



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 718**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05014521 .8**

86 Fecha de presentación : **05.07.2005**

87 Número de publicación de la solicitud: **1615035**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Panel de múltiples marcadores para la diabetes de tipo 1 y de tipo 2.**

30 Prioridad: **07.07.2004 EP 04015936**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Hess, Georg;**
Horsch, Andrea y
Poppe, Werner

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 288 718 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

Panel de múltiples marcadores para la diabetes de tipo 1 y de tipo 2.

5 La presente invención hace referencia a la estratificación del riesgo en pacientes que padecen diabetes.

En la actualidad, los pacientes diabéticos son tratados normalmente como un grupo homogéneo en el que sólo se distinguen pacientes con diabetes de tipo 1 y de tipo 2. De hecho, los pacientes diabéticos constituyen un grupo muy heterogéneo. Muchos pacientes presentan comorbilidades tales como enfermedades cardiovasculares o inflamatorias. Para estos pacientes se precisan regímenes de tratamiento más personalizados que se ajusten a sus necesidades. Sin embargo, un requisito previo para el tratamiento personalizado es un diagnóstico fiable de cualquier comorbilidad o manifestación específica o principal que afecten al pronóstico de la enfermedad o indicativas de complicaciones resultantes de una enfermedad específica presente en un paciente en concreto.

15 Las herramientas de diagnóstico actuales son insuficientes para estos propósitos. Por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares habitualmente no se diagnostican bien por los médicos de cabecera (Svendstrup Nielsen, L., *et al.* (2003). N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea. The European Journal de Heart Failure). Por lo tanto, son necesarias unas herramientas de diagnóstico simples y fiables, particularmente para los médicos de cabecera y/o médicos especializados en la atención de la diabetes.

20 El uso marcadores bioquímicos o moleculares se conoce como tal. Sin embargo, la diabetes causa la alteración de muchas funciones corporales y consecuentemente, la alteración de los niveles de marcadores bioquímicos o moleculares potenciales. Se desconoce que marcador(es) proporcionan información útil sobre el estado fisiológico o patológico de un paciente diabético.

25 Se ha intentado determinar si el péptido natriurético cerebral (BNP) puede utilizarse como marcador bioquímico en pacientes diabéticos. Yano *et al.* (1999) determinó que el BNP puede ser un signo de complicaciones renales en pacientes con diabetes de tipo 2 (Yano Y., Katsuki, A., *et al.* (1999). Plasma Brain natriuretic peptide levels in normotensive noninsulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 84(7), pp. 2353-2356). Este hallazgo fue cuestionado por Isotani *et al.* (2000) quien sugirió que la concentración plasmática elevada de BNP es en gran medida un signo de disfunción cardíaca (Isotani H., Kameoka K., *et al.* (2000). Plasma Brain Natriuretic Peptide levels in normotensive type 2 diabetic patients without cardiac disease. Diabetes Care, vol. 23(6), pp.859-860). Siebenhofer, *et al.* (2002) puntualizan que los estudios en pacientes con diabetes de tipo 2 normotensivos no fueron concluyentes con respecto a las concentraciones elevadas de BNP en pacientes con microalbuminuria. Siebenhofer *et al.* (2002) observó que las concentraciones de NT-proBNP aumentan en los pacientes con diabetes tipo 1 con albuminuria. Los autores concluyeron que la función del NT-proBNP en pacientes que presentan nefropatía diabética y otras comorbilidades era incierta.

40 Las complicaciones cardiovasculares pasan inadvertidas frecuentemente en pacientes diabéticos, ya que los pacientes diabéticos padecen neuropatía y la pérdida de sensibilidad al dolor con frecuencia. Por ejemplo, los pacientes diabéticos pueden padecer una cardiopatía sin experimentar dolor torácico como síntoma característico. De manera similar, no se detecta con frecuencia la microangiopatía en los pacientes diabéticos antes de que se hayan producido daños tisulares irreversibles.

45 WO 2004/046722 hace referencia a los nuevos marcadores de inflamación vascular tales como el sCD40L, el PIGF y el BNP y a las combinaciones de éstos que se utilizan como herramientas para el diagnóstico y pronóstico en pacientes que padecen enfermedades cardiovasculares, que incluyen también un gran número de pacientes diabéticos. La invención también hace referencia a la creación de un perfil de riesgo individual de acontecimientos negativos, que están asociados a la evolución de la arteriosclerosis. Sin embargo, este documento no manifiesta que estos marcadores puedan ser útiles en el diagnóstico de pacientes diabéticos que no tengan unos antecedentes de complicaciones cardiovasculares.

50 Además, algunos antidiabéticos pueden causar efectos cardiotoxicos (por ejemplo mediante un aumento de la volemia) y deben administrarse sólo a pacientes que no padezcan o tengan riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

60 Por lo tanto, la presente invención tiene la finalidad de proporcionar métodos y medios para la estratificación del riesgo y/o la identificación de comorbilidades, particularmente complicaciones cardiovasculares en pacientes que padecen diabetes.

En el primer modo de realización, el problema se soluciona mediante un método diagnóstico para determinar si un paciente diabético padece una complicación cardiovascular o tiene riesgo de padecer una complicación cardiovascular, y comprende las siguientes fases:

65 a) determinación cuantitativa, preferiblemente *in vitro*, de la concentración(es) de al menos una hormona cardíaca en una muestra obtenida del paciente,

b) diagnóstico de la complicación cardiovascular o del riesgo de padecer una complicación cardiovascular mediante la comparación de la concentración(es) obtenidos con niveles conocidos asociados a la complicación cardiovascular o al riesgo.

5 El método también debe constar de la fase de obtención de muestras, por ejemplo un líquido corporal o muestra de tejido del paciente. En la presente invención, la obtención de la muestra puede realizarse preferiblemente por personal no facultativo (es decir, que no tienen la formación necesaria para desempeñar el trabajo de un médico). Esto es aplicable particularmente si la muestra es de sangre.

10 La presente invención es particularmente útil para los médicos de cabecera, médicos especialistas y plantas, departamentos o clínicas especializadas en el tratamiento de la diabetes, ya que éstos con frecuencia no tienen acceso a una auscultación cardíaca minuciosa realizada por cardiólogos. La presente invención proporciona métodos y medios para profesionales que no son cardiólogos para un cribado simple y fiable de pacientes diabéticos para aquellos pacientes que tengan riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

15 La presente invención proporciona métodos y medios simples para detectar complicaciones cardiovasculares, que incluyen la cardiopatía, la microangiopatía, la activación plaquetaria y la inflamación, en pacientes diabéticos e incluso en aquellos pacientes diabéticos que presentan neuropatía. La detección es posible realizarla en los estadios iniciales de las complicaciones, incluso antes de que se produzcan daños irreversibles.

20 La invención se beneficia de ciertos marcadores bioquímicos y moleculares. Los términos “marcador bioquímico” y “marcador molecular” son conocidos por los expertos en la materia. En concreto, los marcadores bioquímicos o moleculares son productos de expresión génica que se expresan de forma diferente (es decir, la expresión aumenta o disminuye) en presencia o ausencia de un trastorno concreto, una enfermedad o una complicación. Normalmente, un marcador molecular se define como un ácido nucleico (como un mRNA), mientras que un marcador bioquímico es una proteína o péptido. La concentración de un marcador bioquímico o molecular adecuado puede indicar la presencia o ausencia del trastorno, enfermedad o complicación y permitir de este modo el diagnóstico. La diabetes de acuerdo con la presente invención hace referencia a todas las formas de diabetes mellitus, incluidas la diabetes de tipo 1, de tipo 2 y la gestacional. Especialmente, la diabetes hace referencia a las diabetes de tipo 1 y 2, más particularmente a la diabetes de tipo 2. Las definiciones de la diabetes mellitus son conocidas por los expertos en la materia y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los criterios diagnósticos en 1985 y 1999, así como la “American Diabetes Association” (ADA) lo hizo en 1997. Cualquier paciente que cumpla los criterios de acuerdo con una o más de estas definiciones se considera un paciente diabético. Preferiblemente, el paciente diabético se define de acuerdo con los criterios de la OMS de 1999.

35 La diabetes de tipo 1 se conoce también como diabetes juvenil o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). La diabetes de tipo 1 puede tener un origen inmunológico (subtipo A) y o puede ser idiopática (subtipo B). La diabetes de tipo 2 se conoce también como diabetes de comienzo en la edad adulta o diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID). La diabetes de tipo 2 puede estar acompañada de obesidad (tipo 2a) o no (tipo 2b). Otros tipos de diabetes son, por ejemplo, se deben a defectos genéticos, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías y al efecto de productos químicos o fármacos.

40 El diagnóstico de acuerdo con la presente invención consta de la determinación, el control, la confirmación, la subclasificación y la predicción de la enfermedad, la complicación o el riesgo pertinente. La determinación hace referencia al hecho de detectar una enfermedad, una complicación o un riesgo. El control hace referencia al seguimiento de una enfermedad o complicación que ya han sido diagnosticadas, por ejemplo, el análisis de la evolución de la enfermedad o el efecto de un tratamiento concreto en la evolución de la enfermedad o complicación. La confirmación se refiere a la consolidación o corroboración del diagnóstico establecido anteriormente utilizando otros indicadores o marcadores. La subclasificación hace referencia a la mejor definición del diagnóstico de acuerdo con las diferentes subclases de la enfermedad que se haya diagnosticado, por ejemplo, definición según formas leves o graves de la enfermedad. La predicción hace referencia al pronóstico de una enfermedad o complicación antes de que otros síntomas o marcadores se detecten o se alteren significativamente.

55 El término “paciente” de acuerdo con la presente invención se refiere a una persona sana, a una persona aparentemente sana, o especialmente, a una persona que padece diabetes. Particularmente, el paciente padece o recibe tratamiento para la diabetes de tipo 2 y/o la nefropatía diabética. Más particularmente, el paciente no tiene antecedentes conocidos de complicación cardiovascular y/o no recibe tratamiento para una complicación cardiovascular.

60 La presente invención permite diagnosticar si un paciente diabético padece una complicación cardiovascular o tiene riesgo de padecer una complicación cardiovascular. “Padecer una complicación cardiovascular” de acuerdo con la presente invención incluye también el empeoramiento de una complicación cardiovascular ya existente.

65 La “complicación cardiovascular” puede ser cualquier enfermedad cardiovascular o acontecimiento conocido por los expertos en la materia, incluye la cardiopatía, la microangiopatía o la activación plaquetaria. La presente invención se beneficia de las hormonas cardíacas, los marcadores de angiogénicos y los marcadores para la activación plaquetaria como los marcadores bioquímicos o moleculares.

En un primer aspecto de la presente invención, se ha observado que las hormonas cardíacas, particularmente el NT-proBNP, como marcadores bioquímicos o moleculares son altamente indicativas de complicaciones cardiovasculares, especialmente de enfermedades cardiovasculares, en pacientes diabéticos.

5 Los pacientes que padecen una cardiopatía pueden ser pacientes con angina de pecho estable (APE) y pacientes con síndrome coronario agudo (SCA). Los pacientes con SCA pueden presentar angina de pecho inestable (API) o han padecido anteriormente un infarto de miocardio (IM). El IM puede ser con elevación del segmento ST o sin elevación del segmento ST. El acontecimiento de un IM puede proseguir con una disfunción del ventrículo izquierdo (DVI). Finalmente, los pacientes con DVI experimentan insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) con una tasa de mortalidad
10 de aproximadamente un 15%.

Las cardiopatías se han clasificado mediante un sistema de clasificación funcional según la New York Heart Association (NYHA). Los pacientes de clase I no tienen síntomas evidentes de cardiopatía. La actividad física no se encuentra limitada, la actividad física normal no causa un cansancio excesivo, palpitaciones, o disnea (dificultad para
15 respirar). Los pacientes de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Estos pacientes se encuentran bien en reposo, pero la actividad física normal provoca cansancio, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase III muestran una limitación acusada de la actividad física. Se encuentran bien en reposo, pero una actividad física inferior a la normal les provoca cansancio, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase IV no pueden realizar ningún tipo de actividad física sin experimentar molestias. Éstos muestran síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo y si se realiza
20 cualquier actividad física las molestias aumentan.

Por consiguiente, los pacientes pueden dividirse entre individuos asintomáticos y sintomáticos (por ejemplo, disnea).

25 Otra característica de las cardiopatías puede ser “la fracción de eyección del ventrículo izquierdo” (FEVI), conocida también como “fracción de eyección”. Las personas con un corazón sano tienen un FEVI normal, que se define generalmente como un valor superior al 50%. La mayoría de los pacientes con una cardiopatía sistólica sintomática tienen generalmente un valor de la FEVI del 40% o inferior. Como consecuencia de una FEVI disminuida, pueden surgir complicaciones secundarias, por ejemplo congestión pulmonar o pulmón congestionado.

30 La cardiopatía puede ser también el resultado de una macroangiopatía diabética. La macroangiopatía diabética es similar a la arteriosclerosis de un paciente no diabético. Sin embargo, es más intensa y se manifiesta antes y con más frecuencia. Consecuentemente, “la cardiopatía” de acuerdo con la presente invención se refiere también a la macroangiopatía diabética.

35 En el contexto de la presente invención, “la cardiopatía” hace referencia particularmente a la cardiopatía coronaria, SAP, SCA, API, UAP, IM, IM con elevación del segmento ST, IM sin elevación del segmento ST, DVI, o ICC.

40 Más particularmente, “cardiopatía” se refiere a la SCA, la API, el IM, el IM con elevación del segmento ST, el IM sin elevación del segmento ST, la DVI, o la ICC.

Una cardiopatía de acuerdo con la presente invención puede provocar síntomas, particularmente síntomas de clase II a IV según la clasificación establecida por la NYHA, más particularmente de acuerdo con las clases III-IV según la NYHA.

45 Una cardiopatía puede estar asociada a una FEVI del 40% o inferior.

Una cardiopatía puede estar “compensada” o “descompensada”. El término compensada significa que el aporte regular de oxígeno que el cuerpo necesita puede satisfacerse, mientras que “compensada” significa que no se puede
50 satisfacer la necesidad de un aporte regular de oxígeno.

