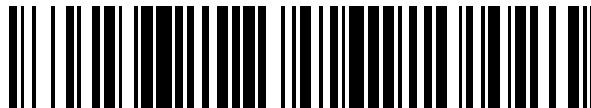


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 268**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01991098 .3**
- 96 Fecha de presentación: **14.12.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1386165**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **MARCADORES INFLAMATORIOS PARA LA DETECCIÓN Y PREVENCIÓN DE DIABETES MELLITUS.**

30 Prioridad:  
**14.12.2000 US 255632 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.02.2012**

73 Titular/es:  
**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.  
75 FRANCIS STREET  
BOSTON, MA 02115, US**

72 Inventor/es:  
**RIDKER, Paul, M. y  
MANSON, JoAnn, E.**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

**ES 2 375 268 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**

Marcadores inflamatorios para la detección y prevención de diabetes mellitus

Campo de la invención

5 Esta invención describe el nuevo uso de un ensayo de diagnóstico para determinar el riesgo de diabetes mellitus, particularmente entre individuos sin signos o síntomas de enfermedad actual. Además, esta invención describe el nuevo uso del ensayo de diagnóstico para ayudar a los médicos a determinar qué individuos en riesgo se beneficiarán preferentemente de ciertos tratamientos diseñados para prevenir o tratar la diabetes.

Antecedentes de la invención

10 A pesar de los avances significativos en terapia, la diabetes sigue siendo una causa importante de morbimortalidad en el mundo desarrollado, y la detección temprana de la diabetes es un área de gran importancia en la salud pública. Sin embargo, se ha estimado que tanto como un 50 por ciento de individuos con diabetes no están diagnosticados. Es por esta razón que hasta el 30 por ciento de los pacientes con diabetes tipo II “recientemente diagnosticada” ya tienen signos de complicaciones sistémicas en el momento del diagnóstico, dato que sugiere que la enfermedad ya ha estado presente durante 5 a 10 años.

15 Las técnicas actuales para identificar la diabetes incluyen una glucosa en ayunas en exceso de 140 mg/dl o superior en dos ocasiones, o síntomas de diabetes incontrolada con una gluemia aleatoria en exceso de 200 mg/dl, o un ensayo de tolerancia a glucosa oral positivo. Además, recientemente se ha propugnado el uso de niveles de hemoglobina glucosilada de manera que se considera que los individuos con niveles por encima de 7,0 por ciento tienen signos tempranos de la enfermedad, y de este modo son candidatos potenciales para la dieta, el ejercicio, o la intervención farmacológica.

20 Desafortunadamente, se ha encontrado que ninguno de estos ensayos detecta todos los casos incidentes de diabetes, y la mala reproducibilidad e inconveniencia clínica del ensayo de tolerancia a glucosa oral ha limitado su aplicación. Además, los datos acumulados sugieren que los efectos beneficiosos de ciertos tratamientos preventivos y terapéuticos para pacientes en riesgo de diabetes o que se sabe que tienen diabetes difieren en magnitud entre diferentes grupos de pacientes. En este momento, sin embargo, faltan datos que describan ensayos de diagnóstico para determinar si se puede esperar que ciertas terapias sean más o menos efectivas en la prevención y tratamiento de diabetes.

25 La proteína reactiva C es un marcador conocido para la inflamación sistémica subyacente. Se han descrito niveles elevados de proteína reactiva C entre pacientes con signos clínicos palpables de diabetes, y entre individuos con signos de intolerancia a la glucosa. Sin embargo, no se sabe si las asociaciones estadísticas observadas en estos estudios previos de pacientes con enfermedad palpable son casuales, son debidas a cambios inflamatorios a corto plazo, o son debidas a interrelaciones con otros factores de riesgo tales como obesidad e hiperlipidemia.

30 Existe la necesidad de desarrollar ensayos que evalúen los riesgos de un individuo a desarrollar diabetes futura o complicaciones diabéticas.

Sumario de la invención

35 Esta invención describe nuevos ensayos de diagnóstico para evaluar el riesgo del desarrollo futuro de diabetes o complicaciones diabéticas en un individuo. Estos nuevos ensayos incluyen de forma amplia (1) la predicción del riesgo de desarrollar diabetes clínicamente manifiesta, y (2) la determinación de la probabilidad de que ciertos individuos se beneficiarán en un mayor o menor grado del uso de ciertos tratamientos diseñados para prevenir y/o tratar diabetes. Estos nuevos ensayos se basan en parte en los siguientes descubrimientos. Se ha descubierto que niveles elevados de ciertos marcadores de información sistémica son predictivos del desarrollo futuro de diabetes o complicaciones diabéticas. Por ejemplo, los niveles elevados de proteína reactiva C y/o interleucina-6 en individuos aparentemente sanos, de edad media, son predictivos de un mayor riesgo de diabetes o complicaciones diabéticas. Como otro ejemplo, contrariamente a las sugerencias en la técnica anterior, los niveles elevados de ciertos marcadores de inflamación sistémica en hombres y mujeres de otro modo sanos son predictivos de un mayor riesgo de una diabetes o complicaciones diabéticas incluso después de controlar otros factores tales como obesidad, hipertensión, hiperlipidemia, y un antecedente de diabetes. Todavía como otro ejemplo, niveles elevados de ciertos marcadores de inflamación sistémica son predictivos de una mayor probabilidad de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas incluso entre individuos aparentemente sanos con un nivel de hemoglobina glucosilada (HbA1c) por debajo de 7,0 por ciento, 6,5 por ciento, e incluso 6,0 por ciento, niveles muy por debajo de aquellos considerados actualmente como indicativos de riesgo futuro de desarrollar esta diabetes o complicaciones diabéticas.

También se ha descubierto que la probabilidad de que ciertos individuos se beneficiarán en mayor o menor grado del uso de ciertos agentes terapéuticos para reducir una futura diabetes o complicaciones diabéticas se puede

determinar a partir del nivel inicial de ciertos marcadores de inflamación sistémica en un individuo.

Adicionalmente, se ha descubierto que el valor predictivo de ciertos marcadores de inflamación sistémica son independientes de otros factores predisponentes, y, por ejemplo, son menos aditivos con factores de riesgo tales como el cribado de hemoglobina glucosilada. De este modo, el nivel de marcadores de inflamación sistémica no duplica simplemente aquel que se mide cuando se obtienen niveles de un segundo factor de riesgo (por ejemplo, hemoglobina glucosilada). Por lo tanto, la combinación de estos dos métodos de detección temprana es sustancialmente mejor que aquella asociada con métodos actuales.

Como se menciona anteriormente, estos descubrimientos han conducido a nuevos ensayos de diagnóstico.

De este modo, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar la probabilidad de que un individuo se beneficiará del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de diabetes o reducir el riesgo de complicaciones diabéticas. El agente se puede seleccionar del grupo que consiste en insulina, un agente hipoglucémico, un agente antiinflamatorio, un agente reductor de lípidos, un bloqueador de canales de calcio, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, y un inhibidor del sistema de angiotensina. Para practicar el método, se obtiene un nivel de proteína reactiva C en la sangre de un individuo. Este nivel se compara entonces con un valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas, en el que un nivel de proteína reactiva C de alrededor de 0,30 mg/dl de sangre o mayor es indicativo de si el individuo se beneficiará del tratamiento con el agente. El individuo se puede caracterizar entonces en términos del beneficio neto probablemente a obtener mediante el tratamiento con el agente.

El valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas puede ser un único valor, múltiples valores, un único intervalo o múltiples intervalos. De este modo, en una realización, el valor predeterminado es una pluralidad de intervalos de niveles de marcadores predeterminados, y la etapa de comparación comprende determinar en cuál de los intervalos de los niveles de marcadores predeterminados cae el nivel del individuo. En realizaciones preferidas, el individuo está aparentemente sano. En ciertas realizaciones, el individuo tampoco fuma. El marcador de la inflamación sistémica es proteína reactiva C (CRP).

Se han obtenido resultados particularmente útiles con el marcador anterior de inflamación sistémica. En ciertas realizaciones, la invención no abarca los marcadores inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en el recuento de glóbulos blancos, albúmina, fibrinógeno, ácido siálico del suero, orosomucoide, haptoglobina, y  $\alpha_1$ -antitripsina.

Cuando el marcador de la inflamación sistémica es proteína reactiva C, entonces un valor predeterminado es alrededor de 0,30 mg/dl de sangre. Otro valor predeterminado preferido es alrededor de 0,60 mg/dl de sangre. Por supuesto, el valor predeterminado dependerá del marcador e incluso de las características de la población de pacientes en la que se encuentra el individuo, descrito con mayor detalle más abajo.

Como se menciona anteriormente, la invención está adaptada particularmente para determinar qué individuos se beneficiarán preferentemente del tratamiento con un agente para reducir el riesgo en los individuos de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas. También permite la selección de poblaciones candidatas para ensayos clínicos y para el tratamiento con fármacos candidatos, identificando, por ejemplo, los individuos que muy probablemente se beneficiarán de un nuevo tratamiento o de un tratamiento conocido con un perfil de riesgo elevado de efectos secundarios adversos. De este modo, la invención proporciona información para evaluar el probablemente beneficio neto de ciertos tratamientos para pacientes candidatos.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para caracterizar un perfil de riesgo de un individuo de desarrollar futura diabetes o complicaciones diabéticas. El método implica obtener el nivel de proteína reactiva C en el individuo. El nivel del marcador se compara entonces con un valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas, y entonces se caracteriza el perfil de riesgo del individuo de desarrollar una futura diabetes o complicaciones diabéticas basándose en el nivel del marcador comparado con un valor predeterminado. Como en el aspecto previo de la invención, un valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas es 0,30 mg/dl o mayor. En una realización, el valor predeterminado es una pluralidad de intervalos de niveles de marcadores predeterminados, y la etapa de comparación implica determinar en cuál de los intervalos de los niveles de marcadores predeterminados está el nivel del individuo. El individuo caracterizado puede ser cualquier individuo, pero preferiblemente es un individuo aparentemente sano. El individuo aparentemente sano puede ser un fumador o un no fumador.

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un método en el que se usa un marcador inflamatorio junto con un "marcador/ensayo diabético conocido" para caracterizar un perfil de riesgo de un individuo de desarrollar futura diabetes y complicaciones diabéticas. Un "marcador/ensayo diabético conocido", como se usa aquí, se refiere a marcadores y métodos conocidos usados por una persona de pericia normal en la técnica para detectar diabetes, e incluye hemoglobina glucosilada y/o ensayo de tolerancia a glucosa oral. En una realización importante, se obtiene el nivel de proteína reactiva C en el individuo. El nivel del marcador se compara con un valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas, que es 0,30 mg/dl de sangre

- o mayor, para establecer un primer valor de riesgo. También se obtiene un nivel de un marcador/ensayo diabético conocido, tal como el de hemoglobina glucosilada, en el individuo. El nivel de la hemoglobina glucosilada en el individuo se compara con un segundo valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas, para establecer un segundo valor de riesgo. El perfil de riesgo del individuo de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas se caracteriza entonces basándose en la combinación del primer valor de riesgo y del segundo valor de riesgo, en el que la combinación del primer valor de riesgo y el segundo valor de riesgo establece un tercer valor de riesgo diferente de los valores de riesgo primero y segundo. En realizaciones particularmente importantes, el tercer valor de riesgo es mayor que los valores de riesgo primero y segundo. Los individuos preferidos para el ensayo, marcadores y valores predeterminados son como se describen anteriormente.
- 5 Se describen aquí kits que comprenden un envase que incluye un ensayo para la proteína reactiva C e instrucciones, y opcionalmente materiales relacionados tales como gráficas numéricas o de color, para correlacionar el nivel de la proteína reactiva C, según se determina mediante el ensayo, con un riesgo de desarrollar futura diabetes o complicaciones diabéticas, o con otros criterios de pacientes como se describen anteriormente. En realizaciones importantes, los kits también incluyen un ensayo para una hemoglobina glucosilada.
- 10 Según todavía otro aspecto, se proporciona un método para tratar sujetos para reducir el riesgo de diabetes o una complicación diabética en los sujetos. Según la invención, se proporciona el uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en insulina, un agente hipoglucémico, un agente antiinflamatorio, un agente reductor de lípidos, un bloqueador de los canales de calcio, un bloqueador de receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, y un inhibidor del sistema de angiotensina, en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto libre de otro modo de síntomas que necesitan tratamiento con dicho agente pero que tiene un nivel de proteína reactiva C de 0,30 mg/dl o mayor, para reducir el riesgo de diabetes o una complicación diabética. Los sujetos preferidos son sujetos aparentemente sanos.
- 15 20

En realizaciones terapéuticas importantes, un agente antiinflamatorio es el agente administrado preferiblemente a un sujeto para reducir el riesgo de diabetes o una complicación diabética que se desarrolla en el sujeto. En ciertas realizaciones, el agente inflamatorio es un inhibidor de citocinas. En algunas realizaciones, el agente inflamatorio es un inhibidor del factor de necrosis tumoral a (TNF-a). Los inhibidores de TNF-a preferidos incluyen etanercept e infliximab.

