

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 610**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09786141 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2338051**

54 Título: **Biomarcadores para cardiometabolismo**

30 Prioridad:

17.07.2008 US 81645 P
11.02.2009 US 151806 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.01.2014

73 Titular/es:

**IKFE INSTITUT FÜR KLINISCHE FORSCHUNG
UND ENTWICKLUNG GMBH (100.0%)**
Parcusstrasse 8
55116 Mainz, DE

72 Inventor/es:

PFUETZNER, ANDREAS y
FORST, THOMAS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 437 610 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores para cardiometabolismo

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona composiciones y métodos para determinar el estado de cardiometabolismo en un sujeto. La invención también proporciona composiciones y métodos para tratar a un sujeto que experimenta cardiometabolismo.

10 **Antecedentes de la invención**

El síndrome metabólico comprende varios componentes que se han asociado con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular. Un tipo de síndrome metabólico se denomina síndrome de resistencia a insulina o síndrome X y es un grupo de factores de riesgo que desempeñan un papel en la morbilidad de enfermedad cardiovascular entre pacientes con sobrepeso y obesos y las personas con diabetes mellitus de tipo 2 (Véase en general, Deen, American Family Physician, 2004, 69: 2875-2882). Un informe del Programa de Educación sobre Colesterol Nacional - Panel de Tratamiento de Adultos (NCEP-ATP III) identificó la cardiometabolismo como un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular.

20 La resistencia a insulina, obesidad abdominal, alta presión sanguínea y trastornos lipídicos (es decir, niveles elevados de triglicéridos y bajos niveles de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL)) son todos características indicativas de cardiometabolismo. De acuerdo con el NCEP-ATP III, se considera que un sujeto que tiene tres cualesquiera de las anomalías anteriores está aquejado de síndrome metabólico. La Tabla 1 proporciona un

25

TABLA 1

Componente	Criterios de diagnóstico de la OMS (resistencia a insulina más dos de los siguientes)	Criterios de diagnóstico del ATP III (tres de los siguientes)
Obesidad abdominal/central	Relación de cintura y cadera: > 0,90 (hombres), > 0,85 (mujeres) o BMI > 30 kg por m ²	Circunferencia de cintura: > 102 cm (40 pulgadas) en hombres, > 88 cm (35 pulgadas) en mujeres
Hipertrigliceridemia	150 mg por dl (\geq 1,7 mmol por l)	\geq 150 mg por dl
Colesterol HDL bajo	< 35 mg por dl (< 0,9 mmol por l) para hombres, < 39 mg por dl (< 1,0 mmol por l) para mujeres	< 40 mg por dl (< 1,036 mmol por l) para hombres, < 50 mg por dl (< 1,295 mmol por l) para mujeres
Alta presión sanguínea	\geq 18,62/11,97 kPa o uso documentado de terapia antihipertensiva	\geq 17,29/11,31 kPa o uso documentado de terapia antihipertensiva
Alta glucosa en ayunas	Tolerancia a la glucosa alterada, glucosa en ayunas alterada, resistencia a insulina o diabetes	\geq 110 mg por dl (\geq 6,1 mmol por l)
Microalbuminuria	Relación de albúmina urinaria y creatinina: 30 mg por g, o velocidad de excreción de albúmina: 20 μ g por minuto	

(Reproducido de *Deen*, mencionado anteriormente)

Sumario de la invención

30 No se identifica que los pacientes con resistencia a insulina y disfunción de células β sin elevación de glucosa en sangre padezcan diabetes mellitus. Estos pacientes normoglicémicos, sin embargo, experimentan el mismo riesgo cardiovascular elevado, que se liga predominantemente a la resistencia a insulina vascular. Esta afección se denomina en nueva instancia "cardiometabolismo" o "cardiocardiolipometabolismo". La expresión "síndrome metabólico" también puede usarse en el presente documento para referirse a esta afección. Un sujeto cardiometabólico podría no mostrar

35 uno o más de los síntomas normales de diabetes incluyendo, pero sin limitación, hiperglicemia, fatiga, pérdida de peso no explicada, sed excesiva, micción excesiva, alimentación excesiva, mala curación de heridas, infecciones, estado mental alterado y visión borrosa. Un sujeto cardiometabólico tiene alto riesgo para enfermedad cardiovascular y puede experimentar acontecimientos tales como infarto de miocardio e ictus. Es decir, la diabetes mellitus, la cardiometabolismo y el síndrome metabólico son fenotipos de una patofisiología subyacente común.

40 La población de pacientes cardiometabólicos ha experimentado un resultado peor en estudios epidemiológicos previos que los pacientes que se identifican y se tratan como diabéticos. Los biomarcadores de laboratorio clásicos para la diabetes no pueden identificar a estos pacientes cardiometabólicos. Debido a las consideraciones patofisiológicas, los marcadores sustitutos para el metabolismo de la glucosa pueden no ser suficientes para describir el riesgo

45 cardiovascular de pacientes con cardiometabolismo, y no son suficientes para describir este riesgo para pacientes cardiometabólicos.

La presente proporciona composiciones y métodos para detectar y tratar una enfermedad, particularmente cardiometabólica, en un sujeto. Se conoce un gran número de biomarcadores para una diversidad de afecciones metabólicas, diabéticas y cardiovasculares. Véase Publicación US/2008/0057590. Sin embargo, se ha descubierto que adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta (y opcionalmente leptina u otros biomarcadores, como se perfila posteriormente) en combinación son útiles como biomarcadores para cardiometabólica, parcialmente porque, como se analiza posteriormente, cada uno permite la evaluación de un aspecto diferente de la enfermedad. Cada uno de estos biomarcadores por sí solo no conduce a un entendimiento completo del riesgo de un sujeto para experimentar cardiometabólica. Por ejemplo, los niveles de adiponectina suprimidos por sí solos podrían indicar una patología, pero no necesariamente. La determinación de que el nivel de adiponectina de un sujeto se suprime y el nivel de hsCRP está elevado puede en cierto grado sugerir cardiometabólica, pero no con la mayor certeza. Determinar además que el nivel de proinsulina intacta de un sujeto es elevado permite al practicante concluir que el sujeto tiene un riesgo elevado al 200% de enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, medir la adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta proporciona la máxima cantidad de información con respecto a la patología de un sujeto mediante un número mínimo de biomarcadores. La adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta también tienen la ventaja práctica de ser marcadores físicamente estables. Esto permite que las muestras se recojan y midan posteriormente, por ejemplo, en lotes, o como alternativa que no sea necesario usar manipulación especial de las muestras (tal como congelación inmediata, por ejemplo).

En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la detección y/o cuantificación de un conjunto de biomarcadores particulares (incluyendo, pero sin limitación, cualquier combinación de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta, así como combinaciones que incluyen leptina y/u otros marcadores analizados posteriormente) que permiten la determinación de cardiometabólica en un sujeto. Sin dicha determinación, el tratamiento, y por lo tanto la reducción de acontecimientos cardiovasculares graves, podrían no producirse de otro modo.

La invención también proporciona selección de tratamiento reductor de riesgo eficaz y terapias para evitar complicaciones cardiovasculares. La invención proporciona marcadores biológicos que en diversas combinaciones pueden usarse en métodos para controlar a sujetos que se someten a terapias que afectan a la cardiometabólica. Las indicaciones de cardiometabólica permiten a un cuidador seleccionar o modificar las terapias o intervenciones para tratar a sujetos. Se han desarrollado varios fármacos para tratamiento de diabetes y están disponibles en el mercado. Los biomarcadores desvelados en el presente documento permiten determinar el nivel de respuesta de un sujeto a fármacos tales como fármacos antidiabéticos u otros fármacos descritos en el presente documento, y controlar la eficacia del tratamiento farmacológico. La presente invención se dirige particularmente al uso de un número mínimo de biomarcadores para proporcionar una cantidad máxima de información con respecto al estado de enfermedad de un sujeto.

Puede combinarse opcionalmente un panel de biomarcadores que consiste en adiponectina, hsCRP, proinsulina intacta (y opcionalmente leptina u otros biomarcadores, como se perfila posteriormente) con mediciones de otros biomarcadores para evaluar la cardiometabólica.

En la práctica actual, la norma asistencial es administrar fármacos que reducen los síntomas de forma no específica. Como estas intervenciones fracasan en estadios posteriores, se persiguen enfoques más intensivos que conducen al uso de insulina y farmacoterapia múltiple; en ese momento, intentar tratar la patofisiología subyacente puede ser ineficaz. Por lo tanto, la invención también proporciona varios fármacos y combinaciones farmacológicas que pueden administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad. Mediante las composiciones y métodos de la presente invención, los sujetos pueden tratarse con fármacos o combinaciones de fármacos que no solamente proporcionan mejora de los síntomas diana, sino que también mejoran la patología global de un sujeto.

La invención proporciona además métodos para determinar la inadecuación de ciertas terapias farmacológicas. Es decir, dependiendo de las mediciones de un panel de biomarcadores, se determinan varios fármacos y combinaciones de fármacos que no se administran o no deberían administrarse a un sujeto para tratar cardiometabólica. La bibliografía en algunos casos desvela la administración de ciertos fármacos a un sujeto cuyos niveles de biomarcadores satisfacen ciertos criterios como se desvela en el presente documento, mientras que de acuerdo con la presente invención, no se administra o no se deberían administrar estos fármacos a estos sujetos.

Con frecuencia, los sujetos pueden mostrar niveles de glucosa normales pero experimentar no obstante disfunción de células β , resistencia a insulina, inflamación sistémica y lipostasis. La invención proporciona por lo tanto detección temprana de sujetos con resistencia a insulina vascular normoglicémica a alto riesgo para infarto de miocardio e ictus.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un soporte sólido que comprende ligandos de captura, en la que dichos ligandos de captura consisten en: (a) un ligando de unión de captura selectivo para adiponectina, (b) un ligando de unión de captura selectivo para hsCRP y (c) un ligando de unión de captura selectivo para proinsulina intacta.

En una realización, uno de los ligandos de unión de captura comprende un anticuerpo.

En una realización, la composición comprende además: (a) un ligando de captura soluble selectivo para adiponectina, (b) un ligando de captura soluble selectivo para hsCRP y (c) un ligando de captura soluble selectivo para proinsulina intacta.

5 En una realización, cada uno de los ligandos de captura solubles comprende un marcador detectable.

En una realización, un marcador detectable es un fluoróforo.

En una realización, un marcador detectable es una enzima conjugada.

10

En una realización, la enzima conjugada es peroxidasa de rábano rústicano.

En una realización, la composición comprende además un detector.

15 En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar cardiometabolismo en un sujeto normoglicémico o para determinar si el sujeto se beneficiaría de una terapia, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de un sujeto normoglicémico con una composición que comprende un soporte sólido que comprende: (i) un ligando de unión de captura selectivo para adiponectina, (ii) un ligando de unión de captura selectivo para hsCRP y (iii) un ligando de unión de captura selectivo para proinsulina intacta; y medir las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta en la muestra.

20

En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y alto; (b) alto, medio y alto; (c) medio, alto y alto; (d) bajo, alto y alto; (e) bajo, medio y alto; y (f) bajo, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1 y una insulina.

25

En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, bajo y alto; (b) medio, medio y alto; y (c) medio, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPPIV.

