de GFR específica de grupo.

Marcadores plasmáticos	NA		MA		PT		Grupo de contraste	
	GFR>108 (n=111)	GFR≤108 (n=106)	GFR>91 (n=64)	GFR<91 (n=63)	GFR>71 (n=30)	GFR<71 (n=30)	AER P	GFR P
TNFα (pg/ml)	3,3	5,1	3,5	6,4	5,2	5,3	<0,05	<0,0001
sTNFR1 (pg/ml)	1009	1394	1162	1891	1516	2707	<0,0001	<0,0001
sTNFR2 (pg/ml)	1913	2614	2236	3416	2959	4801	<0,0001	<0,0001
sFas (pg/ml)	5,0	6,8	5,3	7,7	7,2	9,3	<0,0001	<0,0001
OPG (pg/ml)	279	377	316	425	359	476	<0,0001	NS
OPN (pg/ml)	825	1080	1013	1716	1835	2918	<0,005	NS
IL6 (pg/ml)	1,1	2,0	2,0	2,4	2,2	2,4	<0,0001	<0,001
CRP (mg/L)	1,8	4,0	4,1	3,9	3,7	5,0	<0,0005	NS
sICAM-1 (ng/ml)	161	179	172	181	191	176	<0,01	NS
sVCAM-1 (ng/ml)	450	481	404	481	481	523	<0,05	NS

Tabla 8: Coeficientes de correlación de Spearman entre los biomarcadores plasmáticos de inflamación, apoptosis, y función endotelial.

	TNFα	sTNFR1	sTNFR2	IL6	CRP	sFas	OPG	OPN	sICAM-1	sVCAM-1
GFR	-0,48*	-0,84*	-0,79*	-0,42*	-0,23*	-0,58*	-0,44*	-0,27*	-0,21*	-0,27*
TNFα	1.00	0,49*	0,54*	0,28*	0,15‡	0,47*	0,38*	0,17†	0,31*	0,34*
sTNFR1		1.00	0,89*	0,51*	0,29*	0,68*	0,46*	0,24*	0,31*	0,33*
sTNFR2			1.00	0,47*	0,27*	0,65*	0,41*	0,19†	0,34*	0,38*
IL6				1.00	0,58*	0,34*	0,33*	0,05	0,33*	0,13§
CRP					1.00	0,12§	0,26*	-0,05	0,25*	-0,11§
sFas						1.00	0,53*	0,24*	0,33*	0,36*
OPG							1.00	0,15‡	0,29*	0,28*
OPN								1.00	0,05	0,27*
sICAM-1									1.00	0,22*
sVCAM-1										1.00

Se realizó un análisis transversal de los datos presentados en las Tablas 7-8. Específicamente, los niveles de marcadores se analizaron en 364 individuos del grupo mostrado en la Tabla 6 con GFR mayor que o igual a 60 ml/minuto/1,73m² y ya sea con excreción normal de albúmina en orina (NA; n=217 de 346) o microalbuminuria (MA; n=129 de 346). Los datos se muestran en la Tabla 9. Ninguno de estos sujetos analizados mostró signos de enfermedad cardíaca isquémica.

Tabla 9: Mediana de las concentraciones plasmáticas de los marcadores de inflamación o apoptosis de acuerdo con AER y GFR.

	Normoalbumuria		Microalbuminuria	
	cC-GFR > 118	cC-GFR < 118	cC-GFR >107	cC-GFR < 107
Marcador plasmático	n=106	n=105	n=58	n=55
TNF α (pg/ml)	3,3	4,7	3,4	5,3
sTNFR1 (ng/ml)	1,0	1,3	1,2	1,8
sTNFR2 (ng/ml)	1,9	2,6	2,2	3,1
sFas (pg/ml)	5,0	6,5	5,2	7,6
IL-6 (pg/ml)	1,1	1,9	2,0	2,2
P = 0,0001				

Como se demostró anteriormente, las mayores concentraciones de TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sFas, e IL-6 se asociaron fuertemente con menor GFR en sujetos con NA y sujetos con MA. Estas asociaciones permanecieron altamente significativas (p<0.0001) después del ajuste para edad, género, y el estado de albuminuria. Las asociaciones entre GFR y CRP, sICAM-1, y sVCAM-1 fueron significativas en el límite.

Estas observaciones sugieren que la evaluación en suero de los marcadores TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sFas, e IL-6 puede usarse para predecir ERFD en diabéticos tipo 2 con NA y MA.