Las hormonas cardíacas de acuerdo con la presente invención comprenden los péptidos natriuréticos y la urotensina. Particularmente, las hormonas cardíacas de acuerdo con la presente invención son péptidos natriuréticos. En el contexto de la presente invención, se ha considerado obtener el máximo beneficio de las combinaciones de cualquiera
55 de las hormonas cardíacas o péptidos natriuréticos como marcadores bioquímicos.

Los péptidos natriuréticos de acuerdo con la presente invención comprenden los péptidos de tipo ANP y BNP y variantes de éstos (véase, por ejemplo Bonow, R.O. (1996). New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950).

60 Los péptidos de tipo ANP comprenden los pre-proANP, los proANP, los NT-proANP, y los ANP. Los péptidos de tipo BNP comprenden los pre-proBNP, los proBNP, los NT-proBNP, y los BNP.

Los péptidos pre-pro (134 aminoácidos en el caso del pre-proBNP) están formados de un péptido señal pequeño que libera el pro-péptido mediante escisión enzimática (108 aminoácidos en el caso del proBNP). El propéptido se escinde y da lugar a un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso del NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso del BNP, 28 aminoácidos en el caso del ANP).

Los péptidos natriuréticos preferidos de acuerdo con la presente invención son el NT-proANP, el ANP, el NT-proBNP, el BNP, y los variantes de éstos. La ANP y la BNP son las hormonas activas y tienen una semivida más corta que sus respectivos equivalentes inactivos, NT-proANP y NT-proBNP. Por lo tanto, según el momento que interese del transcurso de una enfermedad, cualquiera de las determinaciones cuantitativas de la forma activa o inactiva pueden ser beneficiosas. Los péptidos natriuréticos preferidos de acuerdo con la presente invención son los péptidos de tipo BNP y las variantes de éstos, particularmente los NT-proBNP y variantes de éstos.

El término “variantes” en este contexto se refiere a los péptidos que son sustancialmente similares a dichos péptidos. El término “sustancialmente similar” es bien conocido por los expertos en la materia. En particular, una variante puede ser una isoforma o alelo que presente intercambios en los aminoácidos en comparación a la secuencia de aminoácidos de la isoforma del péptido con mayor prevalencia en la población humana. Preferiblemente, tal péptido sustancialmente similar tiene una homología con la isoforma de mayor prevalencia del péptido de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente como mínimo de un 90%, y como opción de mayor preferencia como mínimo de un 95%. Los productos de degradación proteolítica que aun son reconocidos por los medios diagnósticos o por ligandos dirigidos contra los respectivos péptidos completos son también considerados sustancialmente similares.

Se conocen ejemplos de variantes, por ejemplo variantes de los NT-proANP y NT-proBNP, y se han descrito métodos para su determinación cuantitativa (Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K. *et al.* (2004): Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-type and B-type natriuretic peptides. *Clinical Chemistry*, vol. 50(9), 1576-1588).

El término “variante” hace referencia también a los péptidos modificados tras la traducción tales como los péptidos glucosilados o fosforilados. Una “variante” es también un péptido que ha sido modificado después de la obtención de la muestra, por ejemplo por unión covalente o no covalente de un marcador con el péptido, particularmente un marcador radioactivo o fluorescente. El término “variante” incluye también variante(s) obtenidas por empalme.

En otro modo de realización de la invención, la presente invención hace referencia a la determinación cuantitativa del nivel de una hormona cardíaca y además determinar el nivel de un marcador angiogénico y / o un marcador de la activación plaquetaria. Los marcadores angiogénicos y los marcadores de la activación plaquetaria pertenecen al grupo de “marcadores asociados a la inflamación”. Los marcadores asociados a la inflamación son marcadores que indican estados fisiopatológicos que están asociados con la inflamación. Los marcadores asociados a la inflamación de acuerdo con la presente invención no incluyen la CRP, la hsCRP, la IL-6, o variantes de la CRP, la hsCRP, o la IL-6.

La presente invención también hace referencia además a la determinación del nivel de un marcador angiogénico para el diagnóstico de una complicación cardiovascular en un paciente diabético, más particularmente para el diagnóstico de un estado fisiopatológico asociado a inflamación, y más particularmente aún para el diagnóstico de microangiopatía.

Por lo tanto, la presente invención también permite el diagnóstico de la “microangiopatía”. La microangiopatía es una consecuencia frecuente de la diabetes y se conoce también como microangiopatía diabética. La microangiopatía se manifiesta principalmente en el riñón y en la retina. La microangiopatía del riñón puede conducir a una nefropatía diabética que se caracteriza por la presencia de proteinuria (aumento de la excreción de albúmina por vía urinaria), hipertensión, e insuficiencia renal progresiva debida a glomeruloesclerosis. La microangiopatía de la retina puede producir finalmente la proliferación de vasos sanguíneos en la retina, hemorragias retinianas, y ceguera. Otra consecuencia de la microangiopatía es la hipoxia de las extremidades (normalmente conocida como “pie diabético”) y puede producir una gangrena que puede precisar la amputación de la extremidad.

Por lo tanto, los marcadores angiogénicos permiten también el diagnóstico de la nefropatía diabética, del daño en la retina debido a la diabetes, o la hipoxia de las extremidades.

Los marcadores angiogénicos preferidos son el PIGF (factor de crecimiento placentario), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), sFlt1 (tirosina quinasa 1 soluble de tipo fms) y variantes de éstos. El marcador angiogénico preferido es el PIGF y variantes de éste. El término “variantes” se entiende como se define anteriormente en estas especificaciones.

El término “variante” en el presente contexto pretende también hacer referencia a las variantes obtenidas por empalme. Por ejemplo, unas variantes conocidas del PIGF obtenidas por empalme son el PIGF-1 (149 aminoácidos), el PIGF-2 (170 aminoácidos) y el PIGF-3 (221 aminoácidos) (véase por ejemplo Cai, J., Ahmad, S., Jiang, W.G., Huang, J., *et al.* (2003). Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Sustains Angiogenesis and Bcl-2 Expression via the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Endothelial Cells. *Diabetes*, vol. 52, pp.2959-2968).

Por lo tanto, la presente invención hace referencia también a la determinación del nivel de un marcador de activación plaquetaria para el diagnóstico de una complicación cardiovascular, más particularmente para el diagnóstico de un estado fisiopatológico asociado con la inflamación y más particularmente para el diagnóstico de la activación plaquetaria.

Por lo tanto, la presente invención hace referencia también al diagnóstico de la “activación plaquetaria”. De acuerdo con la presente invención, la “activación plaquetaria” hace referencia a cualquier acontecimiento trombótico, que

ES 2 288 718 T3

incluye la activación plaquetaria, la agregación plaquetaria, formación de trombos, y la propagación de trombos. Estos mecanismos biológicos son representativos del riesgo de que una placa que sea vulnerable se rompa, dando lugar a una oclusión vascular reversible (OVR) o una oclusión vascular irreversible (OVI) que puede producir una disfunción del ventrículo izquierdo (DVI), insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y la muerte.

5

Por lo tanto, los marcadores de la activación plaquetaria permiten también el diagnóstico de la agregación plaquetaria, de la formación de trombos, de la propagación de los trombos, del riesgo de que una placa que sea vulnerable se rompa, de la OVR y de la OVI.

10 Los marcadores preferidos para la activación plaquetaria son el sCD40L (ligando soluble de CD40), el vWF (Factor de von Willebrand), y variantes de éstos. El marcador preferido para la activación plaquetaria es el CD40L y variantes de éste. El término “variantes” debe entenderse como se define anteriormente en esta especificación.

15 El sCD40L (y sus variantes) pueden estar “libres” o encontrarse unidos a trombocitos. Si se determina cuantitativamente el sCD40L en el plasma sanguíneo, se cuantifican el sCD40L libres y el sCD40L unido a trombocitos. Si se determina cuantitativamente el sCD40L en el plasma sanguíneo, únicamente se cuantifica el sCD40L “libre”. De acuerdo con la presente invención se prefiere la determinación del nivel de sCD40L libre.

20 Preferiblemente, los marcador(es) angiogénicos y / o los marcador(es) de la activación plaquetaria son determinados cuantitativamente junto con las hormonas cardíacas. La cuantificación de los diferentes tipos de marcadores puede ayudar a confirmar el diagnóstico de una complicación cardiovascular y permite subclasificar esta complicación cardiovascular en una cardiopatía, una microangiopatía, o se caracteriza por una activación plaquetaria.

25 Por lo tanto, la presente invención y sus diferentes modos de realización no sólo permiten diagnosticar una complicación cardiovascular, sino que también permiten la subclasificación de si dicha complicación cardiovascular se refiere principalmente a una cardiopatía, una microangiopatía o a una activación plaquetaria.

30 Los expertos en la materia son conocedores de que la “cardiopatía”, la “microangiopatía”, y la “activación plaquetaria” son enfermedades que no son completamente independientes, sino que están interrelacionadas. Por ejemplo, la activación plaquetaria puede dar lugar finalmente a una oclusión arterial y a una cardiopatía. Por lo tanto, la presente invención hace referencia al diagnóstico de las características principales y / o la clasificación de la gravedad de una complicación cardiovascular.

35 Los métodos de la presente invención pueden también estar acompañados de la determinación cuantitativa de uno o varios marcadores seleccionados del grupo formado por la CRP, la hsCRP, la IL-6, o sus variantes respectivas, la glucosa, la HbA1c, la CML (N.sup.[Epsilon]-(carboximetil)lisina) y los AGE (productos finales de glucosidación avanzada).

40 La CRP (proteína C reactiva), la hsCRP (proteína C reactiva de alta sensibilidad), la IL-6 (interleucina 6), y sus variantes respectivas indican la presencia de inflamación en general. Los niveles elevados de estos marcadores en el plasma sanguíneo son también indicativos de procesos inflamatorios en el sistema cardiovascular. Por lo tanto, los niveles elevados de estos marcadores son indicativos de la presencia o del riesgo de una complicación cardiovascular. Por lo tanto, la determinación cuantitativa de la CRP, la hsCRP, la IL-6, o de su variante respectiva pueden utilizarse en combinación con otros marcadores para el diagnóstico de una complicación cardiovascular o el riesgo de presentar una complicación cardiovascular, de acuerdo con la presente invención.

Los niveles elevados de glucosa, HbA1c, AGEs, o CML indican principalmente que el paciente precisa un control de la glucemia más estricto.

50 La determinación de la glucemia se lleva a cabo sistemáticamente para determinar el nivel de glucosa en sangre en los pacientes diabéticos.

La información acerca del control de la glucemia a medio o largo plazo puede obtenerse mediante la determinación cuantitativa de la HbA1c, la CML, o los AGE.

55

La HbA1c es una forma glucosilada de hemoglobina. Cuanto menor sea el nivel de HbA1c, mejor será la glucemia del paciente diabético controlado.

60 El producto de glucosidación CML (N.sup.[Epsilon]-(carboximetil)lisina) procede de la incubación a largo plazo de proteínas con glucosa. De forma similar a la HbA1c, un nivel bajo de CML indica un buen control de la glucemia en el paciente diabético.

65 Los AGE (productos finales de glucosidación avanzada) proceden también de incubación a largo plazo de proteínas con glucosa. De forma similar a la HbA1c y la CML, un nivel bajo de AGE indica un buen control de la glucemia en el paciente diabético. Además, se ha propuesto que niveles elevados de AGE están asociados a la cardiopatía coronaria en pacientes con diabetes de tipo 2 (Kilhovd, B.K., *et al.* (1999). Serum levels of Advanced Glycation End Products are Increased in Patients with type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease. *Diabetes Care*, vol. 22(9), p.1543-1548). Por lo tanto, la determinación cuantitativa de los AGE puede ser utilizada en combinación con otros marcadores para el

diagnóstico de complicaciones cardiovasculares o del riesgo de padecer una complicación cardiovascular, de acuerdo con la presente invención.

Además, los métodos de la presente invención pueden también acompañarse de la determinación cuantitativa de uno o varios marcadores escogidos del grupo de marcadores formado por la proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A), la IL-8, la IL-10, la interleucina-18 (IL-18/IL-18b), la albúmina modificada por la isquemia (IMA), la troponina cardíaca I (cTnI), la troponina cardíaca T (cTnT), la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), la VCAM-1 (molécula 1 de adhesión vascular), la proteína de unión de ácidos grasos (FABP), la E-selectina, la P-selectina, el fibrinógeno, el amiloide A sérico (SAA), la CK-MB (creatincinasa de músculo-cerebro), la MPO (mieloperoxidasa), la LpPLA2 (fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas), la GP-BB (isoenzima BB de la glucógeno fosforilasa), la IL1RA, el TAFI (Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina), la fibrina soluble, los anti-oxLDL (anticuerpos contra lipoproteína de baja densidad oxidada), la MCP-1 (proteína 1 quimioattractiva de los monocitos), el TF (factor tisular procoagulante), la MMP-9 (metaloproteínasa 9 de la matriz), la Ang-2 (angiopoyetina-2), el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), las VLDL (lipoproteínas de *muy baja* densidad) y el PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1).

El método, de acuerdo con la presente invención, comprende la fase de determinación del riesgo del paciente mediante comparación entre los niveles determinados con niveles conocidos (niveles de referencia) asociados con diferentes grados de riesgo del paciente.

Los expertos en la materia son capaces de determinar niveles conocidos de marcadores que están asociados a la “presencia” o el “riesgo” de desarrollar una complicación cardiovascular, particularmente una cardiopatía, una microangiopatía y / o una activación plaquetaria. Tales niveles pueden determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos, como se expone en los Ejemplos 1 y 2 o Fig. 1 a 5. Por ejemplo, la media de los niveles determinados en una población de pacientes, particularmente pacientes diabéticos, puede ser útil para distinguir entre un paciente que no presenta complicaciones cardiovasculares y un paciente que sufre una complicación cardiovascular o tiene riesgo de padecerla. Evaluar los niveles en otros pacientes, por ejemplo, en estudios de cohortes, puede ayudar a concretar los niveles de referencia y a distinguir entre diferentes niveles de gravedad de la complicación o diferentes grados de riesgo como “muy elevado” o “extremadamente elevado”.