30

En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y bajo; (b) medio, alto y bajo; (c) bajo, alto y bajo; (d) bajo, medio y bajo; y (e) bajo, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPPIV y una insulina.

35

En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, medio y bajo; (b) alto, bajo y bajo; (c) medio, medio y bajo; y (d) medio, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un inhibidor de DPPIV y una insulina.

40

En una realización, la terapia no comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida.

45

En una realización, la terapia comprende administrar uno o más fármacos adicionales que comprenden uno o más fármacos reductores de glucosa.

En una realización, una muestra comprende sangre.

50

En una realización, el método comprende además tomar una medida de al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste en leptina, mRNA_x, NFκB, IL-6, MMP-9, TNFα, NFκB, eNOS, PPARγ, MCP-1, PAI-1, ICAM/VCAM, E-selectina, P-selectina, factor de von Willebrand, sCD40L, insulina, glucosa, HbA1c, ácidos grasos libres, triglicéridos, VLDL, LDL denso pequeño, LDL oxidado, resistina, HDL, NO, IκB-α, IκB-β, p105, RelA, TNFα, MIF, citocinas inflamatorias y moléculas implicadas en rutas de señalización.

55

En una realización, el biomarcador adicional es MMP-9.

60

En una realización, se mide la concentración de proinsulina intacta, hsCRP y adiponectina en la muestra y cada una es una concentración de alto riesgo.

En una realización, el biomarcador adicional es leptina.

65

En una realización, el método comprende poner en contacto la muestra con una composición de la invención.

5 En un aspecto, la invención proporciona uso de una composición para determinar la cardiometabolismo en un sujeto normoglicémico, comprendiendo la composición un soporte sólido que comprende: (a) un ligando de unión de captura selectivo para adiponectina, (b) un ligando de unión de captura selectivo para hsCRP y (c) un ligando de unión de captura selectivo para proinsulina intacta, siempre que el uso no sea un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.

En una realización, el uso comprende poner en contacto la composición con una muestra del sujeto y medir las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta.

10 En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y alto; (b) alto, medio y alto; (c) medio, alto y alto; (d) bajo, alto y alto; (e) bajo, medio y alto; y (f) bajo, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1 y una insulina.

15 En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, bajo y alto; (b) medio, medio y alto; y (c) medio, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPP-IV.

20 En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y bajo; (b) medio, alto y bajo; (c) bajo, alto y bajo; (d) bajo, medio y bajo; y (e) bajo, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPP-IV y una insulina.

25 En una realización, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, medio y bajo; (b) alto, bajo y bajo; (c) medio, medio y bajo; y (d) medio, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionado de una glitazona, un inhibidor de DPP-IV y una insulina.

30 En una realización, la terapia comprende no administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida.

35 En una realización, la terapia comprende además administrar uno o más fármacos reductores de glucosa adicionales.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura muestra una matriz de decisión de terapia para un panel de biomarcadores que incluye adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta. El símbolo "&" significa "y" y "/" significa "o". Se proporcionan fármacos específicos como ejemplos no limitantes.

Descripción de realizaciones

45 Biomarcadores

50 Los biomarcadores se pueden originar de estudios epidemiológicos, estudios animales, consideraciones patofisiológicas y experimentos de órganos finales. Idealmente, un biomarcador tendrá un alto valor predictivo para una medida de resultado significativa, puede validarse o se valida en ensayos prospectivos diseñados apropiadamente, refleja el éxito terapéutico por cambios correspondientes en los resultados de marcador sustituto y debería ser fácil de evaluar en la práctica clínica.

55 La expresión "marcador sustituto", "marcador biomolecular", biomarcador" o "marcador" (también denominado en ocasiones en el presente documento "analito diana", "especie diana" o "secuencia diana") se refiere a una molécula cuya medición proporciona información acerca del estado de un sujeto. En diversas realizaciones ejemplares, el biomarcador se usa para evaluar un estado patológico. Las mediciones del biomarcador pueden usarse solas o en combinación con otros datos obtenidos con respecto a un sujeto para determinar el estado del sujeto. En una realización, el biomarcador está "diferencialmente presente" en una muestra tomada de un sujeto de un estado fenotípico (por ejemplo, que tenga una enfermedad) en comparación con otro estado fenotípico (por ejemplo, que no tenga la enfermedad). En una realización, el biomarcador está "diferencialmente presente" en una muestra tomada de un sujeto que no se somete a terapia o un tipo de terapia en comparación con otro tipo de terapia. Como alternativa, el biomarcador puede estar "diferencialmente presente" incluso si no hay diferencias fenotípicas, por ejemplo, los biomarcadores pueden permitir la detección de riesgos asintomáticos. Puede determinarse que un biomarcador está "diferencialmente presente" de una diversidad de maneras, por ejemplo, entre diferentes estados fenotípicos si se calcula que la media o la mediana del nivel (particularmente el nivel de expresión de los ARNm asociados como se describe posteriormente) de biomarcador en los diferentes grupos es estadísticamente

significativa. Los ensayos habituales para significación estadística incluyen, entre otros, ensayo de t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney y relación de probabilidades.

5 Como se describe en el presente documento, un biomarcador puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un analito o analito diana, un lípido (incluyendo glicolípidos), un carbohidrato, un ácido nucleico, una proteína, cualquier derivado de los mismos o todas y cada una de las combinaciones de estas moléculas, con proteínas y ácidos nucleicos que encuentran uso particular en la invención. Como se apreciará por los expertos en la materia, puede detectarse un gran número de analitos usando los presentes métodos; básicamente, cualquier biomarcador para el que pueda realizarse un ligando de unión, descrito posteriormente, puede detectarse usando los métodos de la invención.

10 En diversas realizaciones, los biomarcadores usados en los paneles de la invención pueden detectarse como proteínas o como ácidos nucleicos (por ejemplo, transcritos de ARNm o ADNc) en cualquier combinación. En diversas realizaciones, se mide la forma de proteína de un biomarcador. Como se apreciará por los expertos en la materia, pueden realizarse ensayos proteicos usando técnicas convencionales tales como ensayos de ELISA. En diversas realizaciones, se mide la forma de ácido nucleico de un biomarcador (por ejemplo, el ARNm correspondiente). En diversas realizaciones ejemplares, se miden uno o más biomarcadores de un panel particular usando un ensayo proteico y se miden uno o más biomarcadores del mismo panel usando un ensayo de ácidos nucleicos.

15 Como se apreciará por los expertos en la materia, hay un gran número de posibles analitos diana proteicos y especies diana que pueden detectarse usando la presente invención. El término "proteína", "polipéptido" y "oligopéptido" se refiere a al menos dos o más péptidos o aminoácidos unidos por uno o más enlaces peptídicos. El término "proteína" incluye "péptido". Una proteína o un aminoácido puede ser de origen natural o no natural y también puede ser un análogo, un derivado o una estructura peptidomimética. El término "proteína" se refiere a secuencias naturales, variantes de secuencias naturales y una de estas que contienen análogos o aminoácidos derivados. Los ejemplos de aminoácidos derivados incluyen, sin limitación, los que se han modificado por la unión de marcadores (descritos posteriormente); acetilación; acilación; ribosilación de ADP; amidación; unión covalente de flavina; un resto de hemo, un nucleótido, un lípido o fosfatidilinositol; reticulación; ciclación; formación de enlaces disulfuro; desmetilación; esterificación; formación de enlaces covalentes, cistina o piroglutamato; formilación; carboxilación gamma; glicosilación; formación de anclajes de GPI; hidroxilación; yodación; metilación; miristoilación; oxidación; procesamiento proteolítico; fosforilación; prenilación; racemización; selenoilación; sulfatación; y ubiquitinación. Dichas modificaciones se conocen bien por los expertos en la materia y se han descrito en gran detalle en la bibliografía científica. Se describen varias modificaciones particularmente habituales tales como glicosilación, unión de lípidos, sulfación, carboxilación gamma, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, en textos básicos, tales como Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2ª ed. (Nueva York: W. H. Freeman and Company, 1993). Están disponibles muchas revisiones detalladas sobre este tema, tal como en Johnson, ed., *Posttranslational Covalent Modification of Proteins* (Nueva York: Academic Press, 1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 1990, 182: 626-646; y Rattan *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 663: 48-62. Una variante puede contener una o más adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más péptidos en comparación con la secuencia natural o una variante diferente. Las cadenas laterales de una proteína pueden estar en la configuración (R) o la (S). En una realización preferida, los aminoácidos están en la configuración (S) o (L). Como se analiza posteriormente, cuando la proteína se usa como un ligando de unión, puede ser deseable utilizar análogos proteicos para retardar la degradación por contaminantes de muestra.

20 En diversas realizaciones, pueden usarse variantes de las secuencias descritas en el presente documento, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos basados en, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes que comprenden una deleción, adición, sustitución, fragmentos, preproteína, preproteína procesada (por ejemplo sin un péptido de señalización), proproteína procesada (por ejemplo, que da como resultado una forma activa), secuencias no humanas y secuencias no humanas variantes como biomarcadores.

25 En diversas realizaciones ejemplares, el biomarcador es un ácido nucleico. La expresión "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en el presente documento significa al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se perfila posteriormente, por ejemplo en el uso de sondas de ligando de unión, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage *et al.*, *Tetrahedron*, 49(10): 1925 (1993) y referencias en la misma; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35: 3800 (1970); Sprinzl *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 81: 579 (1977); Letsinger *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14: 3487 (1986); Sawai *et al.*, *Chem. Lett.* 13(5): 805 (1984); Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470 (1988); y Pauwels *et al.*, *Chemica Scripta* 26: 141 (1986)), fosforotioato (Mag *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19: 1437 (1991); y Patente de Estados Unidos 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321 (1989)), enlaces de O-metilfosforamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, (Oxford University Press, 1991)), y cadenas principales de ácidos nucleicos y enlaces (véase Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895 (1992); Meier *et al.*, *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365: 566 (1993); Carlsson *et al.*, *Nature*, 380: 207 (1996)), todas las cuales se incorporan por referencia). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los de cadenas principales positivas (Denpcy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097 (1995)), cadenas principales no

iónicas (Patentes de Estados Unidos 5.386.023; 5.637.684; 5.602.240; 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowshi *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30: 423 (1991); Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470 (1988); Letsinger *et al.*, *Nucleoside & Nucleotide* 13: 1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395 (1994); Jeffs *et al.*, *J. Biomolecular NMR* 34: 17 (1994); y Horn *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 37: 743 (1996)) y cadenas principales no de ribosa, incluyendo las descritas en las Patentes de Estados Unidos 5.235.033 and 5.034.506 y Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. También se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (véase Jenkins *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 24: 169-176 (1995)). Se describen varios análogos de ácido nucleico en Rawls, C & E News, 35 (2 de junio de 1997). Estas modificaciones de la cadena principal de fosfato-ribosa pueden realizarse para aumentar la estabilidad y semivida de dichas moléculas en ambientes fisiológicos. Como se apreciará por los expertos en la materia, todos estos análogos de ácido nucleico pueden encontrar uso en la presente invención. Además, pueden realizarse mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural.