25

La invención es de este modo útil proporcionando un método temprano de detección de diabetes o una complicación diabética, conduciendo también a una mayor vigilancia y/o mayor frecuencia de uso de los métodos actualmente disponibles para el cribado de la diabetes.

30

Estos y otros aspectos de la invención se describirán con más detalle más abajo en relación con la descripción detallada de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica de barras que muestra el riesgo relativo de diabetes mellitus incidente en sujetos según el nivel inicial de IL-6 y CRP; los grupos se formaron basándose en el valor del punto de corte del 75º percentil de cada uno de IL-6 y/o CRP usando distribuciones de sujetos de control en la población del estudio.

35

La Figura 2 es una gráfica de barras que muestra el riesgo relativo de diabetes mellitus según el nivel inicial de IL-6 (Fig. 2A) y CRP (Fig. 2B), y el índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>).

#### Descripción detallada de la invención

La base principal para esta invención son los datos, procedentes del estudio del Women's Health Study, de una prevención primaria a gran escala, aleatorizada, bienmascarada, controlada con placebo, de un ensayo de cardiopatía de aspirina y vitamina E realizado entre 28.000 mujeres aparentemente sanas. En ese ensayo, se encontró que el nivel del valor inicial de proteína reactiva C, un marcador para inflamación sistémica subyacente, determina el futuro riesgo de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas independientemente de una gran serie de otros factores de riesgo. Específicamente, se encontró que los individuos con los niveles más elevados del valor inicial de proteína reactiva C tienen más de 10 veces de aumento del riesgo de desarrollar futura diabetes, incluso cuando el nivel de hemoglobina glucosilada del valor inicial estaba por debajo de 6,0; entre tales individuos, los riesgos relativos brutos de desarrollar futura diabetes para aquellos con niveles iniciales de proteína reactiva C desde los cuartiles más bajos hasta los más altos fueron 1,0, 2,2, 8,7 y 15,7 (tendencia de P < 0,001). En este análisis, los puntos de corte de los cuartiles para la proteína reactiva C fueron: < 0,10, 0,11-0,26, 0,27-0,61, y > 0,61 mg/dl, respectivamente.

40 45 50

Además, este efecto siguió siendo estadísticamente significativo después de ajustar el índice de masa corporal, la hipertensión, los antecedentes de diabetes, la frecuencia del ejercicio, el consumo de alcohol, la hiperlipidemia, el tabaquismo, y el estado menopáusico. En este análisis completamente ajustado, nuevamente limitado a aquellas mujeres aparentemente sanas con niveles de hemoglobina glucosilada por debajo de 6,0 por ciento, los riesgos

55

relativos de desarrollar futura diabetes para aquellas con niveles iniciales de proteína reactiva C desde los cuartiles más bajos hasta los más altos fueron 1,0, 1,3, 4,1, y 4,2 (tendencia de P 0,001). (Véase, por ejemplo, la Tabla 3).

Además, los datos procedentes del estudio del Women's Health Study anterior muestran que los riesgos de futura diabetes parecen ser activos a aquel que se podría determinar de otro modo mediante evaluación habitual de un ensayo/marcador de la diabetes conocido, tal como, por ejemplo, la hemoglobina glucosilada. Estos datos también originan la posibilidad de que agentes que potencian la producción de proteína reactiva C pueden tener un papel importante determinando el riesgo de diabetes. Se ensayó esta hipótesis; los datos que derivan de este estudio con respecto a interleucina-6 (IL-6), una citocina enormemente responsable de la producción de proteína reactiva C en el hígado, confirmaron que este marcador inflamatorio también puede predecir el riesgo diabético. Entre los individuos en el Estudio del Women's Health, los riesgos relativos brutos de desarrollar futuras diabetes para aquellos con niveles iniciales de IL-6 desde los cuartiles más bajos hasta los más altos fueron 1,0, 2,5, 4,1, y 7,5 (tendencia de P < 0,001). En este análisis, los puntos de corte de los cuartiles para IL-6 fueron:  $\leq 0,91$ , 0,92-1,38, 1,39-2,05, y  $> 2,05$  pg/ml, respectivamente. (Véase, por ejemplo, la Tabla 2).

Además, este efecto siguió siendo estadísticamente significativo después de ajustar el índice de masa corporal, la hipertensión, los antecedentes de diabetes, la frecuencia del ejercicio, el consumo de alcohol, la hiperlipidemia, el tabaquismo, y el estado menopáusico. En este análisis completamente ajustado, nuevamente limitado a aquellas mujeres aparentemente sanas con niveles de hemoglobina glucosilada por debajo de 6,0 por ciento, los riesgos relativos de desarrollar futura diabetes para aquellas con niveles iniciales de IL-6 desde los cuartiles más bajos hasta los más altos fueron 1,0, 1,4, 1,3 y 2,3 (tendencia de P < 0,001). (Véase, por ejemplo, la Tabla 2).

La actual invención describe, en un aspecto, el uso de proteína reactiva C, un marcador inflamatorio, para predecir el riesgo de diabetes entre individuos aparentemente sanos sin signos previos de enfermedad. De este modo, estos datos extienden enormemente las observaciones previas que se han sugerido de que los niveles de proteína reactiva C están incrementados entre individuos que ya se sabe que tienen este trastorno. De hecho, no se ha sabido si las asociaciones estadísticas observadas en estudios previos de individuos con diabetes conocida son casuales o debidas a cambios inflamatorios a corto plazo, o a interacciones con otros factores de riesgo, en particular obesidad e hiperlipidemia.

En marcado contraste, los datos del estudio del Women's Health Study indican por primera vez la utilidad de la proteína reactiva C y otros marcadores inflamatorios para predecir el riesgo de futura diabetes entre individuos actualmente sanos y de otro modo con bajo riesgo, y para predecir el riesgo por encima y más allá del asociado con el cribado de otros marcadores/ensayos diabéticos conocidos tales como hemoglobina glucosilada y tolerancia a la glucosa oral. Los datos del estudio del Women's Health Study también sugieren por primera vez que los niveles de proteína reactiva C en individuos sanos se pueden usar para incrementar la frecuencia de vigilancia con otras técnicas de cribado para la diabetes (véase la discusión anterior sobre otros marcadores/ensayos diabéticos conocidos), y que la eficacia y el momento de las intervenciones diseñadas para prevenir el comienzo de diabetes o reducir la gravedad de las complicaciones diabéticas pueden diferir en magnitud basándose en una medida del grado de inflamación sistémica subyacente.

La invención se entenderá mejor con referencia a la siguiente explicación breve de términos.

"Diabetes", como se usa aquí, se refiere a diabetes mellitus (tanto tipo I: diabetes mellitus insulino dependiente, como tipo II: diabetes mellitus no insulino dependiente), e incluye síndrome de resistencia a insulina, tal como resistencia de prerreceptor (insulinas mutadas, anticuerpos anti-insulina), y resistencia de receptor y post-receptor (obesidad, receptor ausente o disfuncional, anticuerpo contra el receptor de insulina, estados lipodistróficos, leprechaunismo, ataxia-telangiectasia, síndrome de Rabson-Mendenhall, síndrome de Werner, síndrome de Alström, síndrome de hiperplasia pineal).

"Complicaciones diabéticas", como se usa aquí, se refiere a complicaciones metabólicas agudas (cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar), y complicaciones tardías (anormalidades circulatorias, retinopatía, nefropatía diabética, neuropatía diabética, úlceras diabéticas del pie).

Una descripción más detallada de los términos anteriores se puede obtener de un número de fuentes conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Experimental Medicine, 13ª Edition, McGraw-Hill, Inc., N.Y).

"Aparentemente sano", como se usa aquí, significa individuos que no han tenido previamente ningún signo clínico de diabetes, y quienes de otro modo no muestran síntomas de enfermedad. En otras palabras, tales individuos, si son examinados por un profesional médico, se caracterizarían como sanos y libres de síntomas de enfermedad.

"No fumador", como se usa aquí, significa un individuo que, en el momento de la evaluación, no es fumador. Esto incluye individuos que nunca han fumado, así como individuos que en el pasado han fumado pero actualmente ya no fuman.

Los agentes para reducir el riesgo de diabetes o complicaciones diabéticas incluyen aquellos seleccionados del

grupo que consiste en insulina, agentes hipoglucémicos, agentes antiinflamatorios, agente reductor de lípidos, bloqueadores de canales de calcio, bloqueadores de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, inhibidores de ciclooxigenasa-2, e inhibidores del sistema de angiotensina.

5 “Insulina” incluye formas de actuación rápida, tales como insulina lispro procedente de ADNr: HUMALOG® (1,5 ml, 10 ml, Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN), inyección de insulina (Insulina Regular) de vacuno y de cerdo (ILETIN® I regular, Eli Lilly), humana: ADNr: HUMULIN® R (Eli Lilly), NOVOLIN® R (Novo Nordisk, Nueva York, NY), semisintética: VELOSULIN® Humana (Novo Nordisk), ADNr humana, tamponada: VELOSULIN® BR, cerdo: insulina regular (Novo Nordisk), cerdo purificada: Pork Regular ILETIN® II (Eli Lilly), Regular Purified Pork Insulin (Novo Nordisk), y Regular (Concentrated) ILETIN® II U-500 (500 unidades/ml, Eli Lilly); formas de actuación intermedia, 10 tales como suspensión insulínica de cinc, vacuno y cerdo: LENTE® ILETIN® I (Eli Lilly), humana, ADNr: HUMULIN® L (Eli Lilly), NOVOLIN® L (Novo Nordisk), cerdo purificada: LENTE® ILETIN® II (Eli Lilly), Isophane Insulin Suspension (NPH): vacuno y cerdo: NPH ILETIN® I (Eli Lilly), humana, ADNr: HUMULIN® N (Eli Lilly), Novolin® N (Novo Nordisk), cerdo purificada: Pork NPH Iletin® II (Eli Lilly), NPH-N (Novo Nordisk); y formas de actuación prolongada, tales como suspensión de cinc insulínica, extendida (ULTRALENTE®, Eli Lilly), humana, ADNr: HUMULIN® U (Eli Lilly).

Los agentes “hipoglucémicos” son preferiblemente agentes hipoglucémicos orales, e incluyen sulfonilureas de primera generación: acetohexamida (Dymelor), clorpropamida (Diabinese), tolbutamida (Orinase); sulfonilureas de segunda generación: glipicida (Glucotrol, Glucotrol XL), gliburida (Diabeta; Micronase; Glynase), glimepirida (Amaryl); biguanidas: metformina (Glucophage); inhibidores de alfa-glucosidasa: acarbosa (Precose), miglitol (Glyset), tiazolindionas: rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos), troglitazona (Rezulin); meglitinidas: repaglinida (Prandin); y otros hipoglucémicos tales como acarbosa; buformina; hidroclicloruro de butoxamina; camiglibosina; ciglitazona; englitazona sódica; darglitazona sódica; hidroclicloruro de etoformina; gliamilitida; glibornurida; glicetaniol; gliclacida sódica; gliflumida; glucagón; glihexamida; glimidina sódica; glioctamida; gliparamida; linoglitrida; fumarato de linoglitrida; palmoxirato de metilo; palmoxirato sódico; tartrato de piroglitrida; proinsulina humana; acetato de seglitida; tolazamida; tolpirramida; zopolrestat. Otros agentes hipoglucémicos se describen con detalle en las 20 patentes U.S.: 6.121.282, 6.057.343, 6.048.842, 6.037.359, 6.030.990, 5.990.139, 5.981.510, 5.980.902, 5.955.481, 5.929.055, 5.925.656, 5.925.647, 5.916.555, 5.900.240, 5.885.980, 5.849.989, 5.837.255, 5.830.873, 5.830.434, 5.817.634, 5.783.556, 5.756.513, 5.753.790, 5.747.527, 5.731.292, 5.728.720, 5.708.012, 5.691.386, 5.681.958, 5.677.342, 5.674.900, 5.545.672, 5.532.256, 5.531.991, 5.510.360, 5.480.896, 5.468.762, 5.444.086, 5.424.406, 30 5.420.146, RE34.878, 5.294.708, 5.268.373, 5.258.382, 5.019.580, 4.968.707, 4.845.231, 4.845.094, 4.816.484, 4.812.471, 4.740.521, 4.716.163, 4.695.634, 4.681.898, 4.622.406, 4.499.279, 4.467.681, 4.448.971, 4.430.337, 4.421.752, 4.419.353, 4.405.625, 4.374.148, 4.336.391, 4.336.379, 4.305.955, 4.262.018, 4.220.650, 4.207.330, 4.195.094, 4.172.835, 4.164.573, 4.163.745, 4.141.898, 4.129.567, 4.093.616, 4.073.910, 4.052.507, 4.044.015, 4.042.583, 4.008.245, 3.992.388, 3.987.172, 3.961.065, 3.954.784, 3.950.518, 3.933.830, cuyas descripciones se 35 incorporan aquí como referencia.