De acuerdo con la presente invención, el término “presencia” en el contexto hace referencia a la probabilidad de que una complicación cardiovascular se encuentre presente en un paciente en concreto. El término “riesgo” hace referencia a la probabilidad de que una complicación cardiovascular se desarrolle en un paciente en concreto en el futuro. La “ausencia de riesgo” significa que no existe aparentemente un riesgo de desarrollar una complicación cardiovascular en el futuro.

Las concentraciones de referencia que se exponen más abajo pueden utilizarse únicamente como pautas iniciales para el determinar el riesgo de un paciente. Por ejemplo, el riesgo de un paciente en concreto depende también de la capacidad extra de bombeo del corazón que posea este paciente en particular.

Además, los expertos en la materia podrán obtener otros niveles de referencia a partir de los Ejemplos que se muestran más abajo.

El valor de un nivel de referencia puede depender también de la sensibilidad o especificidad del diagnóstico que se deseen obtener. Cuanto mayor sea la sensibilidad que se desee obtener, menor será la especificidad del diagnóstico y *vice versa*. Por ejemplo, un nivel de referencia más elevado del NT-proBNP aumentará la especificidad, pero puede resultar en una pérdida de sensibilidad de la determinación de la presencia o del riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

Normalmente, un nivel plasmático de NT-proBNP inferior a 33 pg / ml, particularmente inferior a 20 pg / ml, y más particularmente inferior a 15 pg / ml, está asociado con la ausencia de riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

Normalmente, un nivel plasmático de NT-proBNP superior a 33 pg / ml, particularmente superior a 125 pg / ml, y más particularmente superior a 500 pg / ml, está asociado con un riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

Cuanto mayor sea el nivel de NT-proBNP determinado, mayor será el riesgo del paciente. Por ejemplo, un nivel superior a 1000 pg / ml indica un riesgo muy elevado, y un nivel superior a 5000 pg / ml indica un riesgo extremadamente alto.

Normalmente, un nivel plasmático de PIGF inferior a 10 pg / ml y particularmente inferior a 5 pg / ml, está asociado a la ausencia de riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

Normalmente, un nivel plasmático de PIGF superior a 10 pg / ml, particularmente superior a 15 pg / ml y más particularmente superior a 20 pg / ml, está asociado con un riesgo de padecer una complicación cardiovascular.

Cuanto mayor sea el nivel de PIGF determinado, mayor será el riesgo del paciente. Por ejemplo, un nivel superior a 25 pg / ml indica un riesgo muy elevado, y un nivel superior a 30 pg / ml indica un riesgo extremadamente elevado.

Una vez se han determinado la presencia o el riesgo, éstos pueden influir en el tratamiento posterior como se describe más abajo. Particularmente, la presente invención permite individualizar el tratamiento de acuerdo con la característica o manifestación principal de la diabetes. Por lo tanto, la presente invención hace referencia también a los métodos de tratamiento. “Tratamiento” en este contexto se refiere a cualquier tratamiento que pueda alterar el estado fisiopatológico de un individuo e incluye, por ejemplo, la administración de medicamentos, así como los procedimientos quirúrgicos.

Si un método de acuerdo con la presente invención indica ausencia de riesgo, entonces el tratamiento puede proseguir como se estableció.

Si un método de acuerdo con la presente invención indica un riesgo, entonces el tratamiento puede modificarse. Preferentemente, el tratamiento debe ser acompañado de la determinación del nivel de otros marcadores de la invención y de otras técnicas de diagnóstico como la electrocardiografía, la ecocardiografía, o de cualquier otro método adecuado conocido por los expertos en la materia. Además, la adaptación del tratamiento puede incluir medidas como la reducción del consumo de sal, el ejercicio físico moderado y regular, evitar los antiinflamatorios no esteroideos, proporcionar la vacuna contra la gripe y la vacuna antineumocócica, el tratamiento quirúrgico (por ejemplo la revascularización, la dilatación con globo, la endoprótesis vascular, la revascularización quirúrgica), la administración de medicamentos como los diuréticos (incluye la administración conjunta de varios diuréticos), los inhibidores de la ECA (enzima convertidora de angiotensina), los bloqueadores adrenérgicos β , los antagonistas de la aldosterona, los antagonistas del calcio (bloqueadores de los canales de calcio), los bloqueadores de los receptores de angiotensina, los digitálicos, y cualquier otra medida conocida y que se considere apropiada por los expertos en la materia.

Si un método de acuerdo con la presente invención indica que la complicación cardiovascular es una cardiopatía, entonces el tratamiento se centrará en un tratamiento para el corazón, particularmente en la administración de inhibidores de la ECA y bloqueadores adrenérgicos β . Además, será aconsejable evitar medicamentos cardiotoxicos y el aumento de la volemia. El tratamiento de revascularización (por ejemplo la PCTI (intervención terapéutica percutánea), la dilatación con globo, la endoprótesis vascular, la cirugía de revascularización) pueden contemplarse también.

Los expertos en la materia son conocedores de los inhibidores de la ECA. Algunos ejemplos son los siguientes: el benazepril, el captopril, el cilazapril, el enalapril, el fosinopril, el lisinopril, el moexipril, el perindopril, el quinapril, el ramipril, el espirapril, y el trandolapril.

Los inhibidores de la ECA pueden conseguir también que se retrase la evolución de la nefropatía diabética.

Los expertos en la materia son conocedores de los bloqueadores adrenérgicos β (no selectivos y selectivos para los receptores β_1). Algunos ejemplos son los siguientes: el acebutolol, el alprenolol, el atenolol, el betaxolol, el bisoprolol, el bupranolol, el carazolol, el carteolol, el carvedilol, el celiprolol, el metipranolol, el metoprolol, el nadolol, el nebivolol, el oxprenolol, el penbutolol, el pindolol, el propanolol, el sotalol, el tanilolol, y el timolol.

La “medicación cardiotoxica” en este contexto se refiere particularmente a la administración de medicamentos que pueden provocar un aumento de la volemia, por ejemplo las tiazolidinedionas, por ejemplo la glitazona, mediona, la pioglitazona, la rosiglitazona, la troglitazona.

Si un método de acuerdo con la presente invención indica que la complicación cardiovascular es una microangiopatía, entonces el tratamiento se centrará en la administración de medicamentos “hipolipemiantes” (por ejemplo las estatinas) y / o antiinflamatorios. La administración de inhibidores o antagonistas de los receptores de la glucoproteína IIb / IIIa de las plaquetas pueden contemplarse.

Los expertos en la materia son conocedores de los medicamentos hipolipemiantes. Algunos ejemplos incluyen los fibratos (por ejemplo el bezofibrato, el clofibrato, el etofibrato, el clofibrato de etofilina, el fenofibrato, el gemfibrozilo), el ácido nicotínico y los análogos de éstos (por ejemplo del ácido nicotínico, el acipimox), las estatinas (por ejemplo, la simvastatina, la lovastatina, la pravastatina, la fluvastatina, la atorvastatina, la cerivastatina), las resinas de intercambio aniónico (por ejemplo la colestiramina, el colestipol), el probucol, y el sitosterol. Las estatinas son los medicamentos hipolipemiantes de elección en el presente contexto.

Es importante señalar que muchos medicamentos hipolipemiantes, particularmente las estatinas, ejercen también un efecto antiinflamatorio, que los convierte en medicamentos muy adecuados para el tratamiento de la microangiopatía o la activación plaquetaria.

Los expertos en la materia son conocedores de los inhibidores o antagonistas de los receptores de la glucoproteína IIb / IIIa de las plaquetas. Los ejemplos incluyen los anticuerpos monoclonales o los policlonales, el tirofiban, la eptifibatida, y similares. En una modalidad preferida de la presente invención, el inhibidor de los receptores de la glucoproteína IIb / IIIa de las plaquetas es un anticuerpo, concretamente el anticuerpo conocido bajo el nombre de abciximab. El abciximab es un fragmento Fab de anticuerpo que se encuentra disponible con el nombre ReoPro comercializado por Centocor Europe BV.

Si un método de acuerdo con la presente invención indica que la complicación cardiovascular es una activación plaquetaria, entonces el tratamiento se centrará en la administración de inhibidores de la agregación plaquetaria y de hipolipemiantes (por ejemplo las estatinas).

5 Los expertos en la materia son conocedores de los inhibidores de la agregación plaquetaria e incluyen cualquier medicamento capaz de inhibir la agregación de los trombocitos (plaquetas). Algunos ejemplos son los inhibidores de la ciclooxigenasa, particularmente la COX-1 (por ejemplo el ácido acetilsalicílico); inhibidores de la ADP (que inhiben la unión de la adenosina fosfato a sus receptores en los trombocitos, por ejemplo, la ticlopidina o el clopidogrel); inhibidores o antagonistas de los receptores de la glucoproteína IIb / IIIa de las plaquetas (véase más arriba); el dipiridamol; la sulfpirazona; el dextrán 40.

Si un método de acuerdo con la presente invención indica que la glucemia no está suficientemente controlada, entonces el paciente será tratado de acuerdo con cualquier método para el control de la glucemia conocido y que se considere apropiado en la cuestión. Los ejemplos incluyen la administración de fármacos que aumenten la captación de la glucosa que se encuentra en la sangre por los tejidos diana o mediante la administración de fármacos que estimulen la liberación de insulina en las células beta pancreáticas. Los ejemplos para estos fármacos tan conocidos incluyen la insulina y las tiazolidinedionas.

Como se ha mencionado anteriormente, la diabetes puede manifestarse de diferentes formas. El término manifestación significa que la enfermedad se detecta de manera evidente debido a una complicación o característica concreta, por ejemplo, una complicación cardiovascular, una cardiopatía, una microangiopatía, la activación plaquetaria, la inflamación, o el control insuficiente de la glucemia. Debido a las diferencias interindividuales, tales como diferencias genéticas, estilos de vida distintos (por ejemplo el consumo excesivo de alcohol o de nicotina, la ausencia de ejercicio físico), o unos antecedentes de la enfermedad diferentes, la diabetes puede manifestarse a través de complicaciones o características diferentes en cada paciente. Por ejemplo, un paciente en particular puede padecer una cardiopatía, mientras que otro paciente puede desarrollar una microangiopatía o una nefropatía diabética. En otro ejemplo, un paciente en el que la glucemia no está suficientemente controlada puede que no padezca una microangiopatía ya que el paciente no ha presentado diabetes durante mucho tiempo, mientras que un paciente que ha sido diabético durante muchos años puede presentar una microangiopatía aunque mantenga su glucemia relativamente bien controlada.

Por lo tanto, el método de acuerdo con la presente invención puede comprender el diagnóstico de una manifestación de la diabetes, particularmente la manifestación principal, que pertenezca al grupo formado por la complicación cardiovascular, la cardiopatía, la microangiopatía, la activación plaquetaria, la inflamación y el control insuficiente de la glucemia.

Consecuentemente, es obvio que la invención está relacionada también con un método para determinar las manifestaciones, particularmente la manifestación principal de la diabetes en un paciente, y comprende las siguientes fases:

a) Determinación del nivel de al menos una hormona cardíaca o una variante de éstas en una muestra obtenida del paciente, preferiblemente *in vitro*, y

b) Preferiblemente, determinar además el nivel de al menos un marcador angiogénico o una variante de éstos en una muestra obtenida del paciente, y

c) Preferiblemente, determinar además el nivel de al menos un marcador de activación plaquetaria o una variante de éstos en una muestra obtenida del paciente, y

d) Preferiblemente, determinar además el nivel de al menos un marcador seleccionado del grupo formado por la CRP, la hsCRP, la IL-6, o una variante de éstos, en una muestra obtenida del paciente, y

e) Preferiblemente, determinar además el nivel de al menos un marcador seleccionado del grupo formado por la glucosa, la HbA1c, la CML, y los AGE, en una muestra obtenida del paciente, y

f) Diagnosticar la manifestación mediante la comparación entre los niveles determinados y los niveles conocidos asociados con la manifestación, en la que:

g) Los niveles del marcador(es) de acuerdo con la fase a) a la c) son indicativos de que la manifestación se trata de una complicación cardiovascular o del riesgo de padecer una complicación cardiovascular, y

h) Los niveles de marcador(es) de acuerdo con la fase a) son indicativos de que la manifestación se trata de una cardiopatía o del riesgo de padecer una cardiopatía, y

i) Los niveles de marcador(es) de acuerdo con la fase b) son indicativos de que la manifestación se trata de una microangiopatía o del riesgo de padecer una microangiopatía, y

k) Los niveles de marcador(es) de acuerdo con la fase c) son indicativos de que la manifestación se trata de una activación plaquetaria o del riesgo de padecer una activación plaquetaria, y

ES 2 288 718 T3

l) Los niveles de marcador(es) de acuerdo con la fase d) son indicativos de que la manifestación se trata de una inflamación o del riesgo de padecer una inflamación, y

5 m) Los niveles de marcador(es) de acuerdo con la fase e) son indicativos de que la manifestación se trata de un control insuficiente de la glucemia.

Como se menciona anteriormente, el nivel de marcador(es) de acuerdo con la fase b) es además indicativo de que la manifestación se trata de una nefropatía diabética, del daño en la retina, de la hipoxia de las extremidades, o del riesgo de padecer una nefropatía diabética, daño en la retina o hipoxia de las extremidades.

10 De nuevo, como se ha mencionado anteriormente, el nivel de marcador(es) de acuerdo con la fase c) es además indicativo de que la manifestación se trata de agregación plaquetaria, de la formación de un trombo, de la propagación de un trombo, del riesgo de que una placa que sea vulnerable se rompa, de presentar una OVR, de presentar una OVI, o del riesgo de padecer agregación plaquetaria, la formación de un trombo, la propagación de un trombo, del riesgo de que una placa que sea vulnerable se rompa, de presentar OVR, o de presentar OVI.