Se ha descubierto que los ensayos para cardiometabolismo que implican las mediciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina tienen mayor valor en la determinación de cardiometabolismo que cualquiera de estos biomarcadores por sí solo. Esta combinación particular de biomarcadores permite la obtención de sensibilidad y especificidad clínicamente útiles, y la detección y establecimiento de estadios de casos menos graves de una enfermedad que modula la cardiometabolismo. En consecuencia, pueden usarse mediciones de un panel de biomarcadores que comprenda o consista en adiponectina, hsCRP y proinsulina para mejorar la sensibilidad y/o especificidad de un ensayo de diagnóstico en comparación con un ensayo que implique uno cualquiera de estos biomarcadores por sí solo.

Adiponectina

En diversas realizaciones, se usa adiponectina como un biomarcador. Los valores de adiponectina son útiles como un biomarcador predictivo para resistencia a insulina y como una herramienta de control en el tratamiento de trastornos relacionados con resistencia a insulina. La adiponectina de longitud completa (fAd) es una proteína del suero de 30 kDa secretada específicamente por adipocitos (véase por ejemplo, N° de Referencia de GenBank BAA08227). La adiponectina típicamente circula en sangre humana a concentraciones que varían entre 5 y 12 mg/l, representando de este modo aproximadamente el 0,01% de la proteína en plasma total. Schondorf *et al.*, *Clin. Lab.*, 2005, 51: 489-494. Los niveles de adiponectina tienen medianas de los valores mayores en mujeres (aproximadamente 8,7 mg/l) que en hombres (aproximadamente 5,5 mg/l), y pueden verse afectados también por la edad. Los niveles de adiponectina se correlacionan negativamente con el IMC, la masa de grasa visceral y los niveles de insulina. En consecuencia, la adiponectina se reduce en sujetos obesos y en pacientes que padecen diabetes de tipo 2, microangiopatía u otros trastornos metabólicos. Los valores de adiponectina más bajos se han encontrado en pacientes obesos tanto con diabetes de tipo 2 como con enfermedad cardíaca coronaria. Las Tablas 2A y 2B muestran dos categorizaciones diferentes de diversas concentraciones de adiponectina en relación con el riesgo de arteriosclerosis y resistencia a insulina.

TABLA 2A

Concentración de Adiponectina (mg/l)	Nivel de Riesgo para Arteriosclerosis y Resistencia a Insulina
>10	bajo
7 - 10	medio
< 7	alto

TABLA 2B

Concentración de Adiponectina (mg/l)	Nivel de Riesgo para Arteriosclerosis y Resistencia a Insulina
>10	bajo
7 - 10	medio
4 - 7	alto
< 4	muy alto

Se ha mostrado que varios compuestos afectan a los niveles de adiponectina en un sujeto. Pfützner *et al.*, *Diabetes, Stoffwechsel und Herz*, 2007, 16: 91-97 han mostrado que la sulfonilurea, metformina, tiazolidinediona, metformina + sulfonilurea, metformina + tiazolidinediona, sulfonilurea + glitazona y metformina + sulfonilurea + tiazolidinediona pueden tener un efecto en los niveles de adiponectina. Por lo tanto, en una realización, puede administrarse cualquiera de estos compuestos o combinaciones a un sujeto.

En consecuencia, los ligandos de unión de captura adecuados, como se analiza adicionalmente en el presente documento, para detección y/o cuantificación de adiponectina incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que son selectivos para adiponectina. Se conocen y están disponibles en el mercado anticuerpos de adiponectina. En una realización ejemplar, la adiponectina tiene una secuencia peptídica de acuerdo con el N° de Referencia de GenBank

BAA08227 o deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el N° de Referencia de GenBank D45371.

Proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP)

5 En diversas realizaciones, se usa CRP (proteína C reactiva) o hsCRP (proteína C reactiva de alta sensibilidad) como un biomarcador. CRP es un miembro de la familia de pentraxina, que comprende cinco promotores asociados de forma no covalente dispuestos simétricamente alrededor de un poro central y tiene un peso molecular de 118.000 Da. (Véase en general, Jialal *et al.*, Hypertension, 2004, 44: 6-11). CRP es un marcador de inflamación que se ha
10 mostrado que predice infarto de miocardio incidente, ictus, enfermedad arterial periférica y proceso de muerte cardiaca repentina. Ridker, Circulation, 2003, 107: 363-369. Diversos estudios epidemiológicos que implican a individuos sin historial previo de enfermedad cardiovascular han mostrado que una medida única, sin ayunas, de CRP es un fuerte predictor de acontecimientos vasculares futuros. Se ha probado que el valor predictivo de CRP es independiente de factores de riesgo tradicionales importantes, tales como edad, tabaquismo, niveles de colesterol, presión sanguínea y diabetes.

15

La Tabla 3 muestra intervalos de hsCRP que se correlacionan con diversos niveles de riesgo cardiovascular.

TABLA 3

Concentración de hsCRP (mg/l)	Nivel de Riesgo Cardiovascular
0 - 1	Bajo
> 1 - 3	moderado
> 3 - 10	alto
> 10	elevación no específica; no interpretable

20 Se han desarrollado ensayos de CRP de alta sensibilidad y están ahora ampliamente disponibles (Roberts *et al.*, Clinical Chemistry 2001, 47: 444-450). En una realización, se mide un biomarcador, tal como hsCRP, mediante turbidimetría inmunitaria.

25 En consecuencia, los ligandos de unión de captura adecuados, como se analiza adicionalmente en el presente documento, para detección y/o cuantificación de hsCRP incluyen pero sin limitación, anticuerpos que son selectivos para hsCRP. Se conocen y están disponibles en el mercado anticuerpos de hsCRP. En una realización ejemplar, hsCRP tiene una secuencia peptídica de acuerdo con el N° de Referencia de GenBank AAA52075 o deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el N° de Referencia de GenBank M11725.

30 *Proinsulina intacta*

En diversas realizaciones, se usa proinsulina intacta como un biomarcador. Como se usa en el presente documento, "proinsulina" se refiere a un precursor prohormona para insulina realizado en las células β de los islotes de Langerhans. La proinsulina puede escindirse dentro de los gránulos de células β para dar como resultado dos
35 moléculas separadas: péptido C e insulina. El procesamiento parcial de la proinsulina puede dar como resultado formas divididas o "des" de proinsulina (Clark, Ann Clin Biochem, 1999, 36: 541-564). El término "proinsulina" como se usa en el presente documento se refiere preferentemente a la forma no procesada de proinsulina, es decir, "proinsulina intacta".

40 Las concentraciones de proinsulina intacta se relacionan con aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Si la demanda de insulina desencadenada por resistencia a insulina alcanza un cierto umbral, la capacidad de escisión insuficiente de carboxipeptidasa H de células β conduce a una secreción aumentada de proinsulina intacta además de la molécula de insulina deseada. Se ha demostrado, sin embargo, que la proinsulina intacta es un factor de riesgo cardiovascular independiente. La evaluación de la función de las células β mediante determinación de proinsulina
45 intacta facilita la selección de la terapia más prometedora y también actúa para controlar el éxito del tratamiento en el curso adicional de la enfermedad. La proinsulina intacta puede actuar como un marcador para investigar la función de las células β y permite un establecimiento de estadios orientados a secreción de la diabetes de tipo 2. La Tabla 4 muestra la correlación entre la concentración de proinsulina intacta y la función de las células β .

50

TABLA 4

Concentración de Proinsulina Intacta (pmol/l)	Nivel de Riesgo de Disfunción de células β
> 11	alto
\leq 11	bajo

La Tabla 4 muestra que para las concentraciones de proinsulina intacta de \leq 11 pmoles/l, la función de las células β puede caracterizarse como buena, mientras que para concentraciones de proinsulina intacta de > 11 pmoles/l, la función de las células β puede caracterizarse como mala.

La quimioluminiscencia es una técnica que puede usarse para medir la proinsulina intacta y otros biomarcadores. Dos tipos de ensayos de quimioluminiscencia son capaces de medir específicamente la proinsulina “intacta” no escindida y proinsulina “total” (proinsulina y sus productos de degradación específicos y no específicos) en plasma humano (Proinsulina Intacta MLT y Proinsulina Total MLT; Sciemia, Mainz, Alemania). Otros métodos adecuados para proinsulina incluyen sin limitación cromatografía, particularmente HPLC, ensayos de espectrometría de masas de dilución de isótopos estable y ELISA. Véase, en general, *Clark*.

En consecuencia, los ligandos de unión de captura adecuados, como se analiza adicionalmente en el presente documento, para detección y/o cuantificación de proinsulina incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que son selectivos para proinsulina. Se conocen y están disponibles en el mercado anticuerpos de proinsulina intacta. En una realización ejemplar, la proinsulina intacta tiene una secuencia peptídica de acuerdo con el N° de Referencia de AAA72531 o deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el N° de Referencia de GenBank M12913.

Leptina

En diversas realizaciones, se usa leptina como un biomarcador. La leptina es una hormona proteica derivada de adiposa de 16 kDa que desempeña un papel en la regulación del consumo de energía y el gasto de energía, incluyendo el apetito y el metabolismo. La leptina, que actúa a través del receptor de leptina, es parte de una ruta de señalización que puede inhibir el consumo de alimentos o regular el gasto de energía para mantener la constancia de la masa adiposa. La leptina también tiene varias funciones endocrinas, y está implicada en la regulación de las respuestas inmunitaria e inflamatoria, hematopoyesis, angiogénesis y curación de heridas. Las mutaciones en el gen de la leptina y/o sus regiones reguladoras provocan obesidad grave, y obesidad mórbida con hipogonadismo. La leptina también se ha ligado al desarrollo de diabetes mellitus de tipo 2. Las Tablas 5A y 5B muestran diversos niveles de riesgo de enfermedad asociados con diversas concentraciones de leptina en una muestra tomada de un sujeto humano.

TABLA 5A

Concentración de Leptina (hombre adulto) (ng/ml)	Nivel de Riesgo de Enfermedad
> 30	alto
20 - 30	medio
< 20	bajo

TABLA 5B

Concentración de Leptina (mujer adulta) (ng/ml)	Nivel de Riesgo de Enfermedad
> 60	alto
40 - 60	medio
< 40	bajo

En consecuencia, los ligandos de unión de captura adecuados, como se analiza adicionalmente en el presente documento, para la detección y/o cuantificación de leptina incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que son selectivos para leptina. Se conocen y están disponibles en el mercado anticuerpos de leptina. En una realización ejemplar, la leptina tiene una secuencia peptídica de acuerdo con el N° de Referencia de RefSeq NP_000221 o deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el N° de Referencia de RefSeq NM_000230.

Paneles de biomarcadores

Se usa cualquier combinación de los biomarcadores descritos en el presente documento para ensamblar un panel de biomarcadores, que se detecta o se mide como se describe en el presente documento. Como se entiende generalmente en la técnica, una combinación puede referirse a un conjunto completo o cualquier subconjunto o subcombinación del mismo. La expresión “panel de biomarcadores”, “perfil de biomarcadores” o “identificación de biomarcadores” se refiere a un conjunto de biomarcadores. Como se usa en el presente documento, estas expresiones también pueden referirse a cualquier forma de biomarcador que se mida. Por lo tanto, si la adiponectina es parte de un panel de biomarcadores, entonces la proteína de adiponectina o el ARNm de adiponectina, por ejemplo, podría considerarse parte del panel. Aunque los biomarcadores individuales son útiles como productos de diagnóstico, se ha descubierto que una combinación de biomarcadores puede en ocasiones proporcionar mayor valor en la determinación de un estado particular que los biomarcadores individuales solamente. Específicamente, la detección de una pluralidad de biomarcadores en una muestra puede aumentar la sensibilidad y/o especificidad del ensayo. Por lo tanto, en diversas realizaciones, un panel de biomarcadores puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más tipos de biomarcadores. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en un número mínimo de biomarcadores para generar una cantidad máxima de información. Por lo tanto, en diversas realizaciones, el panel de biomarcadores consiste en 3, 4, 5, 6, 7 u 8 tipos de biomarcadores. Cuando un panel de biomarcadores “consiste en” un conjunto de biomarcadores, no están presentes biomarcadores distintos de los del conjunto. En realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en 3 biomarcadores desvelados en el presente

documento. En diversas realizaciones, el panel de biomarcadores consiste en 4 biomarcadores desvelados en el presente documento.