Los agentes “antiinflamatorios” incluyen alclofenaco; dipropionato de alclometasona; acetónido de algestona; alfa amilasa; amcinafal; amcinafida; amfenaco sódico; hidroclicloruro de amiprilosa; anakinra; aniolaco; anitrazafén; apazona; balsalazida disódica; bendazac; benoxaprofeno; hidroclicloruro de bencidamina; bromelaínas; broperamol; budesonida; carprofeno; cicloprofeno; cintazona; cliprofeno; propionato de clobetasol; butirato de clobetasol; 40 clopirac; propionato de cloticasona; acetato de cormetasona; cortodoxona; deflazacort; desonida; desoximetasona; dipropionato de dexametasona; diclofenaco potásico; diclofenaco sódico; diacetato de diflorasona; diflumidona sódica; diflunisal; difluprednato; diftalona; dimetilsulfóxido; drocinonida; endrisona; enlimomab; enolicam sódico; epirizol; etodolaco; etofenamato; felbinaco; fenamol; fenbufeno; fenclofenaco; fencloraco; fendosal; fempipalona; fentiazaco; flazalona; fluazacort; ácido flufenámico; flumizol; acetato de flunisolida; flunixina; flunixina meglumina; 45 fluocortin butilo; acetato de fluorometolona; flucuaazona; flurbiprofeno; fluretofeno; propionato de fluticasona; furaprofeno; furobufeno; halcinonida; propionato de halobetasol; acetato de halopredona; ibufenaco; ibuprofeno; ibuprofeno aluminico; ibuprofeno piconol; ilonidap; indometacina; indometacina sódica; indoprofeno; indoxol; intrazol; acetato de isoflupredona; isoxepac; isoxicam; quetoprofen; hidroclicloruro de lofemizol; lornoxicam; etabonato de loteprednol; meclofenamato sódico; ácido meclofenámico; dibutirato de meclorisona; ácido mefenámico; 50 mesalamina; meseclazona; suleptanato de metilprednisolona; morniflumato; nabumetona; naproxeno; naproxeno sódico; naproxol; nimazona; olsalazina sódica; orgoteína; orpanoxina; oxaprozina; oxifenbutazona; hidroclicloruro de parnilina; polisulfato de pentosano sódico; glicerato de fenbutazona sódica; pifrenidona; piroxicam; cinamato de piroxicam; piroxicam olamina; pirprofeno; prednazato; prifelona; ácido prodólico; procuazona; proxazol; citrato de proxazol; rimexolona; romazarit; salcolex; salnacedina; salsalato; salicilatos; cloruro de sanguinario; seclazona; sermetacina; sudoxicam; sulindaco; supprofeno; talmecacina; talniflumato; talosalato; tebufelona; tenidap; tenidap 55 sódica; tenoxicam; tescam; tesimida; tetridamina; tiopinaco; pivalato de tixocortol; tolmetina; tolmetina sódica; triclona; triflumidato; zidometacina; glucocorticoides; zomepiraco sódico. Un agente antiinflamatorio importante es aspirina.

Los agentes antiinflamatorios preferidos son inhibidores de citocinas. Los inhibidores de citocinas importantes 60 incluyen antagonistas de citocinas (por ejemplo, antagonistas del receptor de IL-6), aza-alquil lisofosfolípidos (AALP), e inhibidores del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), tales como anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ , receptor de TNF

soluble, moléculas de ácido nucleico antisentido de TNF- $\alpha$ , guanilhidrazona multivalente (CNI-1493), N-acetilcisteína, pentoxifilina, oxpentifilina, análogos nucleosídicos carbocíclicos, pequeña molécula S9a, RP 55778 (un inhibidor de la síntesis de TNF- $\alpha$ ), dexanabinol (HU-211, es un cannabinoide sintético desprovisto de efectos cannabimiméticos, e inhibe la producción de TNF- $\alpha$  en una etapa post-transcripcional), MDL 201.449A (9-[(1R,3R)-transciclopentan-3-ol]adenina), y tricodimerol (BMS-182123). Los inhibidores de TNF- $\alpha$  son etanercept (ENBREL®, Immunex, Seattle) e infliximab (REMICADE®, Centocor, Malvern, PA). Otros inhibidores de TNF- $\alpha$  se describen con detalle en las patentes U.S.: 6.143.866, 6.127.378, 6.103.702, 5.998.378, 5.985.592, 5.972.928, 5.877.180, 5.853.977, 5.849.501, 5.846.755, 5.843.675, 5.830.742, 5.820.858, 5.795.574, 5.762.921, 5.747.532, 5.691.382, 5.660.826, 5.654.312, y 5.091.511.

“Agentes reductores de lípidos” incluyen gemfibrocilo, colistiramina, colestipol, ácido nicotínico, e inhibidores de HMG-CoA reductasa. La HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) reductasa es la enzima microsómica que cataliza la reacción limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol (mevalonato de HMG-CoA). Un inhibidor de HMG-CoA reductasa inhibe la HMG-CoA reductasa, y como resultado inhibe la síntesis de colesterol. Se ha usado un gran número de inhibidores de HMG-CoA reductasa para tratar a individuos con hipercolesterolemia. Más recientemente, se ha demostrado que los inhibidores de HMG-CoA reductasa son beneficiosos en el tratamiento de apoplejía (Endres M, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95:8880-5).

Los inhibidores de HMG-CoA reductasa útiles para la administración o coadministración con otros agentes según la invención incluyen, pero no se limitan a, simvastatina (patente U.S. n° 4.444.784), lovastatina (patente U.S. n° 4.231.938), pravastatina sódica (patente U.S. n° 4.346.227), fluvastatina (patente U.S. n° 4.739.073), atorvastatina (patente U.S. n° 5.273.995), cerivastatina, y otros numerosos descritos en la patente U.S. n° 5.622.985, patente U.S. n° 5.135.935, patente U.S. n° 5.356.896, patente U.S. n° 4.920.109, patente U.S. n° 5.286.895, patente U.S. n° 5.262.435, patente U.S. n° 5.260.332, patente U.S. n° 5.317.031, patente U.S. n° 5.283.256, patente U.S. n° 5.256.689, patente U.S. n° 5.182.298, patente U.S. n° 5.369.125, patente U.S. n° 5.302.604, patente U.S. n° 5.166.171, patente U.S. n° 5.202.327, patente U.S. n° 5.276.021, patente U.S. n° 5.196.440, patente U.S. n° 5.091.386, patente U.S. n° 5.091.378, patente U.S. n° 4.904.646, patente U.S. n° 5.385.932, patente U.S. n° 5.250.435, patente U.S. n° 5.132.312, patente U.S. n° 5.130.306, patente U.S. n° 5.116.870, patente U.S. n° 5.112.857, patente U.S. n° 5.102.911, patente U.S. n° 5.098.931, patente U.S. n° 5.081.136, patente U.S. n° 5.025.000, patente U.S. n° 5.021.453, patente U.S. n° 5.017.716, patente U.S. n° 5.001.144, patente U.S. n° 5.001.128, patente U.S. n° 4.997.837, patente U.S. n° 4.996.234, patente U.S. n° 4.994.494, patente U.S. n° 4.992.429, patente U.S. n° 4.970.231, patente U.S. n° 4.968.693, patente U.S. n° 4.963.538, patente U.S. n° 4.957.940, patente U.S. n° 4.950.675, patente U.S. n° 4.946.864, patente U.S. n° 4.946.860, patente U.S. n° 4.940.800, patente U.S. n° 4.940.727, patente U.S. n° 4.939.143, patente U.S. n° 4.929.620, patente U.S. n° 4.923.861, patente U.S. n° 4.906.657, patente U.S. n° 4.906.624 y patente U.S. n° 4.897.402.

Los “bloqueadores de canales de calcio” son una clase químicamente diversa de compuestos que tienen un valor terapéutico importante en el control de una variedad de enfermedades, incluyendo varios trastornos cardiovasculares, tales como hipertensión, angina, y arritmias cardíacas (Fleckenstein, Cir. Res. v. 52, (supl. 1), p. 13-16 (1983); Fleckenstein, Experimental Facts and Therapeutic Prospects, John Wiley, New York (1983); McCall, D., Curr Pract Cardiol, v. 10, p. 1-11 (1985)). Los bloqueadores de canales de calcio son un grupo heterogéneo de fármacos que evitan o ralentizan la entrada de calcio en las células regulando los canales de calcio celulares. (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Decimonovena Edición, Mack Publishing Company, Eaton, PA, p. 963 (1995)). La mayoría de los bloqueadores de canales de calcio actualmente disponibles, y útiles según la presente invención, pertenecen a uno de tres grupos químicos principales de fármacos, las dihidropiridinas, tales como nifedipina, las fenilalquilaminas, tales como verapamilo, y las benzotiazepinas, tales como diltiazem. Otros bloqueadores de canales de calcio útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, amrinona, amlodipina, benciclana, felodipina, fendilina, flunaricina, isradipina, nicardipina, nimodipina, perhexileno, gallopamilo, tiapamilo y análogos de tiapamilo (tales como 1993RO-11-2933), fenitofina, barbituratos, y los péptidos dinorfina, omega-conotoxina, y omega-agatoxina, y similares, y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los “agentes bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos” son una clase de fármacos que antagonizan los efectos cardiovasculares de catecolaminas en angina de pecho, hipertensión, y arritmias cardíacas. Los bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos incluyen, pero no se limitan a, atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindolol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimepranolol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxi-propoxi)-3-piridincarbonitrilo HCl, 1-butilamino-3-(2,5-diclorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiltio)-4-(5-carbamoil-2-tienil)tiazol, 7-(2-hidroxi-3-t-butilaminopropoxi)ftalida. Los compuestos identificados anteriormente se pueden usar como mezclas isómeras, o en su forma levogiratoria o dextrogiratoria respectiva.

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una forma recientemente identificada de una ciclooxigenasa. La “ciclooxigenasa” es un complejo enzimático presente en la mayoría de los tejidos que producen diversas prostaglandinas y tromboxanos a partir de ácido araquidónico. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos ejercen la mayoría de su actividad

antiinflamatoria, analgésica y antipirética e inhiben las contracciones uterinas inducidas por hormonas e inhiben ciertos tipos de crecimiento de cáncer a través de la inhibición de la ciclooxigenasa (también conocida como *prostaglandina G/H sintasa* y/o *prostaglandina endoperóxido sintasa*). Inicialmente, sólo se conocía una forma de ciclooxigenasa, la "enzima constitutiva" o ciclooxigenasa 1 (COX-1). Originalmente se identificó en vesículas seminales bovinas.

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) se ha clonado, secuenciado y caracterizado inicialmente a partir de fuentes de pollo, murinas y humanas (véase, por ejemplo, la patente U.S. 5.543.297, expedida el 6 de agosto de 1996 a Cromlish, et al., y cedida a Merck Frosst Canadá, Inc., Kirkland, CA, titulada: "ADNc de ciclooxigenasa 2 humana, y ensayos para evaluar la actividad de ciclooxigenasa 2"). Esta enzima es distinta de la COX-1. La COX-2 es rápida y fácilmente inducible por un número de agentes que incluyen mitógenos, endotoxinas, hormonas, citocinas y factores de crecimiento. Puesto que las prostaglandinas tienen papeles tanto fisiológicos como patológicos, la enzima constitutiva, COX-1, es responsable, en gran parte, de la liberación basal endógena de prostaglandinas, y por tanto es importante en sus funciones fisiológicas tales como el mantenimiento de la integridad gastrointestinal y el flujo sanguíneo renal. Por el contrario, se cree que la forma inducible, COX-2, es principalmente responsable de los efectos patológicos de prostaglandinas, en los que la inducción rápida de la enzima podría ocurrir en respuesta a agentes tales como agentes inflamatorios, hormonas, factores de crecimiento, y citocinas. Por lo tanto, se cree que un inhibidor selectivo de COX-2 tiene propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas similares a un fármaco antiinflamatorio no esteroideo convencional, y además inhibe las contracciones uterinas inducidas por hormonas y también tiene efectos anticancerígenos potenciales, pero con efectos secundarios reducidos. En particular, se cree que tales inhibidores de COX-2 tienen un potencial reducido de toxicidad gastrointestinal, un potencial reducido de efectos secundarios renales, un potencial reducido de tiempos de hemorragia, y posiblemente un potencial reducido para inducir ataques de asma en sujetos asmáticos sensibles a la aspirina, y por lo tanto son útiles según la presente invención.