La determinación será mejor cuantos más marcadores adicionales se determinen cuantitativamente de acuerdo con las fases preferidas de la b) a la e) del método mencionado.

20 La presente invención no está relacionada solamente con los métodos de diagnóstico, sino también con la utilidad de los marcadores para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

El diagnóstico, de acuerdo con la presente invención, se realiza preferiblemente mediante medios diagnósticos. Un medio diagnóstico es cualquier medio que permita determinar el nivel, cantidad o concentración de la sustancia que interesa, particularmente un péptido o polipéptido.

Los péptidos o polipéptidos que interesan de acuerdo con la presente invención son los marcadores bioquímicos que se han descrito en estas especificaciones.

30 Los expertos en la materia son conocedores de los métodos y medios de diagnóstico que pueden utilizarse para determinar los niveles de los respectivos péptidos. Estos métodos incluyen métodos basados en ELISA en microplaca, inmunoanálisis completamente automatizados o robotizados (disponibles en el mercado, por ejemplo, como analizadores ElecsysTM), CBA (ensayo enzimático de unión a cobalto, disponibles en el mercado, por ejemplo, como los analizadores Roche-HitachiTM) y ensayos de aglutinación de partículas de látex (disponibles en el mercado, por ejemplo, como analizadores Roche-HitachiTM).

Además, los expertos en la materia están familiarizados con diferentes métodos de cuantificación del nivel de un péptido o polipéptido. El término "nivel" se refiere a la cantidad o concentración de un péptido o polipéptido en un paciente o una muestra obtenida del paciente.

40 El término "cuantificación" o "determinación cuantitativa" de acuerdo con la presente invención se refiere a la determinación de la cantidad o concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, del ácido nucleico, el péptido, el polipéptido u otra sustancia de interés. La determinación cuantitativa puede realizarse directamente o indirectamente. La determinación cuantitativa indirecta incluye la cuantificación de las respuestas celulares, los ligandos de unión, los marcadores o de los productos de las reacciones enzimáticas.

En el contexto de la presente invención, la cantidad también se refiere a la concentración. Es obvio que la concentración de la sustancia de interés puede calcularse a partir de la cantidad total de la sustancia en una muestra de volumen conocido, y *vice versa*.

50 La determinación cuantitativa puede realizarse de acuerdo con cualquier método conocido en la materia, tales como las pruebas celulares, ensayos enzimáticos, o ensayos basados en la unión de ligandos. Los métodos preferidos se describen a continuación.

55 En otra modalidad preferida, el método para la determinación de una concentración de un péptido o polipéptido de interés consta de las fases: (a) poner en contacto un péptido o un polipéptido con un sustrato adecuado durante un periodo de tiempo adecuado, (b) determinar la cantidad de producto.

60 En otra modalidad preferida, el método para determinar la concentración de un péptido o de un polipéptido de interés consta de las fases siguientes: (a) poner en contacto un péptido o un polipéptido con un ligando de unión específico, (b) (opcionalmente) retirar el ligando libre, (c) determinar la cantidad de ligando unido.

Preferiblemente, el péptido o el polipéptido se encuentran en la muestra, particularmente una muestra de líquido corporal o tejido, y se cuantifica la cantidad de péptido o de polipéptido en la muestra.

65 Los péptidos y los polipéptidos (proteínas) pueden cuantificarse en muestras de tejido, células y líquidos corporales, es decir, preferiblemente *in vitro*. Preferiblemente, el péptido o el polipéptido de interés se cuantifican en una muestra de líquido corporal.

ES 2 288 718 T3

Una muestra de tejido, de acuerdo con la presente invención, hace referencia a cualquier tipo de tejido que se obtiene del cuerpo de una persona o animal vivo o muerto. Las muestras de tejido pueden obtenerse mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante biopsia o raspado.

5 Los líquidos corporales, de acuerdo con la presente invención, pueden incluir la sangre, el suero sanguíneo, el plasma sanguíneo, la linfa, el líquido cefalorraquídeo, la saliva, el humor vítreo y la orina. Particularmente, los líquidos corporales comprenden la sangre, el suero sanguíneo, el plasma sanguíneo, y la orina. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en la materia.

10 Preferiblemente, la muestra se trata de sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

Si es necesario, las muestras pueden seguir manipulándose. Particularmente, los ácidos nucleicos, los péptidos o los polipéptidos pueden purificarse a partir de la muestra, de acuerdo con métodos conocidos en el ámbito, como los métodos de filtración, centrifugación, o extracción tales como la extracción cloroformo/fenol.

15 Otros métodos preferidos para la determinación cuantitativa pueden incluir determinar la cantidad de un ligando de unión específico para el péptido o el polipéptido de interés. La unión, de acuerdo con la presente invención, incluye uniones covalentes y no covalentes.

20 Un ligando, de acuerdo con la presente invención, puede ser cualquier péptido, polipéptido, ácido nucleico, u otra sustancia que se una al péptido o polipéptido de interés. Es bien sabido que los péptidos o los polipéptidos, si se obtienen o se purifican a partir del cuerpo humano o de un animal, pueden modificarse, por ejemplo, mediante glucosilación. Un ligando adecuado, puede unirse también al péptido o al polipéptido en tales sitios de unión.

25 Preferiblemente, el ligando debe unirse específicamente al péptido o al polipéptido para determinarse cuantitativamente. “Unión específica” significa que el ligando no debe básicamente unirse con otro péptido (“reacción cruzada”), polipéptido o sustancia presente en la muestra investigada, de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la proteína de unión específica o isoforma es recomendable que se una con una afinidad de al menos 3 veces superior a cualquier otro péptido o polipéptido relevante, más preferiblemente al menos 10 veces superior y más preferiblemente
30 aún al menos 50 veces superior

La unión no específica puede tolerarse, particularmente si el péptido o polipéptido investigado puede todavía distinguirse y cuantificarse inequívocamente, por ejemplo mediante separación según el tamaño (por ejemplo mediante electroforesis), o mediante la cantidad relativamente alta en la muestra.

35 La unión del ligando puede cuantificarse mediante cualquier método conocido en la materia. Preferiblemente, el método es semicuantitativo o cuantitativo. Los métodos adecuados se describen a continuación.

40 Primero, la unión de un ligando puede cuantificarse directamente, por ejemplo mediante una RMN o una resonancia de plasma superficial.

Segundo, si el ligando actúa también como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede cuantificarse el producto de una reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede cuantificarse determinando la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo mediante el método de transferencia West-
45 tern).

Preferiblemente, la cantidad de sustrato está saturada en la determinación cuantitativa de productos de reacción enzimática. El sustrato puede estar también marcado con un marcador perceptible anteriormente a la reacción. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un tiempo adecuado. Un tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad perceptible de producto, que preferiblemente pueda cuantificarse. En vez de determinar la cantidad de producto, puede determinarse el tiempo transcurrido necesario para la aparición de una cantidad de producto (perceptible, por ejemplo).

55 Tercero, el ligando puede acoplarse covalentemente o mediante uniones no covalentes a un marcador permitiendo así la detección y determinación cuantitativa del ligando.

El marcaje puede realizarse por métodos directos o indirectos. El marcaje directo comprende el acoplamiento de un marcador directamente al ligando (de forma covalente o no covalente). El marcaje indirecto comprende uniones (covalentes o no covalentes) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario tiene que unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcador adecuado y / o ser la diana (receptor) del ligando terciario unido al ligando secundario. La utilización de ligandos secundarios, terciarios o de incluso ligandos de orden superior sirve para aumentar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados incluyen los anticuerpos, los anticuerpos secundarios y el sistema consabido de estreptovidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.).

65 El ligando o sustrato puede también “etiquetarse” con una o varias etiquetas como se sabe en la materia. Dichas etiquetas pueden actuar entonces como diana de ligandos de orden superior. Las etiquetas adecuadas incluyen la biotina, la digoxigenina, la His-Tag, la glutation-S-transferasa, FLAG, la GFP, la myc-tag, la hemaglutinina del virus

ES 2 288 718 T3

influenza A (HA), proteínas de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta se añade preferiblemente en el extremo N-terminal y / o C-terminal.

Los marcadores adecuados son cualquier marcador perceptible mediante cualquier método apropiado de detección. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, ésteres de acridinio, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo “partículas magnéticas”, que incluyen los marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos), y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa, la luciferasa y derivados de éstos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen la di-amino-benzidina (DAB), la 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, el NBT-BCIP (cloruro de nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato, comercializado por Roche Diagnostics como solución madre preparada), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato puede resultar en un producto de reacción coloreado, en fluorescencia o en quimioluminiscencia, que pueden medirse de acuerdo con métodos conocidos en la materia (por ejemplo utilizando una película fotosensible o un equipo de cámaras adecuado). Los criterios citados anteriormente son aplicables de manera análoga para cuantificar la reacción enzimática.

Marcadores fluorescentes típicos incluyen las proteínas fluorescentes (tal como las GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína, y colorantes Alexa (por ejemplo Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes están comercializados por ejemplo, por Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes.

Los marcadores radiactivos típicos incluyen el ³⁵S, el ¹²⁵I, el P³², el P³³ y similares. Un marcador radiactivo puede detectarse mediante cualquier método apropiado conocido, por ejemplo una película fotosensible o un dispositivo por imagen fosforescente.

Los métodos para la determinación cuantitativa adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), el RIA (radioinmunoanálisis), el ELISA (prueba de inmunoabsorción enzimática), el inmunoanálisis enzimático en sándwich, el inmunoanálisis de quimioluminiscencia tipo sándwich (ECLIA), el fluoroinmunoanálisis con disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA), el ensayo de proximidad por centelleo (SPA), la turbidimetría, la nefelometría, turbidimetría o nefelometría mejorada con látex, inmunoanálisis en fase sólida, y espectrometría de masas tales como SELDI-TOF, MALDI-TOF, o electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS). Otros métodos conocidos en la materia (tales como la electroforesis en gel, electroforesis bidimensional en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDSPAGE), método de transferencia de Western), pueden utilizarse sólo o conjuntamente con un marcado u otro método de detección como se ha descrito anteriormente.

Los ligandos preferidos incluyen los anticuerpos, los ácidos nucleicos, los péptidos o los polipéptidos, y los aptómeros, por ejemplo aptómeros para ácidos nucleicos o péptidos. Los métodos usados con tales ligandos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptómeros adecuados está comercializada también por proveedores. Los expertos en la materia están familiarizados con los métodos para el desarrollo de derivados de tales ligandos de alta afinidad y especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, los péptidos o los polipéptidos. Estos derivados pueden entonces ser sometidos a procedimientos de cribado conocidos en la materia para evaluar su unión, por ejemplo, mediante expresión en fagos.

El término “anticuerpo” como se utiliza aquí incluye los anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de éstos, tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que tienen la capacidad de unirse a antígenos o haptenos.

En otra modalidad preferida, el ligando, preferiblemente escogido del grupo formado por los ácidos nucleicos, los péptidos y los polipéptidos, y más preferiblemente del grupo constituido por los ácidos nucleicos, los anticuerpos o los aptómeros, se encuentra en una matriz.

Dicha matriz contiene al menos un ligando adicional, que puede ser dirigido contra un péptido, un polipéptido o un ácido nucleico de interés. Dicho ligando adicional puede también estar dirigido contra un péptido, un polipéptido o un ácido nucleico sin interés especial en el contexto de la presente invención. Preferiblemente, los ligandos de al menos 3 péptidos o polipéptidos de interés en el contexto de la presente invención, preferiblemente al menos cinco péptidos o polipéptidos de interés, y más preferiblemente de al menos ocho péptidos o polipéptidos de interés, se encuentran en la matriz.

De acuerdo con la presente invención, el término “matriz” hace referencia a una fase sólida o portador de tipo gel sobre el que al menos dos compuestos están fijados o unidos en una disposición unidimensional, bidimensional o tridimensional. Tales matrices (que incluyen los “chips de genes”, los “chips de proteínas” las matrices de anticuerpos y similares) son conocidas generalmente por los expertos en la materia y se elaboran normalmente sobre los portaobjetos de vidrio del microscopio, especialmente sobre portaobjetos de vidrio recubiertos, tales como los portaobjetos recubiertos de policlación, nitrocelulosa o biotina, los cubreobjetos, y membranas tales como las membranas constituidas principalmente por nitrocelulosa o nilón, por ejemplo.

La matriz puede incluir un ligando de unión o al menos dos células que expresen cada una al menos un ligando.

Se contempla también utilizar “matrices en suspensión” como las matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan JP, Sklar LA. (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20 (1):9-12). En tales matrices en suspensión, el portador, por ejemplo las microperlas o las microesferas, se encuentran presentes en la suspensión. La matriz está formada de diferentes microperlas o microesferas posiblemente marcadas, que transportan diferentes ligandos.

La invención hace referencia además a un método de elaboración de matrices como se ha definido anteriormente, en el que al menos un ligando se une al material transportador además de a otros ligandos.

Los métodos de producción de tales matrices, por ejemplo basados en la química de fases sólidas y en los grupos protectores lábiles a la luz, son por lo general conocidos (US 5 744 305). Tales matrices pueden también ponerse en contacto con sustancias o muestrarios de sustancias y pueden someterse a pruebas para determinar interacciones, por ejemplo para unión o cambio de conformación. Por lo tanto, las matrices que constan de un péptido o un polipéptido como se ha definido más arriba pueden utilizarse para identificar ligandos que se unen específicamente a dichos péptidos o polipéptidos.

Leyenda de las figuras

Fig. 1. Muestra una curva de Kaplan-Meier del tiempo que transcurre hasta el primer acontecimiento cardiovascular en pacientes diabéticos de tipo 2 con concentraciones plasmáticas basales de NT-proBNP por debajo (línea discontinua) o por encima de la mediana en toda la cohorte. El valor P calculado con el test de rangos logarítmicos. Prop. w/o e., proporción sin acontecimientos; t, tiempo (meses); NAR, número de pacientes con riesgo; bel. med., grupo por debajo de la mediana; ab. med., grupo por encima de la mediana.