5 En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores comprende adiponectina, hsCRP y proinsulina. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores comprende cualquier combinación de adiponectina, hsCRP y proinsulina. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en adiponectina, hsCRP y proinsulina. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en cualquier combinación de adiponectina, hsCRP y proinsulina. En diversas realizaciones ejemplares, la forma proteica de adiponectina, hsCRP y proinsulina se detecta usando un ensayo de proteínas como se conoce en la técnica o se
10 analiza en el presente documento.

15 En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores comprende o consiste en adiponectina, hsCRP y proinsulina y 1, 2, 3, 4 o más biomarcadores adicionales. Dichos biomarcadores adicionales pueden, por ejemplo, aumentar la especificidad y/o sensibilidad del ensayo. Los biomarcadores adicionales adecuados para paneles de biomarcadores incluyen, sin limitación, cualquier combinación de biomarcadores seleccionados de leptina, mRNAx, NFκB, IL-6, MMP-9, TNFα, NFκB, eNOS, PPARγ, MCP-1, PAI-1, ICAM/VCAM, E-selectina, P-selectina, factor de von Willebrand, sCD40L, insulina, glucosa, HbA1c, ácidos grasos libres, triglicéridos, VLDL, LDL denso pequeño, LDL oxidado, resistina, HDL, NO, IκB-α, IκB-β, p105, RelA, TNFα, MIF, citocinas inflamatorias, moléculas implicadas en rutas de señalización y cualquier biomarcador desvelado en la Publicación de Estados Unidos US/2008/0057590.

20 En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores comprende adiponectina, hsCRP, proinsulina y leptina. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en adiponectina, hsCRP, proinsulina y leptina. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores comprende o consiste en adiponectina, hsCRP, proinsulina, leptina y 1, 2, 3, 4 o más biomarcadores adicionales.

25 La expresión “parámetro clínico” se refiere a todos los biomarcadores no de muestra o no de analito del estado de salud de un sujeto u otras características, tales como, sin limitación, edad, etnia, sexo, presión de sangre diastólica y presión de sangre sistólica, historial familiar, altura, peso, circunferencia de cintura y cadera, índice de masa corporal, así como otros tales como Diabetes Mellitus de Tipo 1 o Tipo 2 o Diabetes Mellitus Gestacional (denominados colectivamente en el presente documento Diabetes), ritmo cardiaco en reposo, evaluación de
30 modelos homeostáticos (HOMA), resistencia a insulina de HOMA (HOMA-IR), tolerancia a la glucosa intravenosa (SI (IVGT)), función de células β, función macrovascular, función microvascular, índice aterógeno, presión sanguínea, relación de lipoproteína de baja densidad/lipoproteína de alta densidad, grosor de la íntima media, y puntuación de riesgo de UKPDS. Se desvelan otros parámetros clínicos en la Publicación de Estados Unidos US/2008/0057590.

35 Los biomarcadores de la invención muestran una diferencia estadísticamente significativa entre diferentes estados de cardiometabolismo. En diversas realizaciones, los ensayos de diagnóstico que usan estos biomarcadores solos o en combinación muestran una sensibilidad y especificidad de al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% y aproximadamente el 100%.

40

Medición y detección de biomarcadores

45 Los biomarcadores generalmente pueden medirse y detectarse mediante una diversidad de ensayos, métodos y sistemas de detección conocidos por un experto en la materia. El término “medir”, “detectar” o “tomar una medida” se refiere a una determinación cuantitativa o cualitativa de una propiedad de una entidad, por ejemplo, cuantificar la cantidad o concentración de una molécula o un nivel de actividad de una molécula. El término “concentración” o “nivel” puede referirse a una cantidad absoluta o relativa. Medir una molécula también puede incluir determinar la ausencia o presencia de la molécula. Diversos métodos incluyen pero sin limitación espectroscopia de índice refractario (RI), espectroscopia ultravioleta (UV), análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopia de infrarrojo cercano (IR cercano), espectroscopia de infrarrojos (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de dispersión de la luz (LS), espectrometría de masas, espectrometría de masas por pirólisis, nefelometría, espectroscopia de Raman de dispersión, cromatografía de gases, cromatografía líquida, cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas, cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas, desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) combinada con espectrometría de
50 masas, espectroscopia de pulverización iónica combinada con espectrometría de masas, electroforesis capilar, colorimetría y resonancia de plasmón superficial (tal como de acuerdo con sistemas proporcionados por Biacore Life Sciences). Véase también Publicaciones de PCRT WO/2004/056456 y WO/2004/088309. A este respecto, los biomarcadores pueden medirse usando los métodos de detección anteriormente mencionados, u otros métodos conocidos por los expertos en la materia. Otros biomarcadores pueden detectarse de forma similar usando reactivos
60 que se diseñan o se adaptan específicamente para detectarlos.

Pueden combinarse diferentes tipos de biomarcadores y sus mediciones en las composiciones y métodos de la presente invención. En diversas realizaciones, se mide la forma proteica de los biomarcadores. En diversas realizaciones, se mide la forma de ácido nucleico de los biomarcadores. En realizaciones ejemplares, la forma de
65 ácido nucleico es ARNm. En diversas realizaciones, se usan mediciones de biomarcadores proteicos junto con mediciones de biomarcadores de ácido nucleico.

Se conocen bien en la técnica métodos para detectar ARNm, tales como RT-PCR, PCR en tiempo real, ADN ramificado, NASBA y otros. Usando información de secuencia proporcionada por las entradas en las bases de datos para las secuencias de biomarcadores, puede detectarse la expresión de las secuencias de los biomarcadores (si están presentes) y medirse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las secuencias en las entradas de bases de datos de secuencias o secuencias desveladas en el presente documento pueden usarse para construir sondas para detectar secuencias de ARN de biomarcadores en, por ejemplo, análisis de hibridación de transferencia de Northern o métodos que amplifican específica y, preferentemente, cuantitativamente secuencias de ácido nucleico específicas. Como otro ejemplo, las secuencias pueden usarse para construir cebadores para amplificar específicamente las secuencias de los biomarcadores en, por ejemplo, métodos de detección basados en amplificación tales como reacción en cadena de la polimerasa basada en transcripción inversa (RT-PCR). Cuando se asocian alteraciones en la expresión génica con la amplificación génica, delección, polimorfismos y mutaciones, pueden realizarse comparaciones de secuencias en poblaciones de ensayo y de referencia comparando cantidades relativas de las secuencias de ADN examinadas en las poblaciones celulares de ensayo y de referencia. Además de transferencia de Northern y RT-PCR, el ARN también puede medirse usando, por ejemplo, otros métodos de amplificación de dianas (por ejemplo, TMA, SDA, NASBA), métodos de amplificación de señales (por ejemplo, ADNb), ensayos de protección de nucleasas, hibridación *in situ* y similares.

Por lo tanto, son de particular interés en la presente invención los ensayos de microplacas biológicas. Por "microplaca biológica" o "microplaca" se entiende en el presente documento una composición que comprende generalmente un soporte o sustrato sólido al que se une un ligando de unión de captura (también llamado un reactivo adsorbente, de afinidad o ligando de unión, o cuando se mide el ácido nucleico, una sonda de captura) y pueden unirse bien proteínas, bien ácidos nucleicos o ambos. En general, cuando se usa una microplaca biológica para mediciones de biomarcadores proteicos y de ácidos nucleicos, los biomarcadores proteicos se miden en una microplaca separada de la usada para medir los biomarcadores de ácido nucleico. Para ejemplos no limitantes de plataformas y métodos adicionales útiles para medir ácidos nucleicos, véase Publicaciones US/2006/0275782, US/2005/0064469 y DE10201463. En diversas realizaciones, se miden biomarcadores en la misma plataforma, tal como en una microplaca. En diversas realizaciones, se miden biomarcadores usando diferentes plataformas y/o diferentes ciclos experimentales.

Por "ligando de unión", "ligando de unión de captura", "especie de unión de captura", "sonda de captura" o equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende un compuesto que se usa para detectar la presencia de o para cuantificar, de forma relativa o absoluta, un analito diana, especie diana o secuencia diana (todas usadas de forma intercambiable) y que se unirá al analito diana, especie diana o secuencia diana. En general, el ligando de unión de captura o sonda de captura permite la unión de una especie diana o secuencia diana a un soporte sólido para los fines de detección como se describe adicionalmente en el presente documento. La unión de la especie diana con el ligando de unión de captura puede ser directa o indirecta. En realizaciones ejemplares, la especie diana es un biomarcador. Como se apreciará por los expertos en la materia, la composición del ligando de unión dependerá de la composición de biomarcador. Se conocen o pueden encontrarse fácilmente usando técnicas conocidas ligandos de unión para una amplia diversidad de biomarcadores. Por ejemplo, cuando el biomarcador es una proteína, los ligandos de unión incluyen proteínas (particularmente incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos (FAb, etc.) como se analiza adicionalmente posteriormente) o moléculas pequeñas. El ligando de unión también puede tener reactividad cruzada con proteínas de otras especies. Los pares de antígeno-anticuerpo, receptor-ligandos y carbohidratos y sus compañeros de unión también son pares de ligando de unión-analito adecuados. En diversas realizaciones, el ligando de unión puede ser ácido nucleico. Los ligandos de unión a ácido nucleico encuentran uso particular cuando las proteínas son las dianas; como alternativa, como se describe en general en las Patentes de Estados Unidos 5.270.163; 5.475.096; 5.567.588; 5.595.877; 5.637.459; 5.683.867; 5.705.337 y patentes relacionadas, pueden desarrollarse "aptámeros" de ácido nucleico para unirse a prácticamente cualquier biomarcador. Los ligandos de unión de ácido nucleico también encuentran uso particular cuando los ácidos nucleicos son dianas de unión. Existe una amplia bibliografía que se refiere al desarrollo de compañeros de unión basándose en métodos de química combinatoria. En estas realizaciones, cuando el ligando de unión es un ácido nucleico, se perfilan composiciones y técnicas preferidas en la Publicación de PCT WO/1998/020162.

En diversas realizaciones ejemplares, el ligando de unión de captura es un anticuerpo. Estas realizaciones son particularmente útiles para la detección de la forma proteica de un biomarcador.