En la técnica se conoce un gran número de "inhibidores de COX-2" selectivos. Estos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de COX-2 descritos en la patente U.S. 5.474.995 "Fenilheterociclos como inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.521.213 "Heterociclos bicíclicos diarílicos como inhibidores de ciclooxigenasa 2"; la patente U.S. 5.536.752 "Fenilheterociclos como inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.550.142 "Fenilheterociclos como inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.552.422 "Compuestos nitrogenados aromáticos fusionados 5,5 sustituidos con arilo como agentes antiinflamatorios"; la patente U.S. 5.604.253 "Derivados de ácido N-bencilindol-3-ilpropanoico como inhibidores de ciclooxigenasa"; la patente U.S. 5.604.260 "5-Metanosulfonamido-1-indanonas como un inhibidor de ciclooxigenasa 2"; la patente U.S. 5.639.780 "Derivados de ácido N-bencilindol-3-ilbutanoico como inhibidores de ciclooxigenasa"; la patente U.S. 5.677.318 "Difenil-1,2,3-tiadiazoles como agentes antiinflamatorios"; la patente U.S. 5.691.374 "Diaril-5-oxigenado-2-(5H)-furanonas como inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.698.584 "3,4-diaril-2-hidroxi-2,5-dihidrofuranos como profármacos para inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.710.140 "Fenilheterociclos como inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.733.909 "Difenilestilbenos como profármacos para inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.789.413 "Estirenos alquilados como profármacos para inhibidores de COX-2"; la patente U.S. 5.817.700 "Derivados de bisarilciclobutenos como inhibidores de ciclooxigenasa"; la patente U.S. 5.849.943 "Derivados de estilbeno útiles como inhibidores de ciclooxigenasa-2"; la patente U.S. 5.861.419 "Piridinas sustituidas como inhibidores de ciclooxigenasa-2 selectivos"; la patente U.S. 5.922.742 "Piridinil-2-ciclopenten-1-onas como inhibidores de ciclooxigenasa-2 selectivos"; la patente U.S. 5.925.631 "Estirenos alquilados como profármacos para inhibidores de COX-2"; todos los cuales están cedidos en común a Merck Frosst Canadá, Inc. (Kirkland, CA). Los inhibidores de COX-2 adicionales también se describen en la patente U.S. 5.643.933, cedida a G. D. Searle & Co. (Skokie, IL), titulada: "Sulfonilfenil-heterociclos sustituidos como inhibidores de ciclooxigenasa-2 y 5-lipoxigenasa".

Un gran número de los inhibidores de COX-2 identificados anteriormente son profármacos de inhibidores selectivos de COX-2, y ejercen su acción mediante conversión *in vivo* en los inhibidores activos y selectivos de COX-2. Los inhibidores activos y selectivos de COX-2, formados a partir de los profármacos de inhibidores de COX-2 identificados anteriormente, se describen con detalle en los documentos WO 95/00501, publicado el 5 de enero de 1995, WO 95/18799, publicado el 13 de julio de 1995, y en la patente U.S. 5.474.995, expedida el 12 de diciembre de 1995. Dadas las enseñanzas de la patente U.S. 5.543.297, titulada: "ADNc de ciclooxigenasa 2 humana, y ensayos para evaluar la actividad de ciclooxigenasa 2", una persona de pericia normal en la técnica sería capaz de determinar si un agente es un inhibidor selectivo de COX-2 o un precursor de un inhibidor de COX-2, y por lo tanto es parte de la presente invención.

Un "inhibidor del sistema de angiotensina" es un agente que interfiere con la función, síntesis o catabolismo de angiotensina II. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de angiotensina II, antagonistas del receptor de angiotensina II, agentes que activan el catabolismo de angiotensina II, y agentes que previenen la síntesis de angiotensina I a partir de la que a la postre deriva angiotensina II. El sistema de renina-angiotensina está indicado en la regulación de la hemodinámica y el balance de agua y electrolitos. Los factores que reducen el volumen sanguíneo, la presión de perfusión renal, o la concentración de Na<sup>+</sup> en el plasma tienden a activar el sistema, mientras que los factores que incrementan estos



parámetros tienden a suprimir su función.

La angiotensina I y la angiotensina II son sintetizadas por la ruta enzimática de renina-angiotensina. El proceso sintético se inicia cuando la enzima renina actúa como angiotensinógeno, una pseudoglobulina en plasma sanguíneo, para producir el decapeptido angiotensina I. La angiotensina I es convertida mediante la enzima conversora de angiotensina (ACE) en angiotensina II (octapeptido de angiotensina [1-8]). Ésta última es una sustancia vasotensora activa que está implicada como agente causal en varias formas de hipertensión en diversas especies de mamíferos, por ejemplo seres humanos.

Los inhibidores del sistema de angiotensina (renina-angiotensina) son compuestos que actúan para interferir con la producción de angiotensina II a partir de angiotensinógeno o angiotensina I, o interfieren con la actividad de angiotensina II. Tales inhibidores son bien conocidos por los de pericia normal en la técnica, e incluyen compuestos que actúan para inhibir las enzimas implicadas en la producción final de angiotensina II, incluyendo renina y ACE. También incluyen compuestos que interfieren con la actividad de angiotensina II, una vez producida. Los ejemplos de clases de tales compuestos incluyen anticuerpos (por ejemplo, contra renina), aminoácidos y sus análogos (incluyendo aquellos conjugados a moléculas más grandes), péptidos (incluyendo análogos peptídicos de angiotensina y angiotensina I), análogos relacionados con pro-renina, etc. Entre los inhibidores del sistema de renina-angiotensina más potentes y útiles están los inhibidores de renina, inhibidores de ACE, y antagonistas de angiotensina II. En una realización preferida de la invención, los inhibidores del sistema de renina-angiotensina son inhibidores de renina, inhibidores de ACE, y antagonistas de angiotensina II.

Los "antagonistas de angiotensina II" son compuestos que interfieren con la actividad de angiotensina II mediante la unión a receptores de angiotensina II e interfiriendo con su actividad. Los antagonistas de angiotensina II son bien conocidos, e incluyen compuestos peptídicos y compuestos no peptídicos. La mayoría de los antagonistas de angiotensina II son congéneres ligeramente modificados en los que la actividad agonista está atenuada por la sustitución de fenilalanina en la posición 8 por algún otro aminoácido; la estabilidad se puede potenciar mediante otras sustituciones que ralentizan la degeneración *in vivo*. Los ejemplos de antagonistas de angiotensina II incluyen: compuestos peptídicos (por ejemplo, saralasin, [(San<sup>1</sup>)(Val<sup>5</sup>)(Ala<sup>8</sup>)] octapeptido de angiotensina (1-8) y análogos relacionados); imidazol-2-ona N-sustituida (patente US número 5.087.634); derivados de acetato de imidazol, incluyendo ácido 2-N-butil-4-cloro-1-(2-clorobencil)imidazol-5-acético (véase Long et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 247(1), 1-7 (1988)); ácido 4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico y derivados análogos (patente US número 4.816.463); análogos N2-tetrazol betaglucuronida (patente US número 5.085.992); pirroles, pirazoles, y triazoles sustituidos (patente US número 5.081.127); y derivados fenólicos heterocíclicos tales como 1,3-imidazoles (patente US número 5.073.566); heterociclos anulares de 7 miembros imidazo condensados (patente US número 5.064.825); péptidos (por ejemplo, patente US número 4.772.684); anticuerpos contra angiotensina II (por ejemplo, patente US número 4.302.386); y compuestos aralquilimidazólicos tales como imidazoles sustituidos con bifenilmetilo (por ejemplo, EP número 253.310, 20 de enero de 1988); ES8891 (N-morfolinoacetil-(1-naftil)-L-alanil-(4-tiazolil)-L-alanil(35,45)-4-amino-3-hidroxi-5-ciclo-hexapentanoil-N-hexilamida, Sankyo Company, Ltd., Tokio, Japón); SKF108566 ácido (E-alfa-2-[2-butil-1-(carboxifenil)metil]-1H-imidazol-5-il[metilan]-2-tiofenpropanoico, Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA); losartán (DUP753/MK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company); temiquirin (R042-5892, F. Hoffman LaRoche AG); agonistas de A<sub>2</sub> (Marion Merrill Dow) y ciertos heterociclos no peptídicos (G.D. Searle and Company).

La "enzima conversora de angiotensina (ACE)" es una enzima que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II. Los inhibidores de ACE incluyen aminoácidos y sus derivados, péptidos, incluyendo di- y tripeptidos y anticuerpos frente a ACE, que intervienen en el sistema de renina-angiotensina inhibiendo la actividad de ACE, reduciendo o eliminando de ese modo la formación de la sustancia vasotensora angiotensina II. Los inhibidores de ACE se han usado médicamente para tratar hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio y nefropatía. Las clases de compuestos que se sabe que son útiles como inhibidores de ACE incluyen acilmercapto y mercaptoalcanoil prolinas, tales como captoprilo (patente US número 4.105.776) y zofenopril (patente US número 4.316.906), carboxialquil dipéptidos tales como enalapril (patente US número 4.374.829), lisinopril (patente US número 4.374.829), quinapril (patente US número 4.344.949), ramipril (patente US número 4.587.258), y perindopril (patente US número 4.508.729), miméticos dipeptídicos carboxialquílicos, tales como cilazapril (patente US número 4.512.924) y benazapril (patente US número 4.410.520), fosfinilalcanoil prolinas, tales como fosinopril (patente US número 4.337.201) y trandolopril.

Los "inhibidores de renina" son compuestos que interfieren con la actividad de renina. Los inhibidores de renina incluyen aminoácidos y sus derivados, péptidos y sus derivados, y anticuerpos contra renina. Los ejemplos de inhibidores de renina que son el objeto de las patentes de los Estados Unidos de América son los siguientes: derivados de urea de péptidos (patente US número 5.116.835); aminoácidos conectados mediante enlaces no peptídicos (patente US número 5.114.937); derivados de di- y tri-peptídicos (patente US número 5.106.835); aminoácidos y sus derivados (patentes US números 5.104.869 y 5.095.119); diol sulfonamidas y sulfinilos (patente US número 5.098.924); péptidos modificados (patente US número 5.095.006); peptidil beta-aminoacil aminodiol carbamatos (patente US número 5.089.471); pirrolimidazolonas (patente US número 5.075.451); péptidos que contienen estatina o estatona fluorados y clorados (patente US número 5.066.643); peptidil amino dioles (patentes

US números 5.063.208 y 4.845.079); derivados N-morfolínicos (patente US número 5.055.466); derivados de pepstatina (patente US número 4.980.283); alcoholes N-heterocíclicos (patente US número 4.885.292); anticuerpos monoclonales contra renina (patente US número 4.780.401); y una variedad de otros péptidos y sus análogos (patentes US números 5.071.837, 5.064.965, 5.063.207, 5.036.054, 5.036.053, 5.034.512, y 4.894.437).

5 En la práctica de los métodos de la presente invención, se requiere obtener el nivel de proteína reactiva C en un individuo. El nivel de proteína reactiva C se puede obtener mediante cualquier método reconocido en la técnica, aunque para esta aplicación se requiere un ensayo muy sensible. Típicamente, el nivel se determina midiendo la proteína reactiva C en un fluido orgánico, por ejemplo sangre, linfa, saliva, orina, y similar. El nivel se puede determinar mediante ELISA, o inmunoensayos u otras técnicas convencionales para determinar la presencia de  
10 proteína reactiva C. Los métodos convencionales incluyen el envío de muestras de un fluido corporal de un paciente a un laboratorio comercial para su medida.

La invención también implica comparar el nivel de proteína reactiva C con un valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas. El valor predeterminado es 0,30 mg/dl de sangre. Puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o una media. Se puede establecer basándose en grupos comparativos, tal como cuando el riesgo en un grupo definido es el doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo en el que la población ensayada se divide por igual (o desigualmente) en grupos, tal como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio o un grupo de alto riesgo, o en cuadrantes, siendo el cuadrante más bajo los individuos con el riesgo más bajo, y siendo el cuadrante más alto los individuos con el riesgo más alto.

20 El valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas puede depender de la población particular seleccionada. Por ejemplo, una población aparentemente sana no fumadora (sin enfermedad detectable y sin historia previa de diabetes) tendrá un intervalo "normal" diferente de, por ejemplo, proteína reactiva C, que el que tendrá una población fumadora o una población seleccionada en base a la obesidad. En consecuencia, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que se encuentra un individuo. Los intervalos y categorías apropiados se pueden seleccionar con una experimentación no  
25 más allá de la habitual por aquellos de pericia normal en la técnica.