Ejemplo 4: Las concentraciones séricas del receptor de TNF 1 soluble predice la enfermedad renal en la etapa terminal en sujetos con proteinuria basal

Selección de sujetos

Se les dio seguimiento a 434 sujetos que asistían a la Clínica de Diabetes de Joslin con diabetes tipo 1 y proteinuria basal durante un promedio de 8 años y se evaluó la evolución a la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) como un resultado.

Análisis de marcadores séricos

Las concentraciones séricas de receptor de TNF 1 soluble (sTNFR1) se midieron mediante el uso de ELISA. Después se evaluaron las asociaciones entre los niveles séricos de sTNFR1 y la enfermedad renal en etapa terminal controlada para la etapa inicial de la enfermedad renal crónica. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Niveles de sTNFR1 en sujetos con proteinuria basal

TNFR1 [pg/ml]	ESRD	Núm. del sujeto	Media	Q1	Q3
CKD <3	0	213	2078	1728	2437
	1	28	2242	1756	3062
CKD = 3	0	78	3199	2719	3899
	1	46	4156	3172	4772
CKD > 3	0	9	5518	4869	8327
	1	60	6605	5402	7590

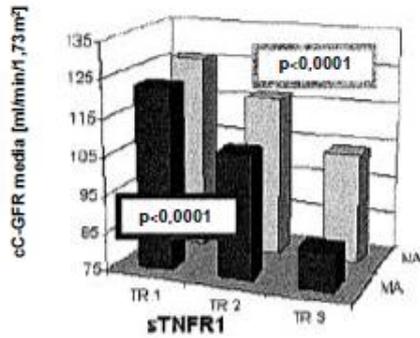
Como se muestra en la Tabla 10, los niveles séricos de sTNFR1 se asocian con CKD (como se evaluó mediante GFR) y ESRD. La asociación entre sTNFR1 y ESRD permaneció significativa después del ajuste para CKD en etapa inicial.

Estas observaciones apoyan que sTNFR1 puede usarse para predecir la evolución de la nefropatía diabética. Además, estas observaciones apoyan que sTNFR1 puede usarse para predecir ESRD en pacientes con diabetes tipo 1 y proteinuria.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar si un sujeto humano tiene un mayor riesgo de desarrollar un deterioro temprano de la función renal, el método que comprende:
 5 medir los niveles de uno o más biomarcadores en una muestra de un sujeto humano con normoalbuminuria, microalbuminuria, o proteinuria, dichos marcadores seleccionados del grupo que consiste en el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), receptor de TNF tipo 1 soluble (sTNFR1), TNFR2 soluble (sTNFR2), Fas soluble (sFas), e interleucina-6 (IL-6);
 10 comparar los niveles del sujeto con los niveles de referencia de dicho uno o más biomarcadores; y
 determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar un deterioro temprano de la función renal en base a la comparación de los niveles del sujeto con los niveles de referencia.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de niveles de los uno o más biomarcadores en la muestra del sujeto a niveles que son significativamente mayores que los niveles de referencia indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar un deterioro temprano de la función renal.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra comprende el suero del sujeto.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene diabetes tipo 1 o tipo 2.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto no presenta ninguno de los signos o síntomas clínicos de enfermedad cardíaca crónica u opcionalmente, enfermedad cardíaca isquémica.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene una tasa de filtración glomerular de 90 ml/minuto o más.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dichos biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en el receptor del Factor de Necrosis Tumoral tipo 1 soluble (sTNFR1) y TNFR2 soluble (sTNFR2).
- 30 8. Un método para determinar si un sujeto humano tiene un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica, o enfermedad renal en etapa terminal, o ambas, el método que comprende:
 35 medir el nivel del receptor de TNF tipo 1 soluble (sTNFR1) en una muestra de un sujeto humano con proteinuria; comparar los niveles de sTNFR1 del sujeto con los niveles de referencia de sTNFR1; y
 determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica o enfermedad renal en etapa terminal, o ambas, en base a la comparación de los niveles del sujeto con los niveles de referencia.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en donde la presencia de sTNFR1 en la muestra del sujeto a niveles que son significativamente mayores que los niveles de referencia indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica, enfermedad renal en etapa terminal, o ambas.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en donde el sujeto tiene diabetes tipo 1 o tipo 2.
11. El método de la reivindicación 8, en donde la muestra comprende el suero del sujeto.
- 50 12. El método de la reivindicación 8, en donde dicho sujeto tiene uno o más factores de riesgo para desarrollar ESRD, seleccionados de niveles de A1c por encima del 8,1 %, relación de albúmina a creatina por encima de 0,6 y/o niveles de glucosa en sangre por encima de 200 mg/dl.
13. El método de la reivindicación 8, en donde dicho sujeto tiene una tasa de filtración glomerular (GFR) de 60 a 89 ml/minuto, 30 a 59 ml/minuto, 15 a 29 ml/min, o menor que 15 ml/min.
- 55 14. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto presenta uno o más factores de riesgo para desarrollar ERFD, seleccionados de niveles de A1c por encima del 8,1 %, relación de albúmina a creatina por encima de 0,6 y/o niveles de glucosa en sangre por encima de 200 mg/dl.