La detección o medición del nivel (por ejemplo el nivel de transcripción) de un biomarcador implica unión del biomarcador con un ligando de unión de captura, generalmente denominado en el presente documento "sonda de captura" cuando el ARNm del biomarcador debe detectarse en un soporte sólido. En este sentido, el biomarcador es una secuencia diana. La expresión "secuencia diana" o "ácido nucleico diana" o equivalentes gramaticales en el presente documento significa una secuencia de ácido nucleico que puede ser una parte de un gen, una secuencia reguladora, ADN genómico, ADNc, ARN incluyendo ARNm y ARNr, u otros. Como se perfila en el presente documento, la secuencia diana puede ser una secuencia diana de una muestra, o una diana secundaria tal como un producto de una reacción de amplificación tal como PCR etc. En algunas realizaciones, la medición de un ácido nucleico puede por lo tanto referirse a medir el complemento del ácido nucleico. Puede ser de cualquier longitud, con el entendimiento de que las secuencias más largas son más específicas.

La secuencia diana también puede comprender diferentes dominios diana; por ejemplo, un primer dominio diana de la secuencia diana de muestra puede hibridar con una sonda de captura, un segundo dominio diana puede hibridar con una sonda marcadora (por ejemplo un formato de "ensayo de tipo sándwich"), etc. Los dominios diana pueden estar adyacentes o separados como se indica. A no ser que se especifique, se entiende que los términos "primero" y "segundo" no confieren una orientación de las secuencias con respecto a la orientación 5'-3' de la secuencia diana. Por ejemplo, asumiendo una orientación 5'-3' de la secuencia diana, el primer dominio diana puede localizarse 5' del segundo dominio, o 3' del segundo dominio.

Cuando se usan ácidos nucleicos como el analito diana, los ensayos de la invención pueden tomar varias realizaciones. En una realización, los ensayos se realizan en formato de solución, usando cualquier número de formatos basados en solución. En una realización, se usan formatos de PCR de puntos finales o en tiempo real, como se conoce bien en la técnica. Estos ensayos pueden realizarse como un panel, en tubos o pocillos individuales, o como ensayos múltiples, usando conjuntos de cebadores y diferentes marcadores dentro de un único tubo o pocillo. Además de formatos de solución basados en PCR, pueden utilizarse otros formatos, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo ensayos basados en ligación utilizando pares de colorantes de FRET. En esta realización, solamente se genera una señal tras la ligación de dos (o más) sondas hibridadas con la secuencia diana.

En muchas realizaciones, los ensayos se realizan en un soporte sólido, utilizando una sonda de captura asociada con la superficie. Como se analiza en el presente documento, las sondas de captura (o ligandos de unión de captura, como se denominan en ocasiones) pueden unirse covalentemente a la superficie, por ejemplo usando sondas de captura modificadas en los extremos con grupos funcionales, por ejemplo grupos amino, que se unen a superficies modificadas tales como vidrio silanizado. Como alternativa, puede utilizarse unión no covalente, tal como adhesión electrostática, hidrófoba/hidrófila. Como se aprecia por los expertos en la materia y se analiza en el presente documento, es posible un gran número de uniones en una amplia diversidad de superficies.

En esta realización, los ensayos pueden tomar varios formatos. En una realización, la secuencia diana comprende un marcador detectable, como se describe en el presente documento. En esta realización, el marcador se añade generalmente a la secuencia diana durante la amplificación de la diana de una de dos maneras: se utilizan cebadores marcados durante la etapa de amplificación o se usan dNTP marcados, ambos de los cuales se conocen bien en la técnica. El marcador puede ser un marcador primario o secundario como se analiza en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, el marcador en el cebador y/o un dNTP es un marcador primario tal como un fluoróforo. Como alternativa, el marcador puede ser un marcador secundario tal como biotina o una enzima; por ejemplo, en una realización, los cebadores o dNTP se marcan con biotina, y después se añade un complejo de estreptavidina/marcador. En una realización, el complejo de estreptavidina/marcador contiene un marcador tal como un fluoróforo. En una realización alternativa, el complejo de estreptavidina/marcador comprende un marcador enzimático. Por ejemplo, el complejo puede comprender peroxidasa de rábano rústicano y, tras la adición de TMB, la acción de la peroxidasa de rábano rústicano provoca que la TMB precipite, provocando un acontecimiento detectable ópticamente. Esto tiene un beneficio particular porque la óptica para la detección no requiere el uso de un fluorímetro.

En realizaciones alternativas, el ensayo de fase sólida se basa en el uso de un ligando de captura soluble marcado, en ocasiones denominado "sonda marcadora" o "sonda de señalización" cuando el analito diana es un ácido nucleico. En este formato, el ensayo es un ensayo de tipo "sándwich", en el que la sonda de captura se une a un primer dominio de la secuencia diana y la sonda marcadora se une a un segundo dominio. En esta realización, la sonda marcadora también puede ser un marcador primario (por ejemplo un fluoróforo) o uno secundario (biotina o enzima). En una realización, la sonda marcadora comprende biotina, y se usa un complejo de estreptavidina/enzima, como se analiza en el presente documento. Como anteriormente, por ejemplo, el complejo puede comprender peroxidasa de rábano rústicano y, tras la adición de TMB, la acción de la peroxidasa de rábano rústicano provoca que la TMB precipite, provocando un acontecimiento ópticamente detectable.

La detección de una especie diana en algunas realizaciones requiere un "marcador" o "marcador detectable" (como se describe posteriormente) que puede incorporarse de una diversidad de maneras. Por lo tanto, en diversas realizaciones, la composición comprende un "marcador" o un "marcador detectable". En una realización, la especie diana (o analito diana o secuencia diana) está marcada; la unión de la especie diana proporciona de este modo el marcador en la superficie del soporte sólido.

En realizaciones que encuentran uso particular en el presente documento, se utiliza un formato de tipo sándwich, en el que las especies diana no están marcadas. En estas realizaciones, un ligando de unión de "captura" o "anclaje" se une a la superficie de detección como se describe en el presente documento, y un ligando de unión soluble (denominado frecuentemente en el presente documento "sonda de señalización", "sonda marcadora" o "ligando de captura soluble") se une independientemente a la especie diana y directa o indirectamente comprende al menos un marcador o marcador detectable.

Por "marcador" o "marcado" en el presente documento se entiende que un compuesto tiene al menos una molécula, elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto. En general, los marcadores quedan en cuatro clases: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) magnéticos,

eléctricos, térmicos; c) colorantes coloreados o luminiscentes; y d) enzimas; aunque los marcadores incluyen también partículas tales como partículas magnéticas. Los colorantes pueden ser cromóforos o fósforos pero son preferentemente colorantes fluorescentes, que debido a sus fuertes señales proporcionan una buena relación de señal y ruido para descodificar. Los colorantes adecuados para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, complejos de lantánidos fluorescentes, incluyendo los de Europio y Terbio, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, coumarina, metilcoumarinas, pireno, verde Malaquita, estilbeno, Amarillo Lucifer, Cascade Blue, Texas Red, colorantes de Alexa y otros descritos en la 6ª Edición del Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland. Los marcadores adicionales incluyen nanocristales o puntos Q como se describen en la Patente de Estados Unidos 6.544.732.

En diversas realizaciones, se usa un marcador detectable secundario. Un marcador secundario es uno que se detecta indirectamente; por ejemplo, un marcador secundario puede unirse o reaccionar con un marcador primario para detección, puede actuar en un producto adicional para generar un marcador primario (por ejemplo enzimas) o puede permitir la separación del compuesto que comprende el marcador secundario de materiales no marcados, etc. Los marcadores secundarios incluyen, pero sin limitación, uno de un par de compañeros de unión; restos modificables químicamente; inhibidores de nucleasa, enzimas tales como peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, luciferasa, etc. Los marcadores secundarios también pueden incluir marcadores adicionales.

En diversas realizaciones, el marcador secundario es un par de compañeros de unión. Por ejemplo, el marcador puede ser un hapteno o antígeno, que se unirá a su compañero de unión. Por ejemplo, los pares de compañeros de unión adecuados incluyen, pero sin limitación: antígenos (tales como proteínas (incluyendo péptidos)) y anticuerpos (incluyendo fragmentos de los mismos (Fab, etc.)); proteínas y moléculas pequeñas, incluyendo biotina/estreptavidina; enzimas y sustratos o inhibidores; otros pares de interacción proteína-proteína; receptor-ligandos; y carbohidratos y sus compañeros de unión. También son útiles pares de proteínas de unión de ácido nucleico-ácido nucleico. En general, el menor del par se une con la NTP para incorporación en el cebador. Los pares de compañeros de unión preferidos incluyen, pero sin limitación, biotina (o imino-biotina) y estreptavidina, digeoxinina y Ab, y reactivos de Prolinx™.

En los formatos de tipo sándwich de la invención, una enzima actúa como el marcador secundario, unido al ligando de captura soluble. Es de uso particular en algunas realizaciones el uso de peroxidasa de rábano rústico, que cuando se combina con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) forma un precipitado coloreado que después se detecta. En algunos casos, el ligando de captura soluble comprende biotina, que después se une a un complejo de enzima-estreptavidina y forma un precipitado coloreado con la adición de TMB.

En diversas realizaciones, el marcador o marcador detectable es una enzima conjugada (por ejemplo, peroxidasa de rábano rústico). En diversas realizaciones, el sistema se basa en la detección de la precipitación de un producto de reacción o en un cambio en, por ejemplo, las propiedades eléctricas para detección. En diversas realizaciones, ninguno de los compuestos comprende un marcador.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto generador de señal fluorescente" o "fluoróforo" se refiere a una molécula o parte de una molécula que absorbe energía a una longitud de onda y vuelve a emitir energía a otra longitud de onda. Las propiedades fluorescentes que pueden medirse incluyen intensidad de fluorescencia, tiempo de vida de fluorescencia, características del espectro de emisión, transferencia de energía y similares.

Pueden generarse señales de moléculas individuales y detectarse por varios sistemas de detección, incluyendo, pero sin limitación, microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica de barrido de campo próximo (NSOM), microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM) y similares. Se encuentran abundantes directrices en la bibliografía para aplicar dicha técnicas para analizar y detectar estructuras a nanoescala en superficies, como se demuestra por la siguientes referencias: Reimer *et al*, editores, Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis, 2ª Edición (Springer, 1998); Nie *et al*, Anal. Chem., 78: 1528-1534 (2006); Hecht *et al*, Journal Chemical Physics, 112: 7761-7774 (2000); Zhu *et al*, editores, Near-Field Optics: Principles and Applications (World Scientific Publishing, Singapur, 1999); Drmanac, Publicación de PCT WO/2004/076683; Lehr *et al*, Anal. Chem., 75: 2414-2420 (2003); Neuschafer *et al*, Biosensors & Bioelectronics, 18: 489-497 (2003); Neuschafer *et al*, Patente de Estados Unidos 6.289.144; y similares.

Por lo tanto, un sistema de detección para fluoróforos incluye cualquier dispositivo que puede usarse para medir las propiedades fluorescentes como se ha analizado anteriormente. En diversas realizaciones, el sistema de detección comprende una fuente de excitación, un fluoróforo, un filtro de longitud de onda para aislar fotones de emisión de fotones de excitación y un detector que registra fotones de emisión y produce un rendimiento que puede registrarse, en algunas realizaciones como una señal eléctrica o una imagen fotográfica. Los ejemplos de dispositivos de detección incluyen sin limitación espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, exploradores de fluorescencia (incluyendo por ejemplo lectores de micromatrices) y citómetros de flujo.