Para proteína reactiva C, un corte importante para una población de individuos aparentemente sanos es 0,30 mg/dl (mediana). Otro corte importante para proteína reactiva C es 0,60 mg/dl (cuartil más alto de riesgo). En una realización preferida, los valores de corte descritos anteriormente son sorprendentemente menores que aquellos mostrados en la técnica anterior, en la que los niveles de proteína reactiva C se estudian en individuos que ya se sabe que tienen una diabetes grave o que ya sufren complicaciones sistémicas de la enfermedad. "Un valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas", como se usa aquí, se refiere a un valor que no se sabía previamente que estaba asociado con la diabetes o complicaciones diabéticas, y excluye expresamente, en el caso de proteína reactiva C como el marcador inflamatorio, valores menores que  
30 alrededor de 0,20 mg/dl, e incluso menores que alrededor de 0,25 mg/dl.

Actualmente hay fuentes comerciales que producen reactivos para los ensayos para la proteína reactiva C. Estas incluyen, pero no se limitan a, Dade-Behring (Newark, DE), Abbott Pharmaceuticals (Abbott Park, Illinois), CalBiochem (San Diego, CA), Kamiya Diagnostics (Japón), y Behringwerke (Marburg, Alemania).

35 En realizaciones preferidas, la invención proporciona nuevos ensayos que son específicos para, y tienen sensibilidad apropiada con respecto a, valores predeterminados seleccionados en base a la presente invención. Los kits útiles para estos ensayos diferirían de aquellos actualmente disponibles comercialmente al incluir, por ejemplo, diferentes cortes, diferentes sensibilidades a cortes particulares, así como instrucciones u otro material impreso para caracterizar el riesgo basándose en el resultado del ensayo.

40 Como se explica anteriormente, la invención proporciona métodos para evaluar la probabilidad de que un individuo se beneficiará de un tratamiento temprano con un agente para reducir el riesgo de una futura diabetes, o reducir el riesgo de complicaciones diabéticas. Este método tiene implicaciones importantes para el tratamiento de pacientes y también para el desarrollo clínico de nuevas sustancias terapéuticas. Los médicos seleccionan los regímenes terapéuticos para el tratamiento del paciente basándose en el beneficio neto esperado para el paciente. El beneficio neto deriva de la relación de riesgo a beneficio. La presente invención permite la selección de individuos que más probablemente se beneficiarán mediante intervención, ayudando de ese modo al médico a seleccionar un régimen terapéutico. Éste puede incluir usar fármacos con un mayor perfil de riesgo en el que ha aumentado la probabilidad del beneficio esperado. Igualmente, los investigadores clínicos desean seleccionar para ensayos clínicos una población con una probabilidad elevada de obtener un beneficio neto. La presente invención puede ayudar a los investigadores clínicos a seleccionar tales individuos. Se espera que los investigadores clínicos usarán ahora la  
45 presente invención para determinar los criterios de entrada para ensayos clínicos.

En otro aspecto sorprendente de la invención, se ha descubierto que la proteína reactiva C y/o IL-6 tienen valores predictivos independientes de otros predictores conocidos de futuro riesgo de diabetes. De este modo, la presente

invención no implica simplemente duplicar una medida que se podría haber hecho previamente usando otros predictores. En su lugar, el uso de proteína reactiva C y/o IL-6 para determinar el riesgo diabético es aditivo a los predictores de la técnica anterior, incluyendo hemoglobina glucosilada. Además, incluso entre individuos aparentemente sanos con niveles bajos de hemoglobina glucosilada (menos de 6,5 por ciento, o menos de 6,0 por ciento), se ha encontrado que los niveles elevados de proteína reactiva C y/o IL-6 predicen el comienzo de diabetes. De este modo, el uso del cribado mediante proteína reactiva C y/o IL-6, por ejemplo entre individuos con un antecedente de diabetes, se puede usar para incrementar la frecuencia de vigilancia de la diabetes, tal como hemoglobina glucosilada del ensayo de tolerancia a glucosa oral. Como también es abundantemente claro de los datos descubiertos en el estudio del Women's Health Study (véanse los Ejemplos), el riesgo de futura diabetes es al menos aditivo a aquel asociado con el riesgo de niveles elevados de hemoglobina glucosilada.

También se describe un método para tratar sujetos para reducir el riesgo de diabetes o una complicación diabética en los sujetos. El método implica seleccionar (según cualquiera de los métodos de la invención basándose en el nivel de un marcador inflamatorio) y administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento un agente para reducir el riesgo de diabetes en una cantidad efectiva para disminuir el riesgo del sujeto de desarrollar diabetes o una complicación diabética. En particular, la invención proporciona el uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en insulina, un agente hipoglucémico, un agente antiinflamatorio, un agente reductor de lípidos, un bloqueador de los canales de calcio, un bloqueador de receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, y un inhibidor del sistema de angiotensina, en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto de otro modo libre de síntomas que necesite tratamiento con dicho agente pero que tiene un nivel de proteína reactiva C de 0,30 mg/dl o mayor, para reducir el riesgo de diabetes o una complicación diabética. El agente se administra en una cantidad efectiva.

Una cantidad efectiva es una dosis del agente antiinflamatorio suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable. La cantidad efectiva variará con la afección particular que se trate, la edad y estado físico del sujeto tratado, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la ruta específica de administración y los factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico. Por ejemplo, una cantidad efectiva puede depender del grado en el que un individuo tiene niveles anormalmente elevados de proteína reactiva C. Se debería entender que los agentes de la invención se usan para prevenir diabetes o complicaciones diabéticas, esto es, se usan profilácticamente en sujetos con riesgo de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas. De este modo, una cantidad efectiva es aquella cantidad que puede reducir el riesgo de, ralentizar o quizás prevenir por completo el desarrollo de diabetes o complicaciones diabéticas. Se reconocerá que cuando el agente se usa en circunstancias agudas, se usa para prevenir uno o más resultados médicamente indeseables que manan típicamente de tales sucesos adversos. En el caso de diabetes, el agente (por ejemplo, agente hipoglucémico) se puede usar para limitar la cetoacidosis. Generalmente, las dosis de compuestos activos serían de alrededor de 0,01 mg/kg por día a 1000 mg/kg por día. Se espera que las dosis que oscilan de 50-500 mg/kg serán adecuadas, preferiblemente de forma oral y en una o varias administraciones por día. Dosis menores resultarán de otras formas de administración, tales como la administración intravenosa. En el caso en el que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear mayores dosis (o dosis efectivamente más elevadas mediante una ruta de suministro diferente, más localizada) hasta el grado en que lo permita la tolerancia del paciente. Se contemplan múltiples dosis por día para lograr niveles sistémicos apropiados de los compuestos.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener de forma habitual sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales farmacéuticamente no aceptables se pueden usar convenientemente para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables, y no se excluyen del alcance de la invención. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similar. También, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos o metales alcalino-térreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Los agentes de la invención se pueden combinar, opcionalmente, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuados para la administración en un ser humano. El término "vehículo" representa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser coentremezclados con las moléculas de la presente invención, y entre sí, de una forma tal que no hay ninguna interacción que pudiese alterar sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponantes adecuados, incluyendo ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

5 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del agente de elección, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación  
 10 se puede formular según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación detectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear está el agua, disolución de Ringer, y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean como disolvente o medio de  
 15 suspensión aceites fijos estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico. La formulación del vehículo adecuada para las administraciones oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc., se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

15 Existe una variedad de rutas de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del fármaco particular seleccionado, de la gravedad de la afección que se esté tratando, y de la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, hablando de forma general, se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, queriendo decir cualquier modo que produzca niveles efectivos de los compuestos activos sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Tales modos  
 20 de administración incluyen las rutas oral, rectal, tópica, nasal, intradérmica, o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutánea, intravenosa, intramuscular, o por infusión. Las rutas intravenosa o intramuscular no son particularmente adecuadas para una terapia a largo plazo y para la profilaxis. Sin embargo, se podrían preferir en situaciones de emergencia. La administración oral se preferirá para el tratamiento profiláctico, debido a la conveniencia para el paciente así como el calendario de dosificación.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria, y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar al agente con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el agente antiinflamatorio con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

30 Las composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, tabletas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del agente antiinflamatorio. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos, tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

35 Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación en el tiempo, de liberación retrasada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de un agente de la presente invención, incrementando la conveniencia del sujeto y del médico. Existen muchos tipos de sistemas de suministro de liberación, y son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Incluyen sistemas a base de polímeros, tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, poliácido hidroxibutírico, y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente U.S. 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no  
 40 poliméricos, que son: lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas a base de péptidos; revestimientos de cera; comprimidos prensados que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosionales en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz, tales como los descritos en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152, y (b) sistemas difusionales, en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero, tales como se describen en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden usar sistemas de suministro de hardware a base de bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

50 Puede ser deseable el uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo. Liberación a largo plazo, como se usa aquí, significa que el implante se construye y se monta para suministrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, implantes de liberación sostenida a largo plazo descritos en la patente U.S. n<sup>o</sup> 4.748.024, y en la patente canadiense n<sup>o</sup> 1330939.

55 Un agente de la invención se puede administrar solo, o se puede coadministrar en combinación con otros agentes de la invención. "Coadministrar", como se usa aquí, se refiere a administrar simultáneamente dos o más compuestos de la invención (por ejemplo, insulina y un agente hipoglucémico), como una mezcla en una única composición, o secuencialmente, suficientemente próximos en el tiempo de manera que los compuestos puedan ejercer un efecto

aditivo o incluso sinérgico, es decir, reduciendo el riesgo de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas.

La invención se entenderá de forma más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos están destinados simplemente a ilustrar las realizaciones de la invención, y no se deben de interpretar como limitantes del alcance de la invención.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### MÉTODOS

##### Participantes en el estudio

10 Se diseñó un estudio de casos y controles anidados, prospectivo, que implica participantes en el estudio del Women's Health Study (WHS), un ensayo en curso que evalúa el balance de beneficios y riesgos de una dosis baja de aspirina y vitamina E en la prevención primaria de cardiovascular patía y cáncer entre profesionales femeninas de la salud con edades de 45 años y más<sup>16</sup>. Setenta y un por ciento de las participantes del WHS proporcionaron muestras de sangre completa en el alistamiento. Estas muestras se centrifugaron y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el análisis de laboratorio. Para la determinación de IL-6, CRP e insulina se usaron muestras de plasma con EDTA. Para la medida de hemoglobina A1c, se usaron muestras de glóbulos rojos empaquetadas.

15 Las sujetos del caso fueron participantes del WHS que proporcionan muestras de sangre, que estaban libres de diabetes conocida en el momento del alistamiento y subsiguientemente desarrollaron diabetes recientemente diagnosticada durante un periodo de observación de cuatro años. Los casos candidatos se identificaron inicialmente mediante un autoinforme sobre cuestionarios de seguimiento anuales, y se verificaron subsiguientemente a través de una entrevista telefónica realizada por un médico (ADP). Basándose en los criterios de diagnóstico de ADA revisados<sup>17</sup>, los casos se confirmaron si se cumplía una o más de las siguientes condiciones: (1) presencia de > 1 síntoma clásico de hiperglucemia (poliuria, polidipsia, pérdida de peso con o sin polifagia, y visión borrosa) más una glucosa en ayunas > 126 mg/dl ([7,0 mmoles/l]) o una glucosa en plasma aleatoria > 200 mg/dl ([11,1 mmoles/l]), o (2) en ausencia de síntomas, > 2 concentraciones elevadas de plasma en glucosa (en ayunas > 126 mg/dl ([7,0 mmoles/l]), aleatoria > 200 mg/dl ([11,1 mmoles/l]), o glucosa en plasma a las 2 horas > 200 mg/dl ([11,1 mmoles/l]) durante el ensayo de tolerancia a glucosa oral), o (3) uso de insulina o agente hipoglucémico oral. Se llamó a la oficina del médico de atención primaria para la documentación de apoyo, según sea necesario. Los casos que no cumplieron los criterios de diagnóstico, o que se encontró que tenían diabetes prevalente en el momento del alistamiento, o que murieron o de otro modo no pudieron ser seguidos, se eliminaron del estudio. Además, para reducir la influencia de la clasificación errónea debido a diabetes sin diagnosticar en el momento de la entrada en el estudio, se excluyeron los individuos diagnosticados en el primer año de seguimiento (n = 69).

20 Para cada mujer que desarrolló diabetes incidente confirmada, se eligieron dos sujetos de control al azar entre individuos libres de diabetes mellitus declarada por ellos mismos en el momento en el que el caso dio a conocer su suceso. Los controles se emparejaron por edad (dentro de un año) y estado de ayuno de la muestra de sangre enviada. El ayuno se definió como > 10 horas desde la última comida antes de la recogida de muestras. El grupo de estudio bajo investigación de laboratorio comprendió 288 casos confirmados y 576 controles equivalentes.