Fig. 2. Muestra una curva de Kaplan-Meier del tiempo que transcurre desde la aparición de la enfermedad cardiovascular o desde un primer ingreso en un hospital debido a insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes diabéticos de tipo 2 con concentraciones plasmáticas basales de NT-proBNP por debajo (línea discontinua) o por encima de la media en toda la cohorte. Valor P calculado con el test de log-rank. Prop. w/o e., proporción sin acontecimientos; t, tiempo (meses); NAR, número de pacientes con riesgo; bel. med., grupo por debajo de la mediana; ab. med., grupo por encima de la mediana.

Fig. 3. Muestra los niveles plasmáticos medios de NT-proBNP durante el seguimiento en pacientes con concentraciones plasmáticas de NT-proBNP por debajo o por encima de la media en una cohorte de 160 pacientes diabéticos de tipo 2 en el estudio Steno-2. conc., concentración; t, tiempo (años); ab. med., grupo por encima de la mediana; bel. med., grupo por debajo de la mediana.

Fig. 4. Muestra las curvas de Kaplan-Meier de todas las causas de mortalidad en pacientes con nefropatía diabética y las concentraciones de NT-proBNP por encima frente a las que están por debajo de la mediana (110 ng/l) - test de Log-rank, $p < 0,0001$. La curva de los pacientes normoalbuminúricos está dibujada con un trazo fino para su comparación. Prop. d., proporción de muertes; t, periodo de seguimiento (años); nephrop., nefropatía; normalb., normoalbuminuria; NAR, número de pacientes con riesgo.

Fig. 5 Muestra las curvas de Kaplan-Meier de mortalidad cardiovascular en pacientes con nefropatía diabética y la concentración de NT-proBNP por encima frente a las que están por debajo de la mediana (110 ng/l) - Log-rank test, $p < 0,0001$. La curva de los pacientes normoalbuminúricos está dibujada con un trazo fino para su comparación. Prop. CVD, proporción que presentan muerte cardiovascular; t, periodo de seguimiento (años); nephrop., nefropatía; normalb., normoalbuminuria; NAR, número de pacientes con riesgo.

Fig. 6 Muestra una curva de Kaplan-Meier que comprende todas las causas de mortalidad en pacientes diabéticos de tipo 1 que presentan nefropatía diabética según concentración plasmática del PLGF. Los datos fueron recogidos durante el estudio Steno-1 como se describe en el Ejemplo 2. 1 - c.s., uno menos la supervivencia acumulada; t, tiempo de seguimiento (años).

Fig. 7 Muestra una curva de Kaplan-Meier que representa la mortalidad causada por enfermedad cardiovascular en pacientes diabéticos de tipo 1 que presentan nefropatía según las concentraciones plasmáticas del PLGF. Los datos fueron recogidos durante el estudio Steno-1 como se describe en el Ejemplo 2. 1 - c.s. CVD, uno menos la supervivencia acumulada de la mortalidad por enfermedad cardiovascular; t, periodo de seguimiento (años).

Ejemplo 1

Diseño del estudio

Se ha informado previamente y con detalle del diseño del estudio y de los resultados principales del Estudio Steno-2 (Gaede, P. Vedel, P. Larsen, N *et al.* (2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. New England Journal of Medicine, vol. 348 (5), pp 383-93). En resumen, 160 pacientes con diabetes de tipo 2 microalbuminúrica se aleatorizaron para someterse a un tratamiento multifactorial convencional (n=80) o intensificado dirigido a algunos factores de riesgo comeditantes. Los pacientes en el grupo de tratamiento intensivo fueron sometidos a un tratamiento que constó de una introducción gradual a un estilo de vida y unas intervenciones

farmacológicas con las que se pretende mantener los valores de hemoglobina glucosilada por debajo del 6,5%, la presión arterial por debajo de los 130/80 mm Hg, los niveles de colesterol sérico total en ayunas por debajo de 175 mg/dl y los niveles de triglicéridos séricos en ayunas por debajo de 150 mg/dl. Las intervenciones en el estilo de vida recomendadas incluyeron una reducción de la ingesta de grasa alimentaria, la practica regular de ejercicio ligero o moderado y dejar de fumar. Se aconsejó a todos los participantes del grupo de tratamiento intensivo que tomaran dosis bajas de ácido acetilsalicílico y un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), independientemente del nivel de presión arterial. El seguimiento medio fue de 7,8 años. A lo largo de todo el período del estudio el grupo intensivo tuvo valores significativamente más bajos de HbA_{1c}, de los niveles de colesterol sérico total en ayunas, de colesterol LDL y de triglicéridos, presión arterial sistólica y diastólica y de la tasa de excreción urinaria de albúmina (Gaede, *supra*). Estos cambios se han asociado con reducciones importantes en el riesgo de padecer enfermedades macrovasculares y microvasculares (reducción del riesgo relativo del 53% en el caso de enfermedades cardiovasculares, 61% en el caso de la progresión de una nefropatía, 58% en el caso de la progresión de retinopatías y el 63% en el caso de la progresión de neuropatías autonómicas) (Gaede, *supra*).

Los 160 pacientes fueron reclutados del Steno Diabetes Center durante 1992-93. la microalbuminuria se definió como una tasa de excreción de albúmina urinaria (TEA) de 30-300 mg cada 24 h en cuatro de seis muestras de orina de 24 h. La diabetes se definió según los criterios de la OMS de 1985. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: ser mayor de 65 años o menor de 40; una concentración de péptido-C sérico estimulada menor de 600 pmol/l 6 minutos después de la inyección intravenosa de 1 mg de glucagón; insuficiencia pancreática o diabetes secundaria a la pancreatitis; abuso del alcohol, enfermedad renal no diabética; cáncer; o una enfermedad con peligro para la vida en la que se puede dar una muerte probable en 4 años. Todos los participantes dieron su consentimiento informado. El protocolo se elaboró de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética del Copenhagen County.

En el presente análisis *post-hoc* se estratificó a los pacientes en dos grupos según tuvieran el NT-proBNP plasmático basal por debajo o por encima de los valores de la mediana de la cohorte.

Criterios de evaluación

El criterio de evaluación principal del estudio fue un criterio de evaluación combinado para las enfermedades cardiovasculares que comprende: mortalidad cardiovascular, infarto de miocardio no fatal, ictus no fatal, intervenciones coronarias percutáneas, injerto de un bypass arterial coronario, cirugía vascular y amputaciones. También se examinó un criterio de evaluación secundario que comprendía la mortalidad cardiovascular y el ingreso por insuficiencia cardíaca congestiva.

Ensayos

Todas las muestras de sangre se extrajeron a las 08:00, después de un ayuno nocturno. Los pacientes no tomaron medicamentos la mañana que se extrajeron las muestras de sangre.

Después de que los pacientes hubieran estado en reposo durante al menos 20 minutos en posición supina, se recogieron muestras de sangre para el análisis del NT-proBNP plasmático, se centrifugaron y se conservó el plasma a -80°C hasta la realización del análisis. Las concentraciones de NT-proBNP en el plasma se midieron mediante un inmunoensayo tipo sándwich en un Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Alemania). El rango analítico se extiende de 5 a 35.000 pg/ml y el coeficiente de variación total es < 0,061 en las muestras de plasma humano mezclado. Para convertir de pg/ml a pmol/l hay que multiplicar por 0,118. Se extrajeron muestras de sangre al inicio del estudio y después de dos, cuatro y ocho años de seguimiento.

Datos estadísticos

La comparación de los grupos al inicio se hizo mediante un análisis de la varianza de un solo factor o el test de Mann-Whitney siempre que fue adecuado para las variables numéricas. Para comparar variables categóricas se utilizó el test de Ji cuadrado o el test exacto de Fisher.

Debido a que los dos grupos originales de tratamiento diferían significativamente en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, el papel del NT-proBNP plasmático como marcador de riesgo de enfermedades cardiovasculares se analizó en cada uno de estos grupos, por separado, utilizando el valor de la mediana correspondiente a cada uno de los grupos originales de tratamiento como punto de corte para el grupo por debajo de la mediana, el grupo por encima de la mediana y también para un grupo combinado.

Las curvas de tiempo hasta la aparición del primer acontecimiento para los criterios de evaluación principal y secundario se basaron en el análisis Kaplan-Meier y los dos grupos se compararon utilizando el test de rangos logarítmicos (test de log-rank). Las proporciones de riesgo con intervalos de confianza del 95% se calcularon usando un modelo de regresión de Cox. Los resultados se presentaron sin ajustes, además de dos modelos con ajustes para los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con diabetes de tipo 2; el modelo 1 con ajustes para la duración de la diabetes conocida, enfermedad cardiovascular conocida al inicio, sexo y edad, como se ha indicado previamente, y el modelo 2 con más ajustes añadidos para la presión arterial sistólica y diastólica, la hemoglobina A1c glucosilada, el colesterol sérico total en ayunas, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y tasa de excreción

de albúmina urinaria. Los resultados de la cohorte combinada también se ajustaron según la asignación del tratamiento original. Los cambios en la concentración plasmática de NT-proBNP a lo largo del tiempo dentro de cada uno de los dos grupos de tratamiento se compararon con el test de Wilcoxon.

5 Resultados

Las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP oscilaban entre 5 (valor mínimo detectado) a 1290 pg/ml, con un valor mediano de 33,5 pg/ml en toda la cohorte del Steno-2, mientras que los valores en el grupo de tratamiento intensivo original eran de 5 a 1290 (mediana de 35,3) pg/ml y en el grupo de terapia convencional de 5 a 1134 (mediana de 32,0) pg/ml. Las características basales de los dos grupos se muestran en la tabla 1. Un nivel de NT-proBNP plasmático basal alto se asoció con una duración de la diabetes más larga, mayor edad, presión arterial más elevada y deficiencias en la función renal. De un modo parecido, una mayor proporción de pacientes en el grupo que estaba por encima de la mediana se trató con antagonistas del calcio al inicio (Tabla 1).

15 TABLA 1

15 *Características basales de 160 pacientes con diabetes de tipo 2 según la concentración plasmática basal del N-terminal proBNP por debajo o por encima de la mediana en toda la cohorte*

	Por debajo de la mediana del grupo	Por encima de la mediana del grupo	Valor-p
20 HbA1c (%) *	8,7 (0,2)	8,4 (0,2)	0,29
25 PA Sistólica (mm Hg)	143 (1,9)	153 (2,2)	0,002
PA diastólica (mm Hg) *	86 (1,0)	85 (1,3)	0,39
30 Colesterol total sérico en ayunas (mg/dl) *	224 (4)	209 (4)	0,048
35 Colesterol HDL sérico en ayunas (mg/dl) *	40 (1)	39 (1)	0,62
40 Triglicéridos séricos en ayunas (mg/dl) †	186 (60-992)	168 (44-1993)	0,09
45 Duración de la diabetes conocida (años) †	5 (0-26)	7 (0-30)	0,003
Sexo (n)	59♂/21♀	60♂/20♀	0,96
Fumadores (n)	28	32	0,55
45 Creatinina sérica (µmol/l) *	74 (1,5)	80 (2,1)	0,015
50 Peso (kg) *	92,8 (1,7)	89,1 (1,8)	0,13
55 Tasa de filtración glomerular (ml/min/1,73m ²) *	125 (2,4)	109 (2,8)	<0,0001
Enfermedad cardiovascular conocida (n)	7	14	0,11
Índice de masa ventricular izquierda *	110 (2,9)	126 (4,2)	0,001
60 Edad (años) *	52 (0,8)	58 (0,7)	<0,0001

ES 2 288 718 T3

NT-proBNP (pg/ml)†	13,0 (<5-32,8)	69,7 (33,5-1290)	<0,0001
Excreción de albúmina urinaria (mg/24 h)†	70 (32-286)	80 (33-265)	0,11
Excreción de sodio urinario (mmol/24 h)†	213 (46-577)	176 (25-449)	0,19
<i>Medicación</i>			
Inhibidores ECA (n)	13	18	0,42
Diuréticos (n)	14	25	0,07
Betabloqueantes (n)	4	5	1,00
Antagonistas del calcio (n)	3	13	0,02
Asignación del tratamiento	41 intensivo	39 intensivo	0,69

*media (EE), †mediana (intervalo)

Para convertir los valores del colesterol a mmol/l, hay que multiplicar por 0,02586. Para convertir los triglicéridos a mmol/l, hay que multiplicar por 0,01129. Para convertir los valores de NT-proBNP a mmol/l, hay que multiplicar por 0,118.

Durante un seguimiento medio de 7-8 años, se observaron 12 episodios cardiovasculares importantes en el grupo con valores de NT-proBNP plasmático por debajo del valor de la mediana, y en cambio fueron 54 episodios en el grupo con valores por encima de la mediana, $p < 0,0001$ (Fig. 1). Del mismo modo, la correlación significativa entre las enfermedades cardiovasculares y la concentración plasmática de NT-proBNP también se observó en cada uno de los dos grupos originales de tratamiento del Estudio Steno-2, tal y como se muestra en la tabla 1. El ajuste según los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la diabetes de tipo 2 no influyó sobre la importancia de la correlación en ninguno de los modelos de ajuste (Tabla 2). La tabla 2 muestra la razón de riesgos (*Hazard Ratio*, HR) (IC 95%) para los criterios de evaluación principal y secundario en los paciente con diabetes de tipo 2 con valores de NT-proBNP plasmático por encima de la mediana, comparados con los pacientes con niveles plasmáticos por debajo de la mediana (panel A), o utilizando un punto de corte de 125 pg/ml (panel B). El modelo 1 está ajustado para las enfermedades cardiovasculares conocidas al inicio, la duración de la diabetes conocida, la edad y el sexo. El modelo 2 está ajustado para las variables del modelo 1 además de la presión arterial sistólica y diastólica, la hemoglobina glucosilada A1c, los lípidos séricos en ayunas y la tasa de excreción de albúmina urinaria.