En diversas realizaciones ejemplares, la unión del biomarcador con el ligando de unión es específica o selectiva, y el ligando de unión es parte de un par de unión. Por "unirse específicamente con" o "unirse selectivamente con" o "selectivo para" un biomarcador en el presente documento se entiende que el ligando se une al biomarcador con

especificidad suficiente para diferenciar entre el biomarcador y otros componentes o contaminantes de la muestra de ensayo.

5 La expresión “soporte sólido” o “sustrato” se refiere a cualquier material que pueda modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de un ligando de unión de captura. Los sustratos adecuados incluyen superficies metálicas tales como oro, electrodos, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, policarbonato, poliuretanos, Teflón, derivados de los mismos, etc.), polisacáridos, nylon o nitrocelulosa, resinas, mica, sílice o materiales basados en sílice incluyendo silicio o silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, fibra de vidrio, cerámica, GETEK (una mezcla de óxido de polipropileno y fibra de vidrio) y una diversidad de otros polímeros. Son de uso particular en la presente invención los materiales ClonDiag descritos posteriormente.

15 Frecuentemente, la superficie de una microplaca biológica comprende una pluralidad de localizaciones abordables, cada una de las cuales comprende un ligando de unión de captura. Una “localización de serie”, “localización abordable”, “plataforma” o “sitio” en el presente documento significa una localización en el sustrato que comprende un ligando de unión de captura unido covalentemente. Una “serie” en el presente documento significa una pluralidad de ligandos de unión de captura en un formato regular, ordenado, tal como una matriz. El tamaño de la serie dependerá de la composición y el uso final de la serie. Pueden realizarse series que contengan de aproximadamente 20 dos o más ligandos de unión de captura diferentes a muchos miles. Generalmente, la serie comprenderá 3, 4, 5, 6, 7 o más tipos de ligandos de unión de captura dependiendo del uso final de la serie. En la presente invención, la serie puede incluir controles, replicaciones de los marcadores y similares. Son intervalos ejemplares de aproximadamente 3 a aproximadamente 50. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden no estar en formato de serie; es decir, para algunas realizaciones, también pueden realizarse composiciones que comprendan un único 25 ligando de captura. Además, en algunas series, pueden usarse múltiples sustratos, de composiciones diferentes o idénticas. Por lo tanto, por ejemplo, las series grandes pueden comprender una pluralidad de sustratos más pequeños.

30 En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un soporte sólido que comprende un ligando de unión de captura para cada biomarcador de un panel de biomarcadores. En diversas realizaciones, el ligando de unión de captura es un anticuerpo. En diversas realizaciones, la composición comprende además un ligando de unión soluble para cada biomarcador de un panel de biomarcadores.

35 Pueden usarse varias plataformas de series de microplacas biológicas diferentes como se conocen en la técnica. Por ejemplo, las composiciones y métodos de la presente invención pueden implementarse con plataformas de series tales como GeneChip (Affymetrix), Bioserie CodeLink (Amersham), Sistema de Series de Expresión (Applied Biosystems), microseries SurePrint (Agilent), Microplaca-Perla Sentrix LD o Matriz de Series Sentrix (Illumina) y Verigene (Nanosphere).

40 En diversas realizaciones ejemplares, la detección y medición de biomarcadores utiliza métodos y sistemas colorimétricos para proporcionar un indicio de la unión de un analito diana o especie diana. En métodos colorimétricos, la presencia de una especie diana unida tal como un biomarcador dará como resultado un cambio en la absorbancia o transmisión de la luz por una muestra o sustrato a una o más longitudes de onda. La detección de la absorbancia o transmisión de la luz a dichas longitudes de onda proporciona de este modo un indicio de la 45 presencia de la especie diana.

50 Un sistema de detección para métodos colorimétricos incluye cualquier dispositivo que puede usarse para medir propiedades colorimétricas como se ha analizado anteriormente. Generalmente, el dispositivo es un espectrofotómetro, un colorímetro o cualquier dispositivo que mida la absorbancia o transmisión de la luz a una o más longitudes de onda. En diversas realizaciones, el sistema de detección comprende una fuente de luz; un filtro de longitud de onda o monocromador; un recipiente de muestras tal como una cubeta o vial de reacción; un detector, tal como una fotorresistencia, que registra la luz transmitida; y una pantalla o elemento de formación de imágenes.

55 En diversas realizaciones ejemplares, se usa una plataforma de microplaca ClonDiag para la detección colorimétrica de biomarcadores. En diversas realizaciones, se usa un ClonDiag ArrayTube (AT). Una característica única del ArrayTube es la combinación de una serie de microsondas (la microplaca biológica) y vial de microrreacción. En diversas realizaciones, donde una secuencia diana es un ácido nucleico, la detección de la secuencia diana se realiza amplificando y biotinilando la secuencia diana contenida en una muestra y opcionalmente digiriendo los productos de amplificación. Después se permite que el producto de amplificación hibride con sondas contenidas en 60 la microplaca ClonDiag. Una solución de un conjugado de estreptavidina-enzima, tal como solución de policonjugado de peroxidasa de rábano rusticano (HRP), se pone en contacto con la microplaca ClonDiag. Después de lavar, se pone en contacto una solución colorante tal como solución de sustrato de o-dianisidina con la microplaca. La oxidación del colorante da como resultado precipitación que puede detectarse de forma colorimétrica. Se encuentra descripción adicional de la plataforma ClonDiag en Monecke S, Slickers P, Hotzel H *et al.*, Clin Microbiol Infect 2006, 12: 718-728; Monecke S, Berger-Bächli B, Coombs C *et al.*, Clin Microbiol Infect 2007, 13: 236-249; Monecke S, Leube I y Ehrlich R, Genome Lett 2003, 2: 106-118; Monecke S y Ehrlich R, Clin Microbiol Infect 2005, 11: 825-833;

Patente Alemana DE 10201463; Publicación de Estados Unidos US/2005/0064469 y ClonDiag, ArrayTube (AT) Experiment Guideline for DNA-Based Applications, versión 1.2, 2007. Un experto en la materia apreciará que pueden utilizarse otros numerosos colorantes que reaccionen con una peroxidasa para producir un cambio colorimétrico, tales como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Para información sobre protocolos de ensayo
5 específicos, véase www.clondiag.com/technologies/publications.php.

En diversas realizaciones, donde una especie diana es una proteína, la microplaca biológica ArrayTube comprende ligandos de unión de captura tales como anticuerpos. Se pone en contacto una muestra con la microplaca biológica,
10 y se permite que cualquier especie diana presente en la muestra se una a los anticuerpos de ligando de unión de captura. Se permite que un ligando de unión de captura soluble o un compuesto de detección tal como un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano rústicano se una a la especie diana. Después se añade un colorante, tal como TMB y se permite que reaccione con la peroxidasa de rábano rústicano, provocando precipitación y un cambio de color que se detecta por un dispositivo de detección adecuado. Se encuentra descripción adicional de la detección de proteínas usando ArrayTube en, por ejemplo, Huelseweh B, Ehrlich R y Marschall H-J, *Proteomics*, 2006, 6,
15 2972-2981; y ClonDiag, ArrayTube (AT) Experiment Guideline for Protein-Based Applications, versión 1.2, 2007.

Se realiza detección y análisis de transmisión con un instrumento lector de ClonDiag AT. Los instrumentos lectores y dispositivos de detección adecuados incluyen el ArrayTube Workstation ATS y el ATR 03.

Además del ArrayTube, puede usarse la ArrayStrip (AS) de ClonDiag. La ArrayStrip proporciona un formato de 96 pocillos para ensayo de alto volumen. Cada ArrayStrip consiste en una tira de 8 pocillos convencional con una microserie integrada en el fondo de cada pocillo. Pueden insertarse hasta 12 ArrayStrips en un marco de microplaca que permita el ensayo multiparamétrico paralelo de hasta 96 muestras. La ArrayStrip puede procesarse usando el Procesador de ArrayStrip ASP, que realiza todas las etapas de manipulación de líquidos, incubación y detección
20 requeridas en el análisis basado en series. En diversas realizaciones, cuando se detecta una proteína, un método para usar la ArrayStrip para detectar la proteína comprende acondicionar la serie de AS con tampón o solución de bloqueo; cargar hasta 96 soluciones de muestra en los pocillos de AS para permitir la unión de la proteína; lavar 3 x; conjugar con un anticuerpo secundario unido a HRP; lavar 3 x; teñir por precipitación con TMB; y formar imágenes de serie de AS y almacenamiento de datos opcional.
25

Los expertos en la materia estarán familiarizados con numerosos formatos de inmunoensayo adicionales y variaciones de los mismos que pueden ser útiles para llevar a cabo el método desvelado en el presente documento. Véase en general, E. Maggio, *Enzyme-Immunoassay*, (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1980); véanse también Patentes de Estados Unidos 4.727.022; 4.659.678; 4.376.110; 4.275.149; 4.233.402; y 4.230.767.
30

En general, los inmunoensayos llevados a cabo de acuerdo con la presente invención pueden ser ensayos homogéneos o ensayos heterogéneos. En un ensayo homogéneo la reacción inmunológica habitualmente implica el anticuerpo específico (por ejemplo, anticuerpo anti proteína biomarcadora), un analito marcado, y la muestra de interés. La señal que surge del marcador se modifica, directa o indirectamente, tras la unión del anticuerpo con el analito marcado. Tanto la reacción inmunológica como la detección del alcance de la misma pueden llevarse a cabo en una solución homogénea. Los marcadores inmunoquímicos que pueden emplearse incluyen radicales libres, radioisótopos, colorantes fluorescentes, enzimas, bacteriófagos o coenzimas.
35

En un enfoque de ensayo heterogéneo, los reactivos son habitualmente la muestra, el anticuerpo, y el medio para producir una señal detectable. Pueden usarse muestras como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo puede inmovilizarse en un soporte, tal como una perla (tal como perlas de agarosa de proteína A y proteína G), placa o portaobjetos, y ponerse en contacto con la muestra de ensayo que se sospecha que contiene el antígeno en una fase líquida. El soporte se separa después de la fase líquida y se examina la fase de soporte o la fase líquida con respecto a una señal detectable empleando medios para producir dicha señal. La señal está relacionada con la presencia del analito en la muestra. Los medios para producir una señal detectable incluyen el uso de marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes o marcadores enzimáticos. Por ejemplo, si el antígeno para detectar contiene un segundo sitio de unión, un anticuerpo que se une a ese sitio puede conjugarse con un grupo detectable y añadirse a la solución de reacción de fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable en el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo. Los ejemplos de inmunoensayos adecuados incluyen inmunotransferencia, métodos de inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, métodos de quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia (ECL) o inmunoensayos ligados a enzima.
40
45
50
55

Los anticuerpos pueden conjugarse con un soporte sólido adecuado para un ensayo de diagnóstico (por ejemplo, perlas tales como agarosa de proteína A o proteína G, microesferas, placas, portaobjetos o pocillos formados de materiales tales como látex o poliestireno) de acuerdo con técnicas conocidas, tales como unión pasiva. Los anticuerpos como se describen en el presente documento pueden de forma similar conjugarse con marcadores detectables o grupos tales como radiomarcadores (por ejemplo, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano rústicano, fosfatasa alcalina) y marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, Alexa, proteína verde fluorescente, rodamina) de acuerdo con técnicas conocidas.
60

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa una proteína que comprende uno o más
65

polipéptidos sustancialmente codificados por todos o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en seres humanos, incluyen los loci genéticos de cadena kappa (κ), lambda (λ) y pesada, que juntos componen la miríada de genes de región variable, y los genes de región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), épsilon (ϵ) y alfa (α), que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG, IgE e IgA respectivamente. En el presente documento se entiende que anticuerpo incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo, y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo obtenido por ingeniería genética o un anticuerpo generado de forma recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros como se define adicionalmente posteriormente. Los fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos y pueden incluir los producidos por la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante. El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos tanto monoclonales como policlonales. Los anticuerpos pueden ser antagonistas, agonistas, neutralizadores, inhibidores o estimuladores.