25 Debido a la elevada prevalencia de diabetes sin diagnosticar entre americanos de edad media, y debido a que este estudio se diseñó para evaluar el papel de la inflamación como determinante de futura diabetes, la muestra se limitó adicionalmente a individuos con hemoglobina A1c inicial < 6,5%, un valor de referencia usado habitualmente en la práctica clínica. Los participantes con valores ausentes para covariables clínicas iniciales de interés también se eliminaron del análisis (índice de masa corporal, 3% de casos y 1,5% de los controles; antecedentes de hipertensión, 0,5% de casos y 0,7% de controles; antecedentes de hiperlipidemia, 0,5% de los controles; y uso de terapia de sustitución hormonal, 0,3% de los controles). La muestra principal comprendió así 188 casos y 362 controles de edad pareja, con HbA1c < 6,5% al entrar en la cohorte. Entre el subgrupo de mujeres que proporcionan muestras en ayunas, también se midió la insulina específica como un indicador de resistencia subyacente a insulina.

##### Procedimientos

30 Las muestras de plasma iniciales se descongelaron y ensayaron para determinar IL-6, CRP, e insulina específica (en lo sucesivo denominada aquí "insulina"). HbA1c se midió mediante inmunoensayo (analizador Hitachi 911). La interleucina-6 se midió mediante un ELISA comercialmente disponible (R & D Systems, Minneapolis, MN). La proteína reactiva C se midió vía un ensayo inmunonefelométrico potenciado por látex de alta sensibilidad en un analizador BN II (Dade Behring, Newark, DE)<sup>18</sup>. Se usaron sistemas de anticuerpos dobles (Linco Research, St. Louis, MO), con menos de 0,2% de reactividad cruzada entre insulina y sus precursores, para medir concentraciones específicas de insulina en plasma. Además, puesto que los niveles de insulina se pueden reducir falsamente en presencia de hemólisis<sup>19</sup>, las muestras con valores de hemoglobina libre > 50 mg/dl (método espectrofotométrico, analizador Hitachi 911) se excluyeron de las investigaciones del subgrupo de ayuno. Las muestras se analizaron en

tripletes de casos y controles ordenados al azar, para reducir el sesgo sistemático y la variación entre ensayos.

#### Análisis estadístico

Se usó la prueba de la t de Student para evaluar las diferencias en las medias y la  $\chi^2$  estadística para diferencias en proporciones entre sujetos de casos y de controles que comprenden la población de estudio primario. Debido a que las distribuciones de IL-6, CRP, e insulina están desviadas, las diferencias en las medianas se ensayaron con la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Se usó el análisis de tendencias lineales para evaluar las asociaciones entre el nivel creciente de cada biomarcador y el riesgo de futura diabetes después de que la muestra se dividió en cuartiles basándose en la distribución de los controles. Se obtuvieron estimados de riesgo específicos de cuartiles mediante la regresión logística condicional ajustando el índice de masa corporal (BMI, definido como  $\text{kg/m}^2$ ), antecedentes familiares de diabetes en un pariente de primer grado, tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, y uso de terapia de sustitución hormonal. Las variables continuas y categóricas se especificaron según el mejor ajuste mediante comparación de modelos de regresión logística condicional competitivos. En particular, el BMI se controló en una escala lineal continua, y la insulina se expresó en forma cuadrática.

A fin de comprobar la robustez de los modelos, se llevaron a cabo análisis de sensibilidad, usando un punto de corte para HbA1c de 6,0% para la exclusión de diabetes prevalente en el valor inicial. Además, aunque las anomalías de los valores iniciales en insulina en ayunas se pueden considerar un factor intermedio en rutas causales, se ajustó este parámetro metabólico en análisis secundarios a fin de evaluar el papel predictivo residual del marcador inflamatorio bajo estudio. Se calcularon los coeficientes de correlación parciales de Spearman para cada marcador inflamatorio frente al nivel de insulina y frente a otras variables metabólicas continuas mientras se controla la edad y el BMI.

Se usó regresión logística condicional para examinar el papel compartido de IL-6 y CRP a la hora de predecir diabetes tras dividir la muestra primaria en cuatro grupos basándose en los puntos de corte del 75° percentil para cada biomarcador. Finalmente, a fin de evaluar la consistencia de las relaciones de riesgo entre individuos obesos y no obesos, la muestra de estudio se dividió en seis grupos basándose en el valor de punto de corte del BMI de 29  $\text{kg/m}^2$  (el tercil superior de BMI para nuestra población de estudio) y los terciles bajo, medio y alto de los marcadores inflamatorios.

#### RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran las características iniciales de mujeres que fueron diagnosticadas subsiguientemente con diabetes (sujetos de los casos) y aquellas que permanecen libres de diabetes (sujetos de controles). Como se esperaba, las mujeres que desarrollaron subsiguientemente diabetes fueron más obesas, más propensas a tener antecedentes familiares de diabetes en un pariente de primer grado, más propensas a tener antecedentes de hipertensión o hiperlipidemia, hicieron ejercicio menos frecuentemente, y consumieron menos alcohol. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la etnia, tabaquismo, o uso de terapia de sustitución hormonal.

Los niveles iniciales de IL-6 y CRP fueron significativamente mayores entre los casos que entre los controles (Tabla 1). Además, los mayores niveles de ambos marcadores inflamatorios se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar futura diabetes; en los análisis de edad emparejada, los riesgos relativos de DM incidente para los cuartiles crecientes de IL-6 fueron 1,0, 2,5, 4,1 y 7,5 respectivamente (tendencia de  $P < 0,001$ ), mientras que los riesgos relativos para los cuartiles crecientes de CRP fueron 1,0, 2,2, 8,7 y 15,7 respectivamente (tendencia de  $P < 0,001$ ) (Tablas 2 y 3). El ajuste de BMI atenuó notablemente estas relaciones, aunque se observaron efectos positivos persistentes de IL-6 (tendencia de  $P = 0,008$ ) y CRP (tendencia de  $P < 0,001$ ). De hecho, CRP siguió siendo un predictor significativo en modelos completamente ajustados que incluyeron BMI, antecedentes familiares de diabetes, tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, y uso de terapia de sustitución hormonal. En conjunto, el riesgo relativo para futura diabetes incrementó 28% (95% de CI, -1 a 65 por ciento;  $P = 0,066$ ) por incremento de cuartil en IL-6 inicial, y 64% (95% de CI, 22 a 218 por ciento;  $P = 0,001$ ) por incremento de cuartil en CRP. Se obtuvieron resultados similares en análisis limitados a aquellos con una HbA1c  $\leq 6,0\%$  en el inicio. Por ejemplo, en este subconjunto, los riesgos relativos completamente ajustados de diabetes incidente a lo largo de los cuartiles de CRP fueron 1,0, 1,8, 3,8, y 4,9 respectivamente (tendencia de  $P = 0,015$ ).

En el subgrupo de participantes que proporcionan muestras en ayunas, el nivel insulínico mediano también se elevó significativamente en sujetos de los casos en comparación con los controles (77,5 frente a 39,3 pmoles/l,  $P < 0,001$ ). Por lo tanto, se buscó determinar si las relaciones entre IL-6, CRP, y el futuro riesgo de DM fueron independientes de la insulina en ayunas. Como se muestra en la Tabla 4, el ajuste de la insulina en ayunas inicial atenuó adicionalmente los efectos de IL-6. Sin embargo, la relación de riesgo para CRP no se alteró materialmente tras el ajuste de ese factor. Además, en este subgrupo, los coeficientes de correlación parcial de Spearman entre marcadores inflamatorios y tanto insulina en ayunas como BMI fueron estadísticamente significativos (Tabla 5). CRP se correlacionó más fuertemente que IL-6 con cada parámetro ensayado. La hemoglobina A1c no se asoció fuertemente con ningún biomarcador.

Para evaluar los efectos compartidos potenciales, se computó el riesgo relativo de diabetes mellitus tras dividir la

muestra original en cuatro grupos basado en el 75° percentil de distribuciones de controles para IL-6 y CRP (Figura 1). Como se muestra, el riesgo relativo de diabetes tipo 2 fue más elevado entre mujeres con niveles elevados tanto de IL-6 como CRP, sugiriendo un efecto multiplicativo por encima de lo observado para IL-6 elevada o CRP elevada solas.

- 5 Para investigar la modificación del efecto por el índice de masa corporal, se determinó el riesgo relativo de diabetes incidente entre mujeres con un BMI  $< 0 \geq 29 \text{ kg/m}^2$  (Figura 2). En ambos estratos, los mayores niveles plasmáticos iniciales de IL-6 y CRP se asociaron con un mayor riesgo de enfermedad incidente. Notablemente, incluso entre mujeres obesas, el incremento de los niveles de CRP confirió una elevación aumentada por etapas del riesgo.

## DISCUSIÓN

- 10 En este estudio prospectivo de mujeres de mediana edad aparentemente sanas, se encontró que dos marcadores de la inflamación sistémica, la proteína reactiva C y la interleucina-6, son predictores de riesgo de futura diabetes. En particular, CRP fue un predictor independiente poderoso tras el ajuste del índice de masa corporal, factores de riesgo clínico, y niveles de insulina en ayunas. Se encontraron asociaciones paralelas para IL-6, aunque menores en magnitud y de significancia estadística marginal tras los ajustes de multivariantes. Estos hallazgos fueron robustos  
15 en los análisis de sensibilidad limitados a aquellos con HbA1c  $\leq 6,0\%$ , y se observaron consistentemente tanto en individuos no obesos como obesos.

- Según nuestro conocimiento, no existen signos epidemiológicos previos que relacionen CRP e IL-6 iniciales con diabetes mellitus incidente. Los datos también extienden el trabajo previo en el que otros marcadores inflamatorios, tales como el recuento de glóbulos blancos, fibrinógeno, y seroalbúmina baja<sup>20</sup>, y las variables de homeostasia  
20 asociadas con la inflamación, tales como el Factor VIII y el factor de von Willebrand<sup>21</sup>, se asociaron con futuro riesgo de diabetes, aunque en estas últimas investigaciones las relaciones de riesgo desaparecieron en gran medida después del ajuste de la obesidad.

- Los datos prospectivos actuales apoyan un papel de la inflamación en la diabetogénesis, y están de acuerdo con hipótesis previas originadas por Pickup y Crook<sup>8</sup> de que la diabetes de tipo 2 puede ser una manifestación de una  
25 respuesta de fase aguda mediada por citocinas en curso iniciada por el sistema inmunitario innato del organismo. De relevancia particular para los hallazgos actuales, se piensa que la proteína reactiva C muestra varias características que implican un papel fundamental en la defensa natural del organismo. Específicamente, CRP es un miembro de la familia de pentraxina de proteínas oligoméricas implicadas en el reconocimiento de patrones en la inmunidad innata<sup>22-24</sup>. Las funciones inmunorreguladoras de CRP dadas a conocer incluyen la mejora de la reactividad leucocítica, fijación del complemento, modulación de la activación de plaquetas, y aclaramiento del desecho celular desde sitios de la inflamación activa<sup>22, 25, 26</sup>. En combinación, la magnitud y rapidez de la inducción de CRP durante estímulos de fase aguda y el papel cooperativo en la respuesta inmunitaria innata sugieren la implicación temprana de la proteína reactiva C en la defensa del hospedante<sup>25</sup>. Con respecto específicamente al desarrollo de diabetes de tipo 2, se teoriza que los estimulantes endógenos de la respuesta de fase aguda, tales como obesidad,  
30 programación genética, u otros factores constitucionales, promueven inflamación crónica, resistencia eventual a insulina y función alterada de las células beta pancreáticas<sup>8</sup>. Aunque los datos apoyan asociaciones etiológicas, en este momento los mecanismos explícitos siguen siendo especulativos y requieren un estudio adicional.

- Varias explicaciones alternativas, quizá coordinadas, para los resultados garantizan una discusión posterior. En primer lugar, es posible que las asociaciones observadas en este estudio de diabetes reflejen aterosclerosis o  
40 disfunción endotelial subyacente entre los sujetos de los casos<sup>13-15, 27-29</sup>. Sin embargo, a este respecto, merece la pena observar que la tasa de suceso cardiovascular de cuatro años entre la población del estudio fue baja (1 caso y 1 control con apoplejía incidente, infarto de miocardio, angioplastia coronaria y cirugía de derivación), incluso entre aquellos individuos con las mayores elevaciones iniciales de IL-6 o CRP.