TABLA 2

Panel A	Grupo intensivo	Grupo convencional	Grupo combinado
<u>Criterio de evaluación principal</u>			
No ajustado	6,1 (1,8-20,9) $p=0,004$	3,1 (1,5-6,5) $p=0,002$	4,4 (2,3-8,4) $p < 0,0001$
Modelo 1	4,7 (1,2-17,7) $p=0,022$	2,3 (1,0-5,0) $p=0,038$	3,3 (1,7-6,5) $p=0,001$
Modelo 2	4,1 (1,0-16,7) $p=0,048$	3,0 (1,2-7,6) $p=0,021$	3,6 (1,7-7,5) $p=0,001$

ES 2 288 718 T3

<u>Criterio de evaluación secundario</u>				
5	No ajustado	7,3 (0,9-59,3) p=0,06	3,3 (1,1-10,2) p=0,036	5,8 (2,0-16,9) p=0,001
10	Modelo 1	4,4 (0,4-48,2) p=0,23	3,3 (0,9-12,3) p=0,08	4,4 (1,3-14,3) p=0,015
15	Modelo 2	3,0 (0,3-32,7) p=0,38	5,2 (1,0-26,1) p=0,044	8,4 (2,0-36,3) p=0,004
<hr/>				
20	Panel B	Grupo intensivo	Grupo convencional	Grupo combinado
<u>Criterio de evaluación principal</u>				
25	No ajustado	6,0 (2,3-15,3) p=0,0002	3,4 (1,8-8,0) p=0,001	4,7 (2,6-8,4) p<0,0001
30	Modelo 1	5,7 (2,0 - 16,3) p=0,001	2,4 (1,0-5,6) p=0,048	3,0 (1,6-5,7) p=0,001
35	Modelo 2	7,1 (1,9-27,1) p=0,004	2,9 (1,0-8,6) P=0,047	3,3 (1,7-6,7) p=0,001
40	<u>Criterio de evaluación secundario</u>			
45	No ajustado	8,7 (2,2-34,9) p=0,002	4,1 (1,5-11,2) p=0,007	5,3 (2,4-12,0) p<0,0001
50	Modelo 1	7,4 (1,5-37,2) p=0,015	2,9 (0,9-9,4) p=0,08	3,4 (1,4-8,2) p=0,006
55	Modelo 2	15,1 (1,0-238,0) p=0,054	2,4 (0,6-10,0) p=0,24	4,5 (1,5-13,5) P=0,007

60 La razón de riesgos para el criterio de evaluación secundario también se correlacionó de modo significativo con la concentración plasmática basal de NT-proBNP, tanto ajustada como no ajustada a los factores de riesgo clásicos (Fig. 2). No obstante, aunque se observaron unas razones de riesgos de una magnitud similar cuando se analizaban en cada uno de los dos grupos originales de tratamiento, el ajuste diluía la importancia del NT-proBNP plasmático como marcador de riesgo (Tabla 2).

65 En un contexto en el que se aplica un punto de corte de concentración plasmática de NT-proBNP de 125 pg/ml, la importancia y el grado de riesgo para los criterios e evaluación principales y secundarios no cambió sustancialmente, comparado con el punto de corte más bajo en la presente cohorte (Tabla 2).

5 Cuando dos años después del estudio se midieron las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP iniciales, se observó un aumento significativo en la cohorte combinada con 14,9 pg/ml, $p < 0,0001$, y se observó un resultado similar en el grupo de tratamiento convencional y en el intensivo (11,7 pg/ml, $p < 0,0001$ y 18,2 pg/ml, $p < 0,0001$, respectivamente). Durante el seguimiento, la concentración plasmática de NT-proBNP medio siguió aumentando, tanto en el grupo que estaba por debajo de la mediana como en el que estaba por encima, como se muestra en la figura 3. Este también fue el caso cuando el grupo de tratamiento intensificado original y el grupo de tratamiento convencional se analizaron separadamente.

10 Los cambios en el NT-proBNP plasmático durante los primeros dos años de la intervención se correlacionaron significativamente con el riesgo de episodios cardiovasculares durante el resto del período de seguimiento. Una reducción del NT-proBNP plasmático de 10 pg/ml en la cohorte combinada se asoció con una reducción del riesgo relativo del 1% significativa, tanto en la cohortes intensiva como en la convencional y la combinada, para el criterio de evaluación principal y secundario ($p < 0,0001$ en todos los casos). Un total de 42 pacientes vieron reducidos sus valores de NT-proBNP plasmático durante los primeros dos años de seguimiento, con una disminución media de 12 pg/ml. Hubo 18 15 pacientes de la clasificación inicial por encima de la mediana que alcanzaron el nivel por debajo de la mediana después de 2 años de intervención. No obstante, el hecho de alcanzar este nivel no se asoció con una disminución del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares respecto a los pacientes que no alcanzaron el nivel (razón de riesgos 0,45 (0,12 - 1,65); $p = 0,23$).

20 La correlación entre la concentración plasmática de NT-proBNP y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares durante el período de seguimiento restante, siguió siendo significativo después de 2 años, tanto para el criterio de evaluación principal, como para el secundario.

25 En el presente análisis *post-hoc* del Estudio Steno-2, hemos demostrado que existe una correlación significativa e independiente entre las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP y el riesgo futuro de enfermedades cardiovasculares, además de un criterio de evaluación secundario que comprende la mortalidad cardiovascular y el ingreso por insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes con diabetes de tipo 2 y microalbuminuria.

30 En conclusión, el papel del NT-proBNP plasmático como un potente marcador de riesgo de enfermedades cardiovasculares y de insuficiencia cardíaca congestiva existe en pacientes con diabetes de tipo 2.

Ejemplo 2

Pacientes y diseño del estudio

35 Durante 1993, se invitó a todos los pacientes ambulatorios con diabetes de tipo 1 con nefropatía diabética ($n = 242$) que asistían a la clínica de Steno Diabetes Center, a los que se les había medido la tasa de filtración glomerular durante el mismo año, a participar en un estudio de casos controlados (Tarnow, L., Cambien, F., *et al.* (1995). El polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima I convertidora de angiotensina se asocia con enfermedades cardíacas coronarias en pacientes con DMDI con nefropatía diabética. (Diabetologica, vol. 38, pp. 798-803). Se reclutaron un total de 199 40 pacientes que cumplían los requisitos de los criterios clínicos para la nefropatía diabética (microalbuminuria (> 300 mg/24 h) en al menos dos de tres recogidas consecutivas de orina de 24 horas, en presencia de retinopatía diabética y ausencia de otras enfermedades renales o del aparato urinario (Parving H-H, Osterby R, Ritz E. Diabetic nephropathy. En Brenner BM, ed. The Kidney, pp. 1777-818. Philadelphia: WB Saunders, 2003). Un grupo de 192 pacientes con diabetes de tipo 1 de larga duración y normoalbuminuria persistente sirvieron de control. El NT-proBNP plasmático se midió en 198 pacientes con nefropatía y en 188 pacientes con normoalbuminuria.

50 En un diseño de un estudio observacional prospectivo se llevó a cabo un seguimiento de los pacientes hasta el 1 de febrero de 2003 o hasta que murieron ($n = 62$) o emigraron ($n = 3$). El comité de ética local aprobó el estudio de acuerdo con la Declaración del Helsinki y todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

Investigaciones clínicas y analíticas iniciales

55 Las investigaciones se realizaron la mañana después del ayuno nocturno. Al 24% de los pacientes con nefropatía y el 88% de los pacientes con normoalbuminuria nunca se les prescribió una medicación antihipertensiva. Se le pidió al resto de pacientes que dejaran sus tratamientos antihipertensivos y diuréticos 8 días antes de la exploración. No obstante, no todos los pacientes quisieron interrumpir su tratamiento y el 34% y el 4% de los pacientes en el grupo de nefropatía y normoalbuminuria, respectivamente, habían tomado medicación antihipertensiva el día de la exploración.

60 La presión arterial se midió dos veces con un esfigmomanómetro adecuado, después de al menos 10 minutos de reposo en posición supina. Las concentraciones de albúmina urinaria se midieron mediante un inmunoensayo enzimático (Feldt-Rasmussen B, Dinesen B, Deckert M. Enzyme immunoassay: an improved determination of urinary albumin in diabetics with incipient nephropathy. Scand J. Clin. Lab. Invest. 1985;45:539-44) de muestras de orina de 24 h. Las concentraciones de creatinina sérica se calcularon mediante el método Jaffé cinético. La tasa de filtración glomerular se midió en pacientes con nefropatía diabética después de una inyección de 3,7 MBq ^{51}Cr -EDTA por 65 determinación de radioactividad en las muestras de sangre venosa, recogidas a los 180, 200, 220 y 240 minutos después de la inyección. En el caso de los pacientes con normoalbuminuria, la tasa de filtración glomerular se estimó mediante la ecuación de la Modificación de la Dieta en Enfermedades Renales (MDRD, por sus siglas en inglés) (Levey AS,

Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D *et al.* A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann. Intern. Med.* 1999; 130:461-70). La retinopatía diabética se evaluó en todos los pacientes mediante fotografías del fondo del ojo después de una dilatación papilar, clasificada como ninguna retinopatía, retinopatía simple o retinopatía proliferativa. Los pacientes se entrevistaron utilizando el cuestionario cardiovascular de la OMS. Los episodios cardiovasculares más considerables se diagnosticaron como un antecedente de ictus y/o infarto de miocardio. El tabaquismo se definió como el que afecta a las personas que fuman uno o más cigarrillos/puros/pipas al día, el resto fueron clasificados como no fumadores.

Medición de NT-proBNP

Después de que los pacientes hubieran estado en reposo durante al menos 20 minutos en posición supina, se recogieron muestras de sangre para la determinación del NT-proBNP, se centrifugaron y se conservó el plasma a -80°C hasta que se realizara el análisis. Las concentraciones de NT-proBNP plasmático se midieron mediante un inmunoensayo tipo sándwich en un Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). La variación intraensayo está por debajo del 3,0% y el coeficiente total de variación oscila entre 2,2 y 5,8% en magnitudes bajas y elevadas de NT-proBNP.

Seguimiento

Se realizó un seguimiento de todos los pacientes a través del registro nacional durante el verano de 2003. Si un paciente había muerto antes del 1 de febrero de 2003, se registraba la fecha de muerte y se obtenía información sobre la causa de la muerte del certificado de defunción. Dos observadores revisaron independientemente todos los certificados de defunción y se registró la causa de defunción principal. También se incluyó información disponible adicional de los informes de la autopsia. Todas las muertes se clasificaron como muertes por causas cardiovasculares a menos que se estableciera una causa no cardiovascular inequívoca (Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CP, Held P, McMurray JJV, Michelson EL *et al.* Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-overall programme. *Lancet* 2003; 362:759-66)

Análisis estadístico

Las variables con distribución normal se proporcionan en medias \pm DE, mientras que las variables que no siguen una distribución normal se transformaron logarítmicamente y se proporcionan como medianas (intervalos). Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante un test t de Student de datos independientes o un ANOVA (análisis de varianza). Se utilizó el ji cuadrado para comparar las variables no continuas. El análisis de la relación entre NT-proBNP y la presencia/ausencia de nefropatía o una enfermedad cardiovascular importante al inicio, se ajustaron según el sexo, la edad, la presión arterial sistólica y la tasa de filtración glomerular. Se consideró estadísticamente significativo un valor-p de dos colas de $\leq 0,05$.

Todas las variables “tiempo hasta la muerte” se analizaron con el test de rangos logarítmicos y se presentaron en curvas de Kaplan-Meier en función de la presencia de nefropatía o de que los niveles de NT-proBNP estuvieran por encima o por debajo del valor de la mediana. En los pacientes con nefropatía, los modelos de regresión de Cox modificados por covariables se ajustaron según las siguientes covariables basales pre-especificadas: sexo, edad, tasa de filtración glomerular, antecedentes de enfermedades cardiovasculares importantes, medicación antihipertensiva en curso e el momento de extraer la muestra de sangre, y \log_{10} de NT-proBNP o NT-proBNP por encima del respectivo valor por debajo de la mediana (110 ng/l). No se realizaron modificaciones adicionales para evitar un sobreajuste del modelo. Los resultados se describen como razones de riesgo con intervalos de confianza del 95% con o sin ajustes para otros factores que puedan afectar el pronóstico.

Todos los cálculos se realizaron con un programa disponible en el mercado (SPSS para Windows, versión 10.0).

Resultados

Los pacientes con diabetes de tipo 1 con y sin nefropatía diabética se equipararon/relacionaron estrechamente con respecto al sexo, la edad y la duración de la diabetes. Si se comparaba a los pacientes con normoalbuminuria con los pacientes con nefropatía diabética estos últimos presentaban una presión arterial elevada, un aumento de HbA_{1c}, colesterol sérico elevado y una tasa de filtración glomerular más baja, $p < 0.0001$. Por término medio, la tasa de filtración glomerular se mantenía bien en pacientes con nefropatía diabética (Tabla 3).

ES 2 288 718 T3

TABLA 3

Características clínicas y analíticas iniciales de 386 pacientes con diabetes de tipo 1 con y sin nefropatía diabética

	Nephropathy n = 198	Normoalbuminuria N = 188	valor P
Sexo (masc./fem.)	122/76	114/74	0,84
Edad (años)	41,0 (9,5)	42,5 (9,9)	0,14
Duración de la diabetes (años)	27,7 (8,0)	26,8 (8,5)	0,26
Retinopatía (nula/simple/proliferativa)	0/137/61	66/103/19	<0,001
Antecedentes de IM	10 (5,1 %)	2 (1,1 %)	0,036
Antecedentes de ictus	14 (7,1 %)	1 (0,5 %)	0,001
IMC (kg/m ²)	24,0 (3,3)	23,7 (2,5)	0,20
HbA _{1c} (%)	9,6 (1,5)	8,5 (1,1)	<0,001

ES 2 288 718 T3

	Excreción urinaria de	794 (16-14545)	8 (1-30)	-
5	albúmina (mg/24h)			
	S-creatinina (µmol/l)	103 (54-684)	76 (40-116)	<0,001
10	TFG (ml/min)	74 (33)	94 (16)	<0,001
15	Presión arterial sistólica (mmHg)	151 (23)	132 (18)	<0,001
20	Presión arterial diastólica (mmHg)	86 (13)	76 (10)	<0,001
25	Fármacos antihipertensivos a la toma de muestras (%)	34 %	4 %	<0,001
30	S-colesterol (mmol/l)	5,6 (1,2)	4,8 (1,0)	<0,001
35	S-HDL-colesterol (mmol/l)	1,46 (0,54)	1,56 (0,53)	0,07
40	S-triglicéridos (mmol/l)	1,22 (0,30-9,90)	0,77 (0,30-3,10)	<0,001
	Fumadores (%)	50 %	43 %	0,17

45 Los datos son los siguientes: n, las medias (DE), las medianas (intervalo). Algunos pacientes con una albuminuria persistente previa que tomaban medicación antihipertensiva tenían una tasa de excreción de albúmina urinaria < 300 mg/24 h.