Usando cualquiera de los métodos y composiciones descritos en el presente documento, se puede ensayar una muestra para determinar los niveles de un panel de biomarcadores. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para ensayar una muestra de un paciente para terminar concentraciones de un panel de biomarcadores en la muestra. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra con una composición que comprende un soporte sólido que comprende un ligando de unión de captura o sonda de captura para cada biomarcador de un panel de biomarcadores.

También se desvelan en el presente documento kits para su uso en la determinación de cardiometabolismo para varias aplicaciones médicas (incluyendo de diagnóstico y terapéuticas), industriales, forenses y de investigación. Los kits pueden comprender un vehículo, tal como una caja, envase, tubo o similares, que tenga en confinamiento estrecho en el mismo uno o más recipientes, tales como viales, tubos, ampollas, frascos, bolsas, sobres y similares. En diversas realizaciones, los kits comprenden uno o más componentes seleccionados de uno o más medios o ingredientes de los medios y reactivos para la medición de los diversos biomarcadores y paneles de biomarcadores desvelados en el presente documento. Por ejemplo, los kits de la invención también pueden comprender, en el mismo o diferentes recipientes, una o más ADN polimerasas, uno o más cebadores, uno o más tampones adecuados, uno o más nucleótidos (tales como desoxinucleósido trifosfatos (dNTP) y preferentemente dNTP marcados con fluorescencia) y componentes marcadores. El o los componentes pueden estar contenidos dentro del mismo recipiente, o pueden estar en recipientes separados para mezclar antes de su uso. Los kits de la presente invención también pueden comprender una o más instrucciones o protocolos para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Los kits también pueden comprender un ordenador, o un componente de un ordenador, tal como un medio o dispositivo de almacenamiento leíble por ordenador. Los ejemplos de medios de almacenamiento incluyen, sin limitación, discos ópticos tales como CD, DVD y discos Blu-ray (BD); discos magneto-ópticos; medios magnéticos tales como cinta magnética y discos duros internos y discos extraíbles; dispositivos de memoria semiconductores tales como EPROM, EEPROM y memoria flash; y RAM. El medio de almacenamiento leíble por ordenador puede comprender software que codifique referencias a las diversas terapias y regímenes de tratamiento desvelados en el presente documento. El software puede interpretarse por un ordenador para proporcionar al practicante tratamientos de acuerdo con diversas concentraciones medidas de biomarcadores como se proporcionan en el presente documento. En diversas realizaciones, el kit comprende un ensayo de biomarcador que implica un ensayo rápido en el lugar de atención basado en flujo lateral con detección de umbrales de riesgo, o una microplaca biológica con ensayos cuantitativos para los biomarcadores constituyentes.

45 **Métodos de diagnóstico y tratamiento**

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse en el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de enfermedad en un sujeto, aunque la invención no incluye métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia. La invención proporciona composiciones y métodos para ensayos de laboratorio y lugar de atención para medir biomarcadores en una muestra de un sujeto. La invención puede aplicarse en general para varias enfermedades diferentes. En realizaciones ejemplares, la enfermedad es cardiometabolismo. En realizaciones ejemplares, la enfermedad es síndrome metabólico.

Los biomarcadores y paneles de biomarcadores desvelados en el presente documento pueden usarse en métodos para diagnosticar, identificar o explorar sujetos que tengan, no tengan o estén en riesgo de tener enfermedad; para controlar sujetos que se someten a terapias para enfermedad; para determinar o sugerir una nueva terapia o un cambio de terapia; para diagnosticar diferencialmente patologías asociadas con la enfermedad de otras enfermedades o dentro de subclasificaciones de la enfermedad; para evaluar la gravedad o los cambios de gravedad de la enfermedad en un paciente; para clasificar un sujeto con la enfermedad y seleccionar o modificar terapias o intervenciones para su uso en el tratamiento de sujetos con la enfermedad. En una realización ejemplar, los métodos de la presente invención se usan para identificar y/o diagnosticar sujetos que son asintomáticos o presintomáticos para una enfermedad. En este contexto, "asintomático" o "presintomático" significa que no muestra los síntomas tradicionales o suficiente anomalía para la enfermedad. En realizaciones ejemplares, el sujeto es normoglicémico.

En diversas realizaciones, un método para determinar un pronóstico de una enfermedad en un sujeto, diagnosticar una enfermedad en un sujeto o tratar una enfermedad en un sujeto comprende tomar una medida de un panel de biomarcadores en una muestra del sujeto. En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta.

5 La expresión “estado de enfermedad” incluye cualquier manifestación distinguible de la enfermedad, incluyendo ausencia de enfermedad. Por ejemplo, el estado de enfermedad incluye, sin limitación, la presencia o ausencia de enfermedad, el riesgo de desarrollar enfermedad, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progreso de la enfermedad o remisión de la enfermedad a lo largo del tiempo), la gravedad de la enfermedad y la eficacia o respuesta al tratamiento de la enfermedad.

15 Un “sujeto” en el contexto de la presente invención es un animal, preferentemente un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca, pero no se limita a estos ejemplos. En diversas realizaciones ejemplares, un sujeto es humano y puede denominarse paciente. Pueden usarse provechosamente mamíferos distintos de seres humanos como sujetos que representen modelos animales de una enfermedad o para aplicaciones veterinarias. Un sujeto puede ser uno al que se haya diagnosticado previamente o que se ha identificado que tiene una enfermedad, y opcionalmente ya se ha sometido, o se está sometiendo, a una intervención terapéutica para una enfermedad. Como alternativa, un sujeto también puede ser uno al que no se le haya diagnosticado previamente que tenga una enfermedad. Por ejemplo, un sujeto puede ser uno que muestre uno o más factores de riesgo para una enfermedad, o uno que no muestre un factor de riesgo de enfermedad, o uno que sea asintomático para una enfermedad. Un sujeto también puede ser uno que padezca o esté en riesgo de desarrollar una enfermedad. En ciertas realizaciones, el sujeto puede estar sometándose ya a terapia o puede ser un candidato para terapia.

25 Como se apreciará por los expertos en la materia, los biomarcadores pueden medirse usando varias técnicas diseñadas para conseguir variabilidad de sujeto y analítica más predecible. En la variabilidad del sujeto, muchos de los biomarcadores anteriores se miden habitualmente en un estado de ayunas, habitualmente por la mañana, proporcionando un nivel reducido de variabilidad del sujeto debido tanto al consumo de alimentos como al metabolismo y a la variación diurna. Todos los procedimientos de toma de muestras basados en ayunas y temporales usando los biomarcadores descritos en el presente documento pueden ser útiles para realizar la invención. También se puede pretender que los ajustes preprocesamiento de los resultados de biomarcadores reduzcan este efecto.

35 El término “muestra” se refiere a una muestra de ensayo o cultivo obtenido de un sujeto e incluye fluidos, gases y sólidos incluyendo por ejemplo tejido. En diversas realizaciones ejemplares, la muestra comprende sangre. Los fluidos obtenidos de un sujeto incluyen por ejemplo sangre completa o un derivado de sangre (por ejemplo suero, plasma o células sanguíneas), líquido de quiste ovárico, líquido ascítico, linfático, cefalorraquídeo o intersticial, saliva, mucus, esputo, sudor, orina o cualquier otra secreción, excreción u otros fluidos corporales. Como se apreciará por los expertos en la materia, puede haberse realizado en la muestra prácticamente cualquier etapa de manipulación experimental o preparación de la muestra. Por ejemplo pueden aplicarse etapas de lavado y/o fragmentación a una muestra. En diversas realizaciones, un panel de biomarcadores se mide directamente en un sujeto sin la necesidad de obtener una muestra separada del paciente.

45 La divulgación incluye un método para diagnosticar a un sujeto una enfermedad que comprende tomar una medida de un panel de biomarcadores; y correlacionar la medida con la enfermedad. El término “correlacionar” se refiere en general a determinar una relación entre un tipo de dato con otro o con un estado. En diversas realizaciones, la correlación de la medición con enfermedad comprende comparar la medida con un perfil de biomarcador de referencia o algún otro valor de referencia. En diversas realizaciones, correlacionar la medición con la enfermedad comprende determinar si el sujeto está actualmente en un estado de enfermedad.

50 Las mediciones de cantidad o actividad de un panel de biomarcadores pueden compararse con un valor de referencia. Después se identifican diferencias en las mediciones de biomarcadores en la muestra del sujeto en comparación con el valor de referencia. En realizaciones ejemplares, el valor de referencia se proporciona por una categoría de riesgo como se describe adicionalmente posteriormente.

55 El valor de referencia puede ser un valor de línea basal. Un valor de línea basal es una muestra compuesta de una cantidad eficaz de biomarcadores de uno o más sujetos que no tienen una enfermedad, que son asintomáticos para una enfermedad o que tienen un cierto nivel de una enfermedad. Un valor de línea basal también puede comprender las cantidades de biomarcadores en una muestra derivada de un sujeto que ha mostrado una mejora en factores de riesgo de una enfermedad como resultado de tratamientos o terapias. En estas realizaciones, para realizar comparaciones con la muestra derivada de sujeto, las cantidades de biomarcadores se calculan de forma similar. Un valor de referencia también puede comprender las cantidades de biomarcadores derivados de sujetos que tienen una enfermedad confirmada por una técnica invasiva o no invasiva, o están en alto riesgo de desarrollar una enfermedad. Opcionalmente, los sujetos que se ha identificado que tienen una enfermedad, o que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad se seleccionan para recibir un régimen terapéutico para ralentizar la progresión de una enfermedad, o reducir o prevenir el riesgo de desarrollar una enfermedad. Se considera que una

5 enfermedad es progresiva (o, como alternativa, el tratamiento no evita la progresión) si la cantidad de biomarcador cambia a lo largo del tiempo en relación con el valor de referencia, mientras que una enfermedad no es progresiva si la cantidad de biomarcadores permanece constante a lo largo del tiempo (en relación con la población de referencia o “constante” como se usa en el presente documento). Se interpreta que el término “constante” como se usa en el contexto de la presente invención incluye cambios a lo largo del tiempo con respecto al valor de referencia.