- Otra explicación para la asociación entre marcadores inflamatorios elevados, resistencia a insulina y diabetes  
45 naciente está relacionada con los efectos de la insulina sobre la biosíntesis de proteínas de fase aguda hepáticas. Se ha demostrado que la insulina inhibe la inducción, dirigida por citocinas, de varias proteínas inflamatorias<sup>30, 31</sup>. Por lo tanto es plausible que la resistencia a insulina puede conducir a un aumento aguas abajo de la producción de CRP. De hecho, en el análisis presente, se encontró que CRP estaba significativamente correlacionada con insulina en ayunas, aunque la magnitud de esta correlación fue débil (coeficiente de correlación parcial de Spearman, 0,19; P < 0,001). Además, el hallazgo de que el control de la insulina en ayunas tuvo una influencia mínima sobre  
50 asociaciones primarias sugiere que, aunque existen relaciones univariantes, este marcador de resistencia a insulina subyacente no da cuenta del riesgo atribuible a CRP elevada.

- Otro mecanismo importante para la elevación de CRP endógena es la producción de citocinas mediada por la  
55 obesidad. La citocina primaria implicada en la síntesis de CRP hepática es interleucina-6, también una molécula de señalización de adipocitos importante, liberada tanto de los almacenes de grasa viscerales como subcutáneos. De hecho, aproximadamente el 25% de IL-6 sistémica *in vivo* se origina a partir de tejido adiposo subcutáneo<sup>32</sup>, y se piensa que modifica la glucosa en adipocitos y el metabolismo de lípidos y el peso corporal<sup>33-37</sup>. Además, se ha

demostrado que las células grasas epiploicas segregan tanto como 2-3 veces más IL-6 *in vitro* que las células derivadas de almacenes subcutáneos<sup>38</sup>. Un hallazgo intrigante puesto que el drenaje venoso desde la grasa epiploica proporciona un acceso directo al sistema de portal, y la adiposidad abdominal está fuertemente enlazada a la resistencia a insulina<sup>39-42</sup>. En el presente análisis, el índice de masa corporal se usó como una medida de la obesidad, y, como se esperaba, atenuó significativamente los estimados de riesgo relativo tanto para IL-6 como CRP. Sin embargo, se observaron no obstante efectos residuales muy significativos, atribuibles a CRP, en modelos de multivariados que ajustan este factor. Además, fue evidente un gradiente por etapas del riesgo relativo, incluso entre individuos obesos (Figura 2).

La cohorte comprendió mujeres de edad media principalmente sanas, y de este modo los resultados pueden no ser generalizables a otros grupos de edad o a hombres que pueden tener riesgo de diabetes de tipo 2. Además, se midieron biomarcadores inflamatorios a la entrada del estudio, y por lo tanto no se pudieron evaluar los efectos de los cambios en niveles plasmáticos de estos biomarcadores a lo largo del tiempo. Sin embargo, varios análisis longitudinales han encontrado que los niveles de CRP son estables durante el seguimiento a largo plazo, en tanto que las medidas no se realicen en dos semanas de una infección aguda<sup>43, 44</sup>.

En conclusión, en esta evaluación prospectiva de dos marcadores de inflamación en la predicción de diabetes incidente, se encontró que CRP es un determinante de riesgo poderoso. La interleucina-6 también se elevó entre individuos con riesgo, aunque estas asociaciones se atenuaron en los análisis de multivariados. Las observaciones epidemiológicas, acopladas con signos experimentales emergentes, apoyan un papel para la inflamación en la patogénesis de diabetes mellitus de tipo 2. Los datos también plantean la posibilidad de que los marcadores inflamatorios, como CRP, pueden proporcionar un método coadyuvante para la detección temprana de riesgo de esta enfermedad.

#### Referencias

1. Harris M. Diabetes in America: diabetes data compiled 1995. En: Group NDD, ed. U.S. Department of Health and Human Services publication (PHS) 95-1468. Vol. VI 1-31.32: National Institutes of Health, 1995:1-13.

2. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC. *et al.* Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994 [véanse comentarios]. *Diabetes Care* 1998; 21:518-24.

3. Manson J, A S. Risk modification in the diabetic patient. En: Manson J, Ridker P, Gaziano J, Hennekens C, eds. *Prevention of Myocardial Infarction*. New York: Oxford University Press, 1996:241-273.

4. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 1992; 15:815-9.

5. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-607.

6. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:667-87.

7. Bergman RN. Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* 1989; 38:1512-27.

8. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? [véanse comentarios]. *Diabetologia* 1998; 41:1241-8.

9. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997; 40:1286-92.

10. Hak AE, Stehouwer CD, Bots ML *et al.* Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1986-91.

11. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:972-8.

12. Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102:42-7.

13. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men [la errata publicada aparece en N Engl J Med 31 de jul de



- 1997;337(5):356] [véanse comentarios]. N Engl J Med 1997; 336:973-9.
14. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med 2000; 342:836-43.
- 5 15. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. Circulation 2000; 101:1767-72.
16. Buring J, Hennekens C. The Women's Health Study: summary of the study design. J Myocard Ischemia 1992; 4:27-29.
17. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus [véanse comentarios]. Diabetes Care 1997; 20:1183-97.
- 10 18. Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. Clin Chem 1999; 45:2136-41.
19. Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. Diabetes Metab 1999; 25:459-76.
20. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, *et al.* Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. Lancet 1999; 353:1649-52.
- 15 21. Duncan BB, Schmidt MI, Offenbacher S, Wu KK, Savage PJ, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Diabetes Care 1999; 22:767-72.
22. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. Curr Opin Immunol 1995; 7:54-64.
- 20 23. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996; 272:50-3.
24. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol 1997; 9:4-9.
25. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunol Today 1994; 15:81-8.
- 25 26. Mortensen R. Macrophages and Acute-Phase Proteins. En: Zwilling B, Eisenstein T, eds. Macrophage-Pathogen Interactions. New York: Marcel Dekker, 1994:143-158.
27. Danesh J, Whincup P, Walker M, *et al.* Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses [véanse comentarios]. BMJ 2000; 321:199-204.
- 30 28. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. Circulation 2000; 102:1000-6.
29. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, *et al.* Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. Circulation 2000; 102:994-9.
30. Thompson D, Harrison SP, Evans SW, Whicher JT. Insulin modulation of acute-phase protein production in a human hepatoma cell line. Cytokine 1991; 3:619-26.
- 35 31. Campos SP, Baumann H. Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. Mol Cell Biol 1992; 12:1789-97.
32. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, *et al.* Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, *in vivo*. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:4196-200.
- 40 33. Sandler S, K Kb, DL E, M W. Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets *in vitro*. Endocrinology 1990; 126:1288-1294.
34. Stith R, J L. Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 *in vivo*. Circulatory Shock 1994; 44:210-215.
35. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice *in vivo* and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. Cancer Res 1992; 52:4113-6.
- 45 36. Berg M, Fraker DL, Alexander HR. Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on

lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine* 1994; 6:425-32.

37. Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2126-33.
- 5 38. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:847-50.
39. Despres JP. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition* 1993; 9:452-9.
40. Carey DG, Jenkins AB, Campbell LV, Freund J, Chisholm DJ. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* 1996; 45:633-8.
- 10 41. Vanhala MJ, Pitkajarvi TK, Kumpusalo EA, Takala JK. Obesity type and clustering of insulin resistance-associated cardiovascular risk factors in middle-aged men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22:369-74.
42. Brochu M, Starling RD, Tchamof A, Matthews DE, Garcia-Rubi E, Poehlman ET. Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2378-84.
- 15 43. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999; 100:230-5.
- 20 44. Ockene I, Matthews C, Rifai N, Ridker P, Reed G, Stanek E. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. *Clin Chem*. 2001;47(3):444-50.

Tabla 1. Características iniciales de la población del estudio<sup>†</sup>

Característica	Casos (N=188)	Controles (N=362)	Valor de P
Edad media	54,7	54,7	
Índice medio de masa corporal <sup>‡</sup>	31,8	25,6	<0,001
Raza (%)			
Blanca	90,4	91,7	
No blanca/Desconocida	9,6	8,3	0,61
Antecedentes familiares de diabetes (%)	44,2	23,8	<0,001
Antecedentes de hipertensión (%)	58,5	24,6	<0,001
Antecedentes de hiperlipidemia (%)	43,6	27,9	<0,001
Estado de tabaquismo (%)			
No fumador	51,6	51,1	
Antiguo fumador	35,6	37,3	0,89
Actual fumador	12,8	11,6	
Frecuencia de ejercicio (%)			
Rara vez o nunca	43,6	33,4	
< 1 vez/semana	26,1	18,2	<0,001
1-3 veces/semana	25,0	34,8	

## ES 2 375 268 T3

≥ 4 veces/semana	5,3	13,5	
Frecuencia de consumo de alcohol (%)			
Rara vez o nunca	61,7	39,8	
Mensual	14,9	14,4	<0,001
Semanal	21,3	34,5	
Diaria	2,1	11,3	
Uso de terapia de sustitución hormonal (%)			
Nunca	43,1	45,0	
Sólo en el pasado	13,8	9,4	0,28
Actual	43,1	45,6	
Interleucina-6 (pg/ml)			
Mediana	2,00	1,38	
Intervalo intercuartil	1,43-2,78	0,91-2,05	<0,001
Proteína reactiva C (mg/dl)			
Mediana	0,69	0,26	<0,001
Intervalo intercuartil	0,42-1,00	0,10-0,61	

---

† Restringido a sujetos con HbA1c ≤ 6,5% en el inicio, N=550.

‡ El índice de masa corporal es el peso, en kilogramos, dividido entre el cuadrado de la altura, en metros.

---

Tabla 2. Riesgos relativos bruto y ajustado de diabetes según la concentración plasmática inicial de IL-6<sup>†</sup>

	Cuartil de IL-6				Tendencia de P
	1	2	3	4	
	Mediana (pg/ml) (Intervalo pg/ml)				
Análisis bruto					
Riesgo relativo	0,698	1,133	1,646	2,709	
95% de CI	(<0,909)	(0,91-1,382)	(1,383-2,050)	(>2,050)	
P	1,0	2,5 (1,1-5,6) 0,022	4,1 (2,0-8,4) <0,001	7,5 (3,7-15,4) <0,001	<0,001
Análisis ajustado para BMI <sup>‡</sup>					
Riesgo relativo	1,0	1,8	1,9	2,9	
95% de CI		(0,7-4,4) 0,19	(0,8-4,2) 0,12	(1,3-6,7) 0,010	0,008
Ajustado para todos los factores de riesgo <sup>‡</sup>					
Riesgo relativo	1,0	1,4	1,3	2,3	
95% de CI		(0,6-3,7) 0,47	(0,6-3,1) 0,51	(0,9-5,6) 0,08	0,066

<sup>†</sup> Restringido a sujetos con HbA1c ≤ 6,5% en el inicio.

<sup>‡</sup> BMI representa el índice de masa corporal.

<sup>‡</sup> Emparejado en edad y estado de ayuno, controlado para índice de masa corporal, antecedentes familiares de diabetes, tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, y terapia de sustitución hormonal.

Tabla 3. Riesgos relativos bruto y ajustado de diabetes según la concentración plasmática inicial de proteína reactiva C †

	Cuartil de proteína reactiva C				Tendencia de P
	1	2	3	4	
	Mediana (mg/dl) (Intervalo mg/dl)				
Análisis bruto					
Riesgo relativo	0,050	0,170	0,435	0,930	
95% de CI	(<0,10)	(0,10-0,26)	(0,27-0,61)	(>0,61)	
P	1,0	2,2 (0,8-6,0) 0,13	8,7 (3,6-21,0) <0,001	15,7 (6,5-37,9) <0,001	<0,001
Análisis ajustado para BMI ‡					
Riesgo relativo	1,0	1,2	4,1	4,4	
95% de CI		(0,4-3,5) 0,73	(1,6-10,6) 0,004	(1,7-11,5) 0,002	<0,001
Ajustado para todos los factores de riesgo *					
Riesgo relativo	1,0	1,3	4,1	4,2	
95% de CI		(0,4-4,1) 0,61	(1,5-11,5) 0,007	(1,5-12,0) 0,007	0,001

† Restringido a sujetos con HbA1c ≤ 6,5% en el inicio.

‡ BMI representa el índice de masa corporal.

§ Emparejado en edad y estado de ayuno, controlado para índice de masa corporal, antecedentes familiares de diabetes, tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, y terapia de sustitución hormonal.