Figura 1A



■ Normoalbuminuria (NA)

■ Microalbuminuria (MA)

Figura 1B

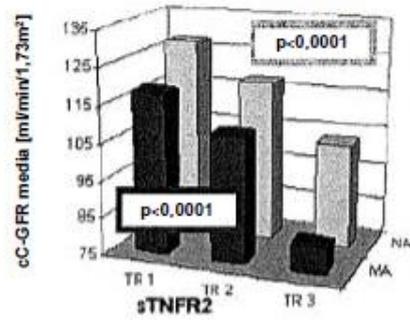


Figura 1C

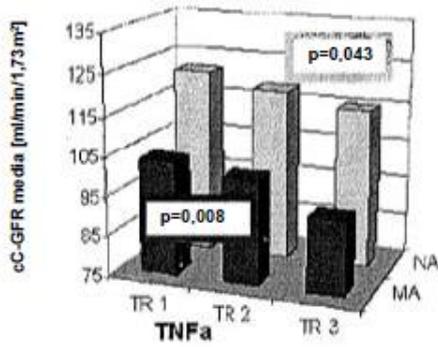


Figura 1D

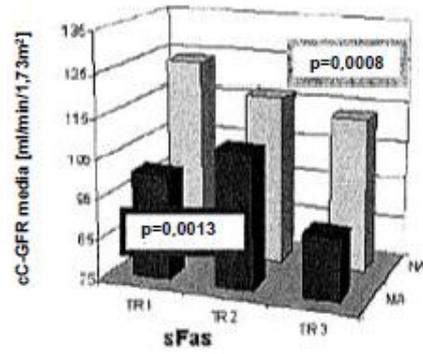


Figura 1E

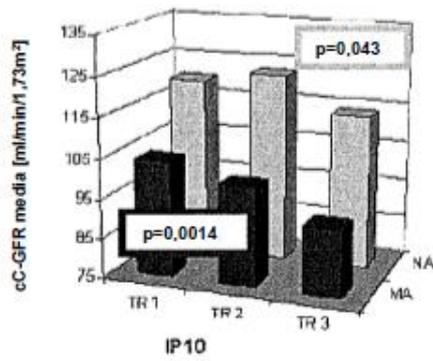


Figura 1F

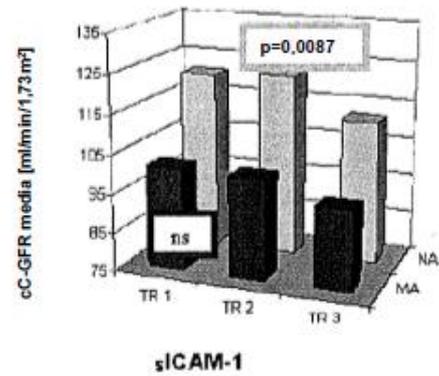


Figura 2A

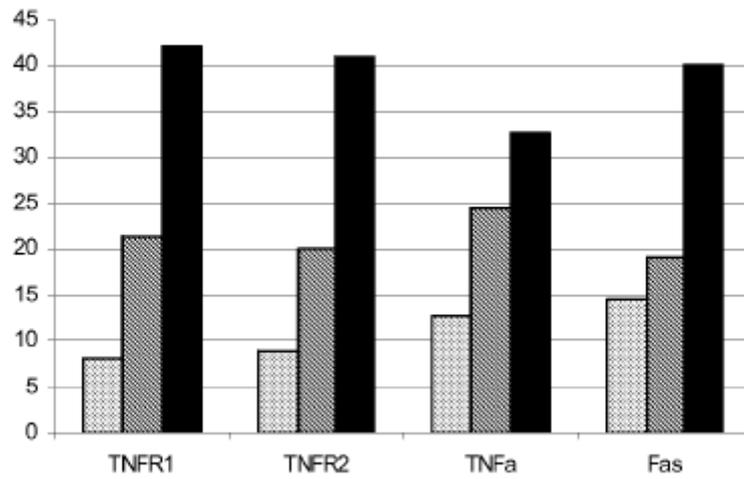