50 En pacientes con nefropatía diabética, la concentración de NT-proBNP plasmática se elevó a 110 (5-79640) ng/l (mediana (intervalo)) frente a 27 (5-455) ng/l en pacientes con normoalbuminuria, p<0,0001. Esta diferencia se mantuvo después de los ajustes respecto a las diferencias de la tasa de filtración glomerular y otras covariables, p<0,0001. La concentración de NT-proBNP se elevó precozmente en la nefropatía diabética (40(5-3111) ng/l), cuando la tasa de filtración glomerular aún se mantenía dentro del rango normal (>100 ml/min).

55 En el grupo de nefropatía, la concentración plasmática de NT-proBNP no se diferenció mucho entre hombres y mujeres con diabetes tipo 1 (p=0,28), pero aumentó con la edad (r=0,42, p<0,0001) y la presión arterial sistólica (r=0,53, p<0,0001), y disminuyó con la tasa de filtración glomerular (r=0,60, p<0,0001) y la hemoglobina (r=0,52, p<0,0001). No se observaron correlaciones entre el NT-proBNP y la glucemia, ni entre el NT-proBNP y HbA_{1c} o el colesterol sérico. No se encontró ninguna asociación entre la retinopatía diabética y el NT-proBNP. Entre los pacientes con nefropatía diabética, las concentraciones de NT-proBNP circulante eran más elevadas en pacientes que tomaban medicación antihipertensiva en el momento de recoger las muestras de sangre; sin embargo, esta diferencia desapareció después de los ajustes según la tasa de filtración glomerular.

65 Se demostró que existe una débil correlación inversa entre la tasa de filtración glomerular estimada (mediana 92 ml/min/1,73 m² (intervalo: 45 - 170)) y el NT-proBNP plasmático (r = -0,022, p=0,002) en los pacientes con normoalbuminuria.

La prevalencia de episodios cardiovasculares importantes difirió entre pacientes con y sin nefropatía diabética, el 11% (IC 95%: 8-14) y 2% (0-4), respectivamente, $p < 0,0001$. En pacientes con nefropatía, el NT-proBNP plasmático al inicio era significativamente elevado en pacientes con antecedentes de infarto de miocardio no fatal y/o ictus (671 (34-12418) ng/l, $p < 0,0001$), comparado con aquellos pacientes sin antecedentes de enfermedad cardiovascular importante (97 (5-79640) ng/l). Después de los ajustes realizados para que no tuvieran lugar posibles confusiones, un aumento diez veces mayor de NT-proBNP otorgó una aumento de la *odds ratio* de que se produjera un episodio cardiovascular importante de 3,1 (IC 95% 1,2-7,8), $p = 0,02$.

Durante el seguimiento, 51 (26%) de los pacientes con nefropatía y 11 (6%) de los pacientes sin nefropatía murieron, $p < 0,0001$. Debido al bajo número de episodios en el grupo normoalbuminurico, los análisis adicionales se han limitado a los pacientes con nefropatía. Dentro del grupo de nefropatía, el valor de la mediana de NT-proBNP plasmático era de 110 ng/l, y el 39 (39%) de los pacientes con valores por encima y 12 (12%) de los pacientes con valores por debajo de este valor murieron debido a alguna causa. La razón de riesgos (HR) no ajustada fue de 3,86 (IC 95% 2,02-7,37), $p < 0,0001$; la HR no ajustada según covariables fue de 2,28 (1,04-4,99), $p = 0,04$ -Fig. 4. Esta mortalidad inferior se atribuyó a menos muertes cardiovasculares: 31 (31%) y 7 (7%) por encima y por debajo del valor de la mediana de NT-proBNP, respectivamente (HR no ajustada 5,25 (2,31-11,92), $p < 0,001$; ajustada por covariables 3,81 (1,46-9,94), $p = 0,006$ - Fig. 5). El efecto del NT-proBNP plasmático sobre la mortalidad cardiovascular y mortalidad por otras causas se mantuvo importante después del ajuste para las diferencias en la tasa de filtración glomerular. Además, la interacción entre el NT-proBNP y la tasa de filtración glomerular no fue significativa, lo que indicaba que el efecto de la concentración de NT-proBNP en la mortalidad y la mortalidad cardiovascular no depende del valor de la tasa de filtración glomerular. El ajuste adicional para el colesterol sérico y la presión arterial sistólica no alteró de modo sustancial las razones de riesgo y los resultados se mantuvieron significativos.

La mortalidad total (test de rangos logarítmicos, $p = 0,06$) y cardiovascular ($p = 0,07$) en pacientes con nefropatía y una concentración plasmática de NT-proBNP por debajo de 110 ng/l no se diferenciaron estadísticamente del grupo de normoalbuminuria (figuras 2 y 3).

Aplicando el punto de corte de 125 ng/l de NT-proBNP recomendado en EE. UU., las razones de riesgos ajustadas para la covariable para la mortalidad cardiovascular y la mortalidad por cualquier otra causa solo cambiaron ligeramente: 2,68 (1,24-5,79), $p = 0,01$ y 4,09 (1,61-10,41), $p = 0,003$, respectivamente.

Los análisis de regresión de Cox, incluyendo la concentración de NT-proBNP como una variable continua, revelaron una razón de riesgos no ajustada para la mortalidad general para cada aumento diez veces mayor en el NT-proBNP de 3,39 (2,38-4,82), $p < 0,0001$; ajustada por covariables 2,67 (1,62-4,42), $p < 0,0001$. Para la mortalidad cardiovascular, la razón de riesgos no ajustada para cada aumento diez veces mayor de NT-proBNP fue de 3,58 (2,40-5,36), $p < 0,0001$; ajustada por covariables de 3,32 (1,90-5,81), $p < 0,0001$.

En conclusión, una concentración elevada de NT-proBNP circulante es un factor independiente de predicción del exceso de mortalidad total y cardiovascular en la nefropatía diabética. La medición de NT-proBNP añade información pronóstica a los métodos disponibles y puede ayudar a guiar el tratamiento de los pacientes con diabetes de tipo 1 con nefropatía diabética.

Ejemplo 3

En los pacientes con diabetes de tipo 1 con nefropatía, se observó que el PIGF no estaba correlacionado con la edad, el sexo, el HbA_{1c} y la tasa de filtración glomerular. La correlación con la excreción de albúmina urinaria era débil. En los pacientes con diabetes de tipo 1 con nefropatía, el PIGF se correlacionó con la mortalidad debida a cualquier causa y la mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares (Fig. 6 y 7).

Ejemplo 4

La tabla 4 muestra un análisis de PIGF en pacientes del estudio Steno-2. El diseño general del estudio se ha descrito en el Ejemplo 1.

ES 2 288 718 T3

TABLA 4

Enfermedades cardiovasculares y PIGF plasmático

	PIGF plasmático como factor de predicción inicial de cualquier episodio de enfermedad cardiovascular (continuo)	PIGF plasmático como factor de predicción inicial de cualquier episodio de enfermedad cardiovascular (por debajo/encima de la mediana)
Cohorte Ste-no-2 comple-ta	Razón de riesgos 1,073 (0,999 a 1,152), p=0,052	Razón de riesgos 1,22 (0,71 a 2,08), p=0,48
Grupo de tratamiento intensivo	Razón de riesgos 1,21 (1,04 a 1,41), p=0,012	Razón de riesgos 2,19 (0,79 a 6,08), p=0,13
Grupo de tratamiento convencional	Razón de riesgos 1,03 (0,95 a 1,12), p=0,46	Razón de riesgos 1,04 (0,53 a 2,04), p=0,91

Ejemplo 5

Un paciente de 55 años con diabetes de tipo 2 acude a su médico de cabecera. Se le miden el NT-proBNP (357 pg/ml), el PIGF (11 pg/ml) y el sCD40L (1,2 pg/ml) libre (es decir, no unido a trombocitos). El paciente no refiere dolor en el pecho. Los valores de NT-proBNP indican la presencia de una enfermedad cardíaca. El paciente es dirigido a un cardiólogo para que le practique un reconocimiento cardíaco exhaustivo. El electrocardiograma y la troponina T cardíaca son normales. Se reduce la dosis de rosiglitazona y se inicia un tratamiento con inhibidores de ECA y diuréticos. Seguidamente, se controla el nivel de NT-proBNP a intervalos bisemanales y alcanza un nivel de 117 pg/ml después de dos meses. Además, el nivel de la troponina T cardíaca se controla regularmente.

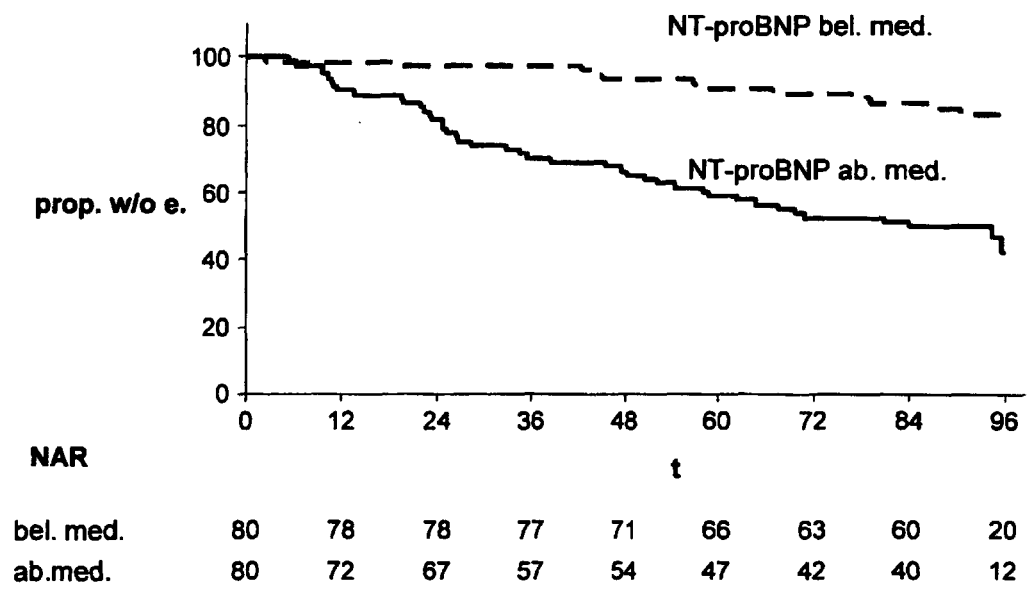
Ejemplo 6

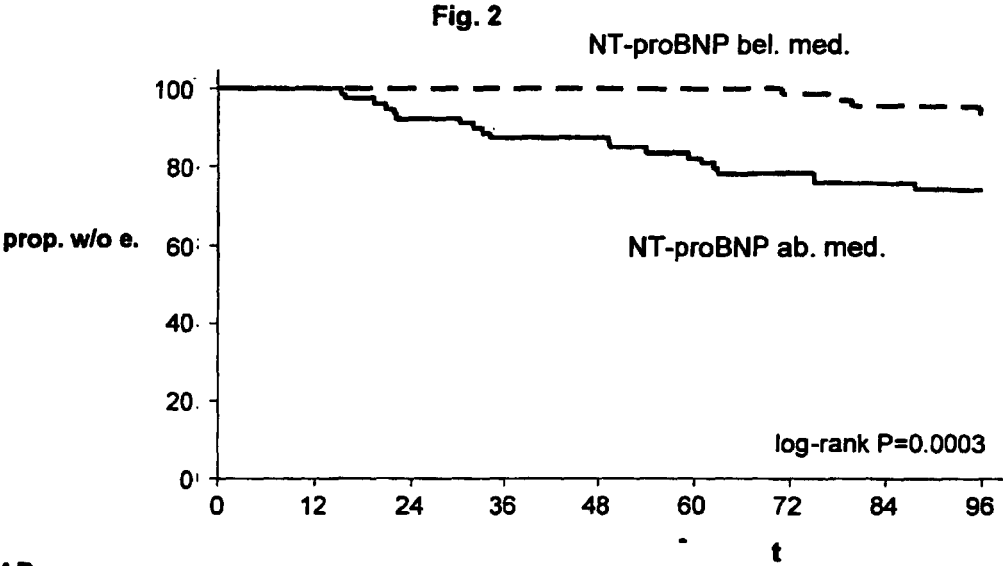
Una paciente de 62 años con diabetes de tipo de 2 acude a su especialista en diabetes. Se le miden el NT-proBNP (37 pg/ml), el PIGF (27 pg/ml) y el sCD40L (1,0 pg/ml) libre. Los valores de NT-proBNP y de PIGF indican la presencia o riesgo de una complicación cardiovascular con una característica predominante de microangiopatía. Se mide el VEGF y se confirma el diagnóstico. Se miden los valores de CML y HbA_{1c} (7,7%) e indican un control insuficiente de la glucemia. Se advierte a la paciente que haga ejercicio regularmente y que examine diariamente si tiene pequeñas lesiones en sus extremidades o signos de hipoxia. Se inicia una medicación con estatinas y la glitazonas. Se mide el nivel de NT-proBNP a intervalos cortos para detectar si el tratamiento con glitazonas causa un aumento del riesgo de sufrir una enfermedad cardíaca. Se miden mensualmente los parámetros PIGF, AGE, CML y HbA_{1c} para controlar si el tratamiento tiene los resultados esperados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar si un paciente con diabetes que no tiene antecedentes conocidos de complicaciones cardiovasculares presenta un riesgo de sufrir una complicación cardiovascular, comprende los siguientes pasos:
- a) medir *in vitro* los niveles de al menos un péptido del tipo BNP o una variante del mismo en una muestra del paciente,
- 10 b) medir *in vitro* los niveles de sCD40L o una variante del mismo en una muestra del paciente,
- c) diagnosticar el riesgo de sufrir una complicación cardiovascular, comparando los niveles medidos con los niveles conocidos asociados con el riesgo.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, donde el péptido del tipo BNP es NT-proBNP o una variante del mismo.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 2, donde el nivel del marcador para la activación plaquetaria es indicativo de un riesgo de sufrir agregación plaquetaria, formación de trombos, propagación de trombos, el riesgo de que una placa que ya está en un estado vulnerable se rompa, oclusión vascular reversible u oclusión vascular irreversible.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, donde el paciente sufre de diabetes de tipo 2.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, donde el paciente sufre de nefropatía diabética.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, donde se mide además el nivel de al menos un marcador angiogénico.
7. El método según la reivindicación 6, donde el marcador angiogénico es PIGF o una variante del mismo.
- 30 8. El método según la reivindicación 7, donde se miden los niveles de NT-proBNP y PIGF y sCD40L o variantes de los mismos.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, donde se mide además el nivel de al menos un marcador escogido del grupo que consiste en CRP, hsCRP, una variante respectiva, glucosa, HbA1c, CML y AGE.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, que comprende el diagnóstico de una manifestación de diabetes que pertenece al grupo formado por: complicaciones cardiovasculares, cardiopatías, microangiopatía, activación plaquetaria, inflamación y control insuficiente de los valores de glucemia.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1