Tabla 4. Riesgos relativos ajustados de diabetes según la concentración plasmática inicial de proteína reactiva C e interleucina-6, ajustados para insulina plasmática en ayunas además de parámetros clínicos †

	Cuartil de nivel de biomarcador plasmático				Tendencia de P
	1	2	3	4	
<b>Interleucina-6</b>					
Ajustada para insulina en ayunas más parámetros clínicos‡					
Riesgo relativo	1,0	0,7	0,9	1,5	0,23
95% deCI		(0,2-2,6)	(0,3-2,9)	(0,5-4,8)	
P		0,56	0,89	0,51	
<b>Proteína reactiva C</b>					
Ajustada para insulina en ayunas más parámetros clínicos‡					
Riesgo relativo	1,0	0,9	3,1	4,3	0,010
95% deCI		(0,2-4,3)	(0,8-12,2)	(1,1-17,1)	
P		0,91	0,10	0,040	

† Restringido a sujetos con HbA1c ≤ 6,5% en el inicio; 126 casos, 225 controles.

‡ Emparejado en edad y estado de ayuno, controlado para índice de masa corporal, antecedentes familiares de diabetes, tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, y terapia de sustitución hormonal.

Tabla 5. Coeficientes de correlación parcial de Spearman de marcadores inflamatorios con índice de masa corporal (BMI) y parámetros metabólicos †

	BMI*	HbA1c <sup>§</sup>	Insulina en ayunas <sup>§</sup>	IL-6 <sup>§</sup>	CRP <sup>§</sup>
Interleucina-6	0,45‡	0,07	0,18‡	-----	0,39‡
Proteína reactiva C	0,57‡	0,10	0,19‡	0,39‡	-----

† Limitado a sujetos con HbA1c ≤ 6,5% en el inicio y que proporcionan muestras de sangre en ayunas; 126 casos, 225 controles.

\* Ajustado para edad.

§ Ajustado para edad y BMI.

‡ valor de p < 0,001

Ejemplo 2

5 Para determinar si los niveles elevados de proteína reactiva C (CRP) e interleucina-6 (IL-6) están asociados independientemente con niveles de insulina en ayunas entre mujeres no diabéticas, se llevó a cabo un segundo estudio. En este estudio participaron 349 mujeres sanas no diabéticas, de 45 años de edad o más, quienes proporcionaron muestras de sangre en ayunas y estaban libres de diabetes mellitus de tipo 2 clínicamente diagnosticada durante un período de 4 años desde la evaluación inicial del biomarcador.

Resultados:

10 La insulina en ayunas estaba fuertemente asociada con el índice de masa corporal (BMI) ( $r = 0,53$ ,  $p < 0,001$ ), CRP ( $r = 0,38$ ,  $p < 0,001$ ), e IL-6 ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,001$ ). Otras correlaciones clínicas de insulina en ayunas incluyeron el nivel de actividad física, consumo de alcohol, y uso de terapia de sustitución hormonal. En los modelos de regresión lineal multivariable, BMI y CRP fueron los únicos predictores independientes significativos de insulina en ayunas normalizada logarímicamente. En conjunto, el modelo final explicó el 32% de la varianza en el logaritmo del nivel de insulina. En regresión logística multivariable, el cociente de posibilidades (OR) completamente ajustado para insulina en ayunas elevada ( $\geq 51,6$  pmoles/l) incrementó al incrementar el tercil de BMI, CRP e IL-6, de tal manera que las ORs en el tercil más alto frente al tercil más bajo de cada parámetro fueron 9,0 (95% de CI 4,4-18,7), 4,4 (95% de CI 1,9-10,1), y 2,0 (95% de CI 0,9-4,2), respectivamente. Además, los niveles crecientes de CRP se asociaron con un gradiente por etapas en las posibilidades para la insulina en ayunas elevada entre mujeres tanto magras como con sobrepeso. De este modo, la proteína reactiva C está asociada independientemente con hiperinsulinemia en ayunas en mujeres no diabéticas.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para caracterizar un perfil de riesgo de un individuo aparentemente sano de desarrollar futura diabetes o complicaciones diabéticas, que comprende:
  - 5 obtener un nivel de proteína reactiva C en el individuo, y, si dicho nivel de proteína reactiva C es alrededor de 0,30 mg/dl de sangre o superior, entonces dicho individuo tiene un mayor riesgo de desarrollar futura diabetes o complicaciones diabéticas.
  2. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de proteína reactiva C es alrededor de 0,60 mg/dl de sangre o mayor.
  3. El método de la reivindicación 1, en el que un nivel de proteína reactiva C de alrededor de 0,30 mg/dl de sangre o mayor establece un primer valor de riesgo, comprendiendo además dicho método
    - 10 obtener un nivel de una hemoglobina glucosilada en el individuo,
    - comparar el nivel de la hemoglobina glucosilada con un segundo valor predeterminado específico para el diagnóstico de diabetes o complicaciones diabéticas, para establecer un segundo valor de riesgo, y
    - 15 caracterizar el perfil de riesgo del individuo de desarrollar diabetes o complicaciones diabéticas basándose en la combinación del primer valor de riesgo y del segundo valor de riesgo, en el que la combinación del primer valor de riesgo y el segundo valor de riesgo establece un tercer valor de riesgo diferente de dichos valores de riesgo primero y segundo.
  4. El método de la reivindicación 3, en el que el nivel de proteína reactiva C es alrededor de 0,60 mg/dl de sangre o mayor.
  5. Un método para evaluar la probabilidad de que un individuo se beneficiará del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de diabetes o reducir el riesgo de complicaciones diabéticas, seleccionándose el agente del grupo que consiste en insulina, un agente hipoglucémico, un agente antiinflamatorio, un agente reductor de lípidos, un bloqueador de canales de calcio, un bloqueador de receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, y un inhibidor del sistema de angiotensina, que comprende:
    - 20 obtener un nivel de proteína reactiva C en el individuo, y
    - si dicho nivel de proteína reactiva C es alrededor de 0,30 mg/dl de sangre o mayor, entonces dicho individuo se beneficiará del tratamiento con dichos agentes.
    6. El método de la reivindicación 5, en el que el nivel de proteína reactiva C es alrededor de 0,60 mg/dl de sangre o mayor.
    7. El método de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que el agente es insulina o un agente antiinflamatorio.
    8. El método de la reivindicación 7, en el que el agente antiinflamatorio es un inhibidor de citocinas.
    9. El método de la reivindicación 7, en el que el agente antiinflamatorio es un inhibidor del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).
    10. El método de la reivindicación 9, en el que el inhibidor del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consiste en etanercept e infliximab.
    11. El método de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que el agente es un agente hipoglucémico o un agente reductor de lípidos.
    12. El uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en insulina, un agente hipoglucémico, un agente antiinflamatorio, un agente reductor de lípidos, un bloqueador de canales de calcio, un bloqueador de receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, y un inhibidor del sistema de angiotensina, en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto de otro modo libre de síntomas que necesite tratamiento con dicho agente pero que tiene un nivel de proteína reactiva C de 0,30 mg/dl o mayor, para reducir el riesgo de diabetes o una complicación diabética.
    13. El método de la reivindicación 12, en el que el sujeto está aparentemente sano.
    14. El método de la reivindicación 12, en el que el sujeto no es hiperlipidémico.
    15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el agente es cualquiera de insulina, un

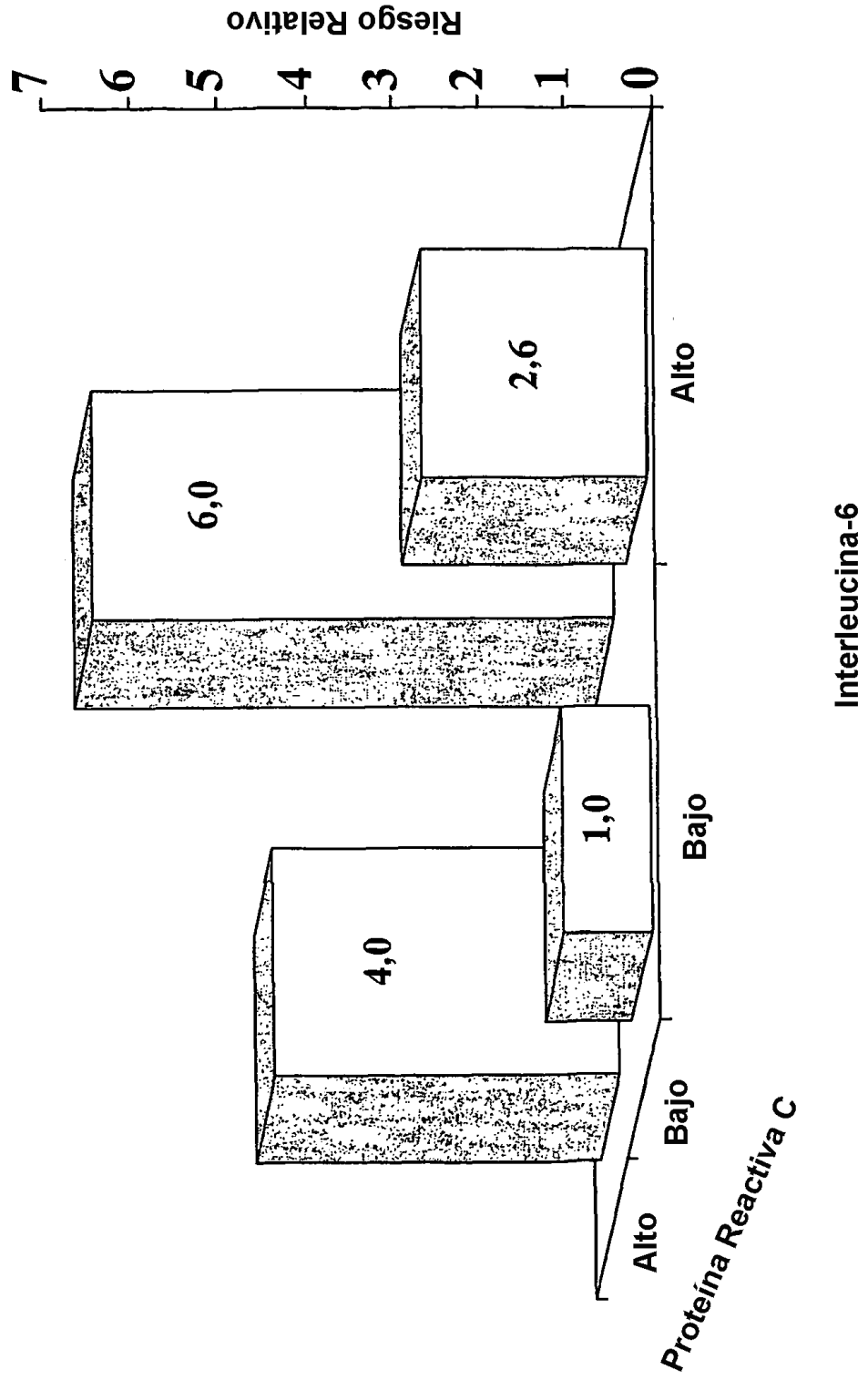
agente hipoglucémico o un agente antiinflamatorio.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el agente antiinflamatorio es un inhibidor de citocinas o un inhibidor del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).

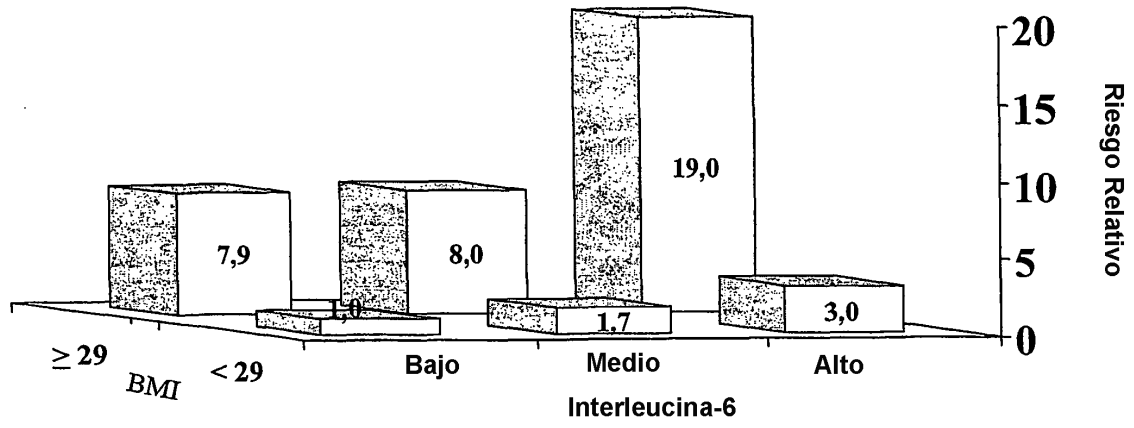
5 17. El método de la reivindicación 16, en el que el inhibidor del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consiste en etanercept e infliximab.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el agente es uno cualquiera de un agente reductor de lípidos, un bloqueador de canales de calcio, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, y un inhibidor del sistema de angiotensina.

**Fig. 1**



**Fig. 2A**



**Fig. 2B**