Figura 2B

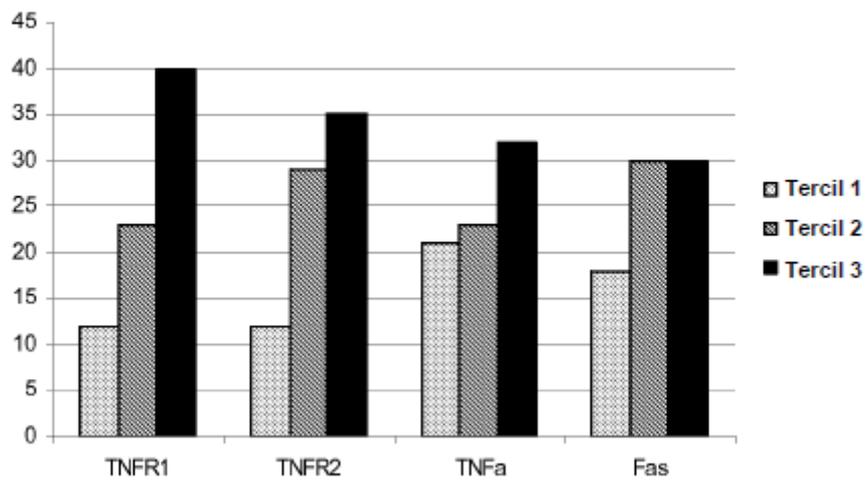


Figura 3A

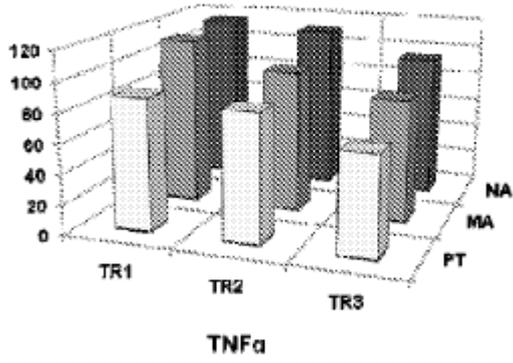


Figura 3B

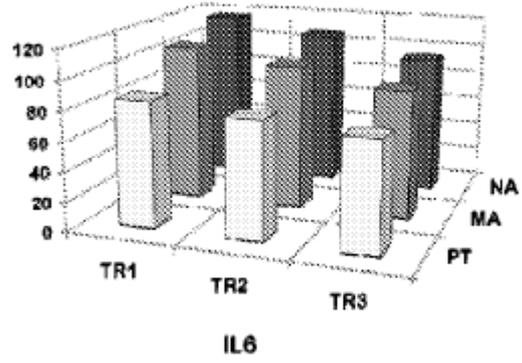


Figura 3C

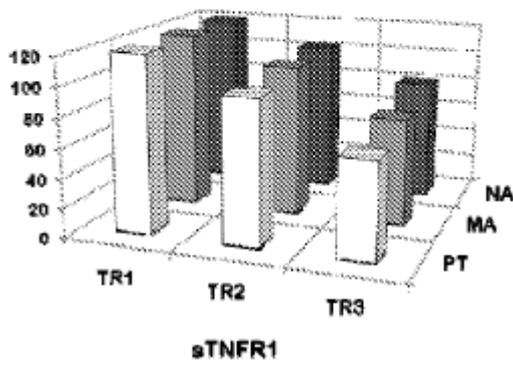


Figura 3D

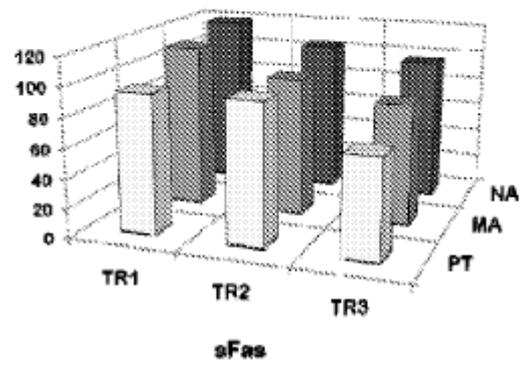


Figura 4

Diferencia en GFR entre los terciles más altos y más bajos de cinco marcadores