NAR									
bel. med.	80	79	79	79	77	73	70	67	21
ab. med.	80	79	73	69	69	64	60	56	14

Fig. 3

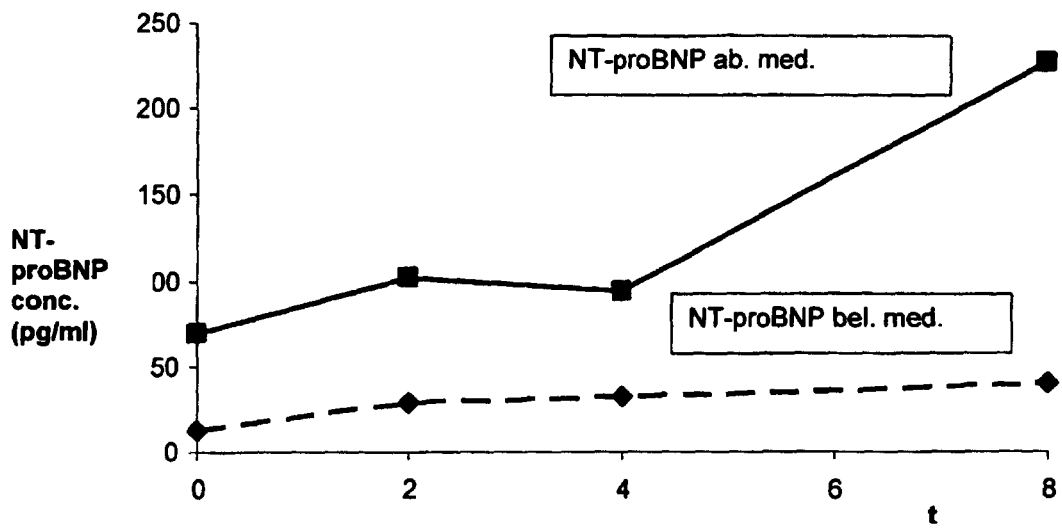


Fig. 4

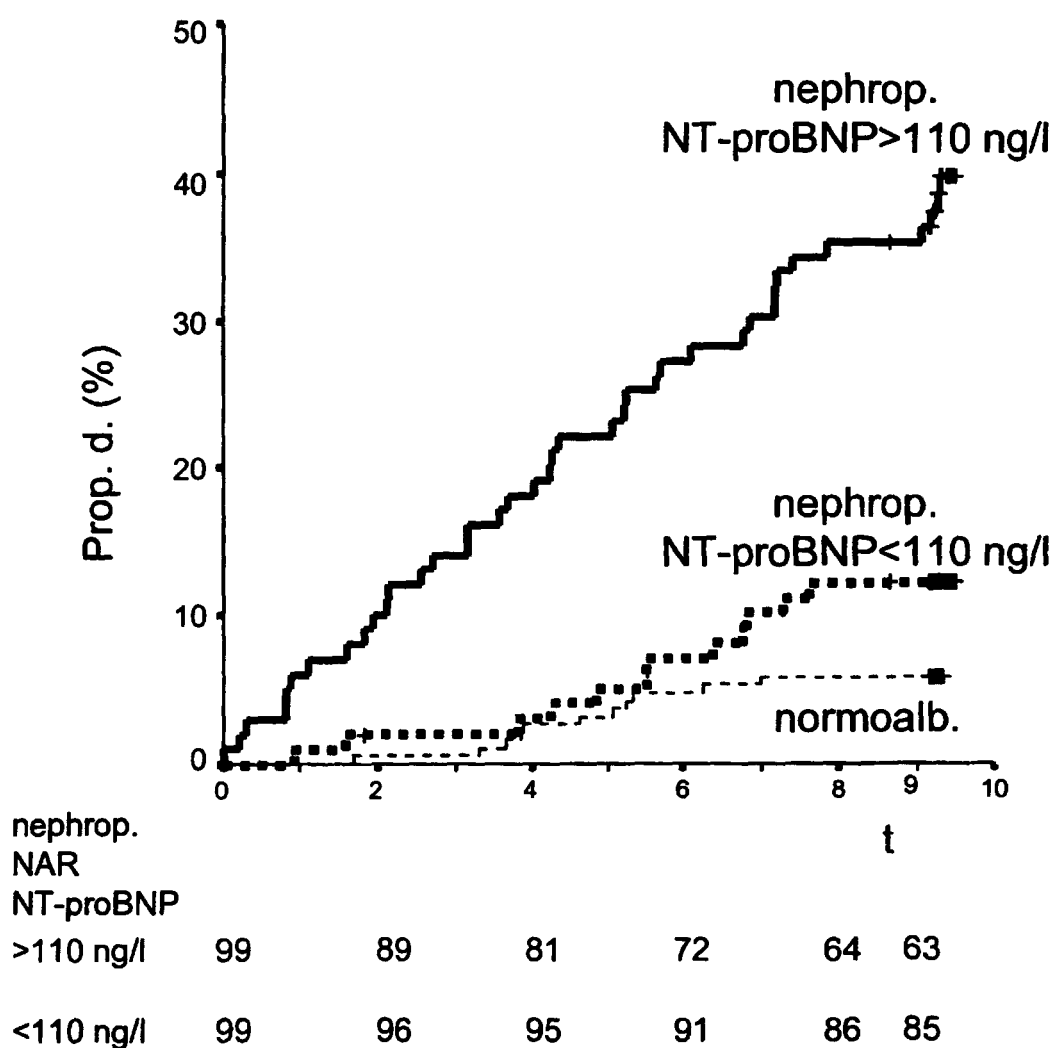


Fig. 5

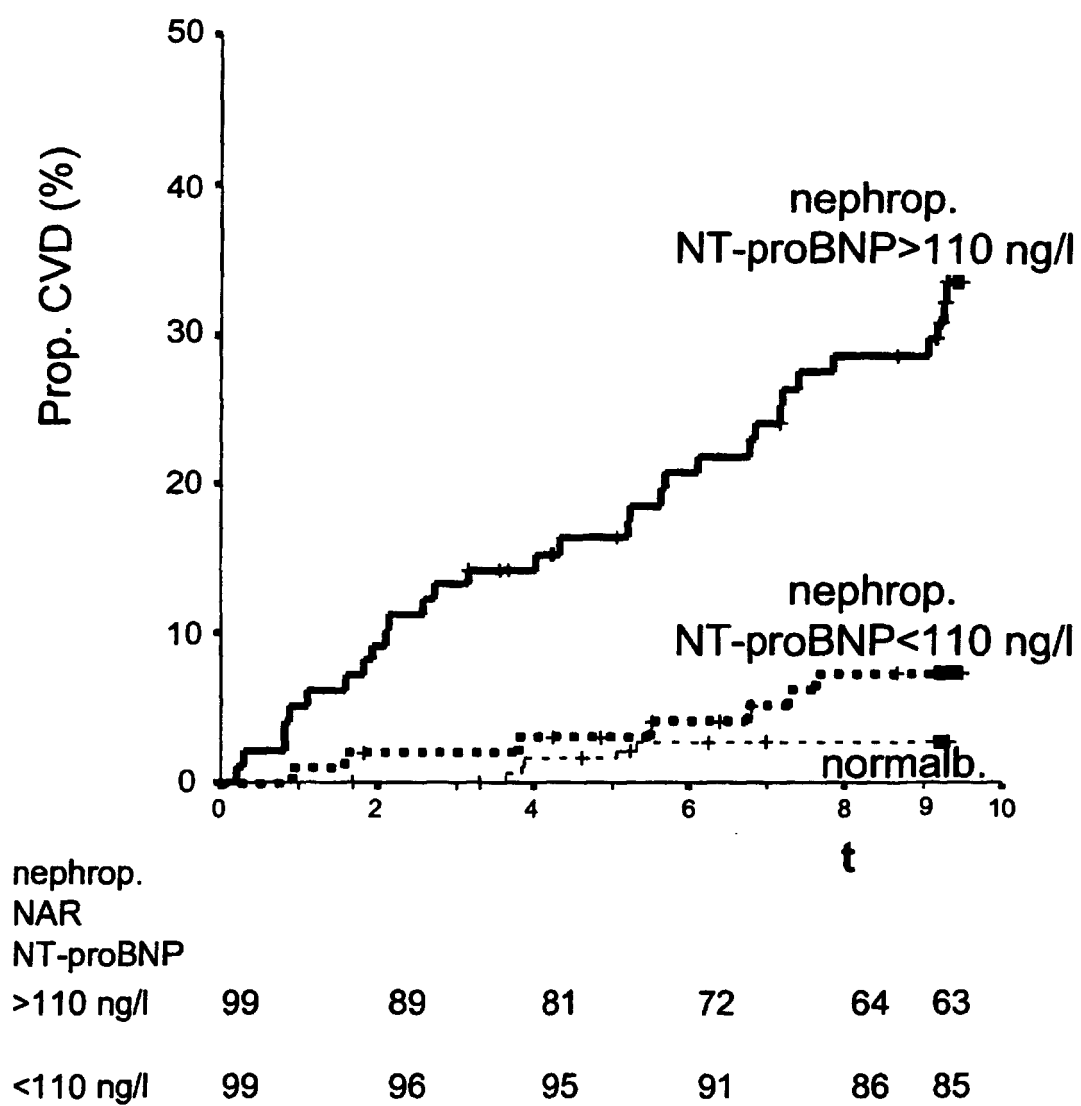


Fig. 6

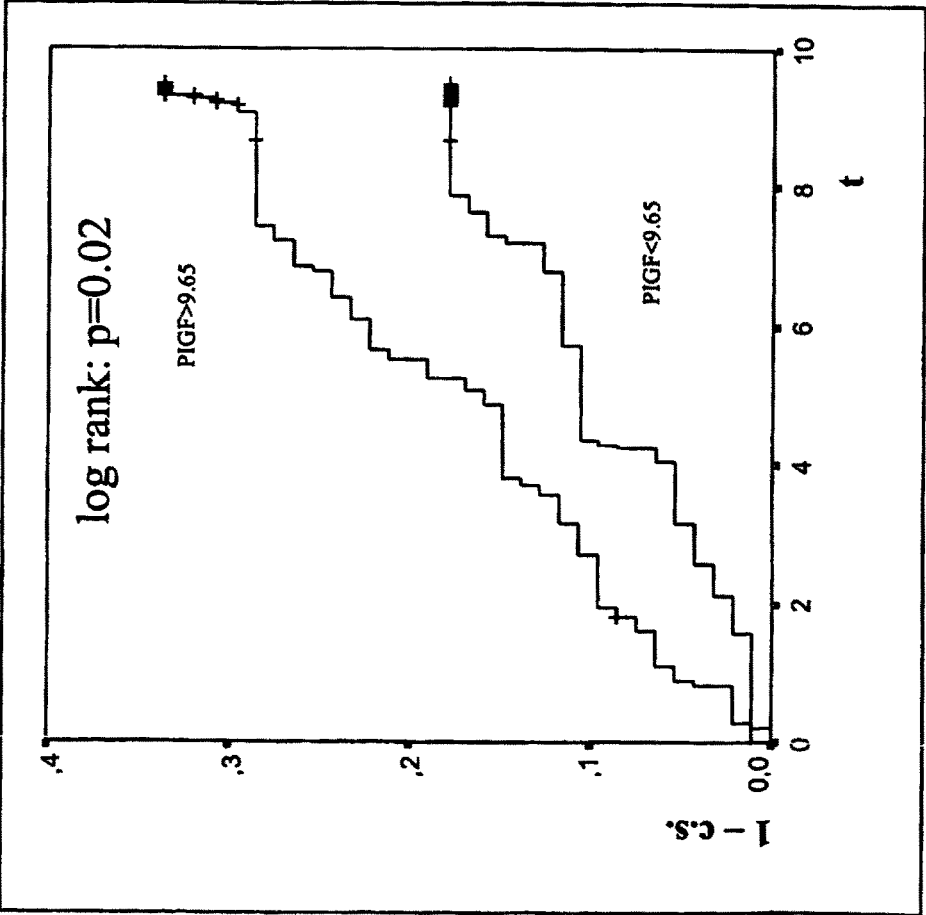


Fig. 7