10 Los biomarcadores de la presente divulgación pueden usarse para generar un “perfil” de biomarcador de referencia” de los sujetos que no tienen una enfermedad de acuerdo con un cierto umbral, no están en riesgo de tener una enfermedad o no se esperaría que desarrollaran una enfermedad. Los biomarcadores desvelados en el presente documento también pueden usarse para generar un “perfil de biomarcador del sujeto” tomado de sujetos que tienen una enfermedad o están en riesgo de tener una enfermedad. Los perfiles de biomarcadores del sujeto pueden compararse con un perfil de biomarcadores de referencia para diagnosticar o identificar sujetos en riesgo de desarrollar una enfermedad, para controlar la progresión de la enfermedad, así como la velocidad de progresión de la enfermedad y para controlar la eficacia de las modalidades de tratamiento de la enfermedad. Los perfiles de biomarcadores del sujeto y de referencia de la presente invención pueden estar contenidos en medio leíble por máquinas, tal como, pero sin limitación, cintas análogas como las leíbles por un vídeo; medios ópticos tales como CD-ROM, DVD-ROM y similares; y memoria de estado sólido, entre otras.

20 Las mediciones de los paneles de biomarcadores de la divulgación pueden conducir a que un practicante efectúe una terapia con respecto a un sujeto. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad en un sujeto que comprenden tomar una medición de un panel de biomarcadores en una muestra del sujeto, y efectuar una terapia con respecto al sujeto. Los términos “terapia” y “tratamiento” pueden usarse de forma intercambiable. En ciertas realizaciones, la terapia puede seleccionarse de, sin limitación, inicio de terapia, continuación de terapia, modificación de terapia o finalización de terapia. Una terapia también incluye cualquier medida profiláctica que pueda tomarse para prevenir la enfermedad.

30 La terapia puede comprender administrar un fármaco modulador de enfermedad a un sujeto. El fármaco puede ser un producto terapéutico o profiláctico usado en sujetos a los que se ha diagnosticado o identificado con una enfermedad o en riesgo de tener la enfermedad. En ciertas realizaciones, modificar la terapia se refiere a alterar la duración, frecuencia o intensidad de la terapia, por ejemplo, alterar los niveles de dosificación.

35 Efectuar una terapia puede comprender hacer que un sujeto realice, o comunicar a un sujeto la necesidad de realizar, un cambio en su estilo de vida, por ejemplo, aumentar el ejercicio, cambiar la dieta, reducir o eliminar el tabaco y así sucesivamente. La terapia también puede incluir cirugía, por ejemplo, cirugía bariátrica.

40 La medición de los niveles de biomarcadores permite que se controle el transcurso de tratamiento de una enfermedad. La eficacia de un régimen de tratamiento para una enfermedad puede controlarse detectando uno o más biomarcadores en una cantidad eficaz de muestras obtenidas de un sujeto a lo largo del tiempo y comparando la cantidad de biomarcadores detectados. Por ejemplo, puede obtenerse una primera muestra antes de que el sujeto reciba el tratamiento y se toman una o más muestras posteriores después o durante el tratamiento del sujeto. Los cambios en los niveles de biomarcador entre las muestras pueden proporcionar un indicio de la eficacia de la terapia.

45 Para identificar productos terapéuticos o fármacos que sean apropiados para un sujeto específico, también puede exponerse una muestra de ensayo del sujeto a un agente terapéutico o un fármaco, y puede determinarse el nivel de uno o más biomarcadores. Los niveles de biomarcadores pueden compararse con una muestra derivada del sujeto antes y después del tratamiento o exposición a un agente terapéutico o un fármaco, o pueden compararse con muestras derivadas de uno o más sujetos que han mostrado mejoras en relación con una enfermedad como resultado de dicho tratamiento o exposición. Por lo tanto, es un aspecto, la invención proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia con respecto a un sujeto que comprende tomar una primera medición de un panel de biomarcadores en una primera muestra del sujeto; efectuar la terapia con respecto al sujeto; tomar una segunda medición del panel de biomarcadores en una segunda muestra del sujeto y comparar la primera y segunda mediciones para evaluar la eficacia de la terapia.

55 Adicionalmente, pueden identificarse agentes terapéuticos o profilácticos adecuados para su administración a un sujeto particular detectando un biomarcador (que puede ser dos o más) en una cantidad eficaz de una muestra obtenida de un sujeto y exponiendo la muestra derivada del sujeto a un compuesto de ensayo que determina la cantidad del biomarcador o los biomarcadores en la muestra derivada del sujeto. En consecuencia, los tratamientos o regímenes terapéuticos para su uso en sujetos que tengan una enfermedad o sujetos en riesgo de desarrollar una enfermedad pueden seleccionarse basándose en las cantidades de biomarcadores en muestras obtenidas de los sujetos y comparadas con un valor de referencia. Pueden evaluarse dos o más tratamientos o regímenes terapéuticos en paralelo para determinar qué tratamiento o régimen terapéutico sería el más eficaz para su uso en un sujeto para retardar la aparición, o progresión lenta de una enfermedad. En diversas realizaciones, se realiza una recomendación sobre si iniciar o continuar el tratamiento de una enfermedad.

65

Tratamientos farmacológicos

5 Efectuar una terapia puede comprender administrar un fármaco modulador de enfermedad al sujeto. El sujeto puede tratarse con uno o más fármacos moduladores de enfermedad hasta que los niveles alterados de los biomarcadores medidos vuelvan a un valor de línea basal medido en una población que no padece la enfermedad, que experimenta un estadio o una forma menos grave de una enfermedad o que muestra mejoras en los biomarcadores de enfermedad como resultado del tratamiento con un fármaco modulador de enfermedad. Adicionalmente, las mejoras en relación con un nivel cambiado de un biomarcador o parámetro clínico pueden ser el resultado del tratamiento con un fármaco modulador de enfermedad y pueden incluir, por ejemplo, una reducción del índice de masa corporal (IMC), una reducción de los niveles de colesterol totales, una reducción de los niveles de LDL, un aumento de los niveles de HDL, una reducción de la presión sanguínea sistólica y/o diastólica, o combinaciones de los mismos.

15 Pueden usarse varios compuestos tales como un fármaco modulador de enfermedad para tratar a un sujeto y para controlar el progreso usando los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, el fármaco modulador de enfermedad comprende un fármaco antiobesidad, un bloqueador β , un inhibidor de enzima convertora de angiotensina (ACE), un diurético, un bloqueador de canal de calcio, un bloqueador de receptor de angiotensina II, un agente antiplaquetario, un agente anticoagulante, una sulfonilurea (SU), una biguanida, una insulina, una glitazona (tiazolidinediona (TZD)), un nitrato, un agente antiinflamatorio no esteroideo, una estatina, cilostazol, pentoxifilina, buflomedil o nafdifurilo. Además, pueden administrarse todas y cada una de las combinaciones de estos fármacos.

25 Los efectos beneficiosos de estos y otros fármacos pueden visualizarse mediante evaluación de los biomarcadores clínicos y de laboratorio. Por ejemplo, los resultados de PROactive (Pfützner *et al.*, Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2006, 4: 445-459) y recientes meta-análisis han mostrado que estos cambios sustitutos pueden traducirse en reducción eficaz del riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2.

30 Puede administrarse una glitazona (también denominada tiazolidinediona (TZD)) a un sujeto para tratar una enfermedad. Las glitazonas forman una clase de fármacos que se han usado para tratar sujetos con diabetes mellitus (tipo 2) y enfermedades relacionadas. Las glitazonas actúan uniéndose a PPAR (receptores activados por proliferador de peroxisoma), un grupo de moléculas receptoras dentro del núcleo celular, específicamente PPAR γ (gamma). Los ligandos normales para estos receptores son ácidos grasos libres (FFA) y eicosanoides. Cuando se activa, el receptor migra al ADN, activando la transcripción de varios genes específicos.

35 Los ejemplos de glitazonas que pueden ser útiles incluyen, pero sin limitación, rosiglitazona (Avandia™), pioglitazona (Actos™) y troglitazona (Rezulin™). Se ha mostrado que las glitazonas u otros fármacos administrados para tratar a un sujeto afectan a niveles de diversos biomarcadores. En diversas realizaciones ejemplares, se administra pioglitazona a un sujeto.

40 Además, también puede administrarse una glitazona tal como pioglitazona con otros fármacos. En diversas realizaciones, la pioglitazona se administra con una estatina, incluyendo pero sin limitación simvastatina. En diversas realizaciones, puede administrarse pioglitazona con otra glitazona, tal como rosiglitazona. En diversas realizaciones, puede administrarse pioglitazona con un fármaco antidiabético oral, incluyendo pero sin limitación una sulfonilurea (tal como glimepirida) o una biguanida (tal como metformina).

45 Puede administrarse un análogo de péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1) a un sujeto para tratar una enfermedad. Los ejemplos de análogos de GLP-1 incluyen pero sin limitación exenatida y liraglutida.

50 Puede administrarse un inhibidor de dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) a un sujeto para tratar una enfermedad. Los ejemplos de inhibidores de DPPIV incluyen pero sin limitación sitagliptina, vildagliptina y saxagliptina.

Puede administrarse metformina a un sujeto para tratar una enfermedad.

55 Puede administrarse una glinida a un sujeto para tratar una enfermedad. Los ejemplos de glinidas incluyen pero sin limitación repaglinida y nateglinida.

Puede administrarse una sulfonilurea a un sujeto para tratar una enfermedad. Los ejemplos de sulfonilurea incluyen pero sin limitación gliclazida y glimepirida.

60 Puede administrarse un inhibidor de α -glucosidasa a un sujeto para tratar una enfermedad. Un ejemplo de un inhibidor de α -glucosidasa es acarbosa.

65 Puede administrarse una insulina a un sujeto para tratar una enfermedad. El término "insulina" por sí solo se refiere a cualquier forma de origen natural de insulina así como cualquier derivado y análogo de la misma. Diferentes tipos de insulina pueden variar en el comienzo, aparición del máximo y duración de sus efectos. Los ejemplos de insulina que pueden ser útiles en la presente invención incluyen pero sin limitación insulina humana regular, insulina humana regular de acción intermedia (por ejemplo, insulina humana NPH), insulina retardada con Zn, análogo de insulina de

acción corta y análogo de insulina de acción larga. Los ejemplos de insulina retardada con Zn incluyen pero sin limitación lenta y ultralenta. Los ejemplos de análogos de insulina de acción corta incluyen pero sin limitación lispro, asparta y glilisina. Los ejemplos de análogos de insulina de acción larga incluyen pero sin limitación glargina y levemir.

5 Puede administrarse cualquier fármaco o combinación de fármacos desvelado en el presente documento a un sujeto para tratar una enfermedad. Los fármacos en el presente documento pueden formularse de varias formas, con frecuencia según diversas formulaciones conocidas en la técnica o como se desvela o referencia en el presente documento.

10 Puede administrarse a un sujeto una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1 y una insulina. En diversas realizaciones ejemplares, se administra a un sujeto una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPPIV. En diversas realizaciones ejemplares, se administra a un sujeto metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPPIV y una insulina. En diversas realizaciones ejemplares, se administra a un sujeto metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un inhibidor de DPPIV y una insulina.

20 Puede administrarse a un sujeto un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1 y una insulina. En diversas realizaciones, se administra a un sujeto un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPPIV. En diversas realizaciones, se administra a un sujeto un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de metformina, una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPPIV y una insulina. En diversas realizaciones, se administra a un sujeto un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de metformina, una glitazona, un inhibidor de DPPIV y una insulina.

30 Opcionalmente no se administra cualquier fármaco o combinación de fármacos desvelados en el presente documento a un sujeto para tratar una enfermedad. En estos casos, el practicante puede no administrar el fármaco o combinación de fármacos, puede recomendar que el sujeto no se administre fármaco o combinación de fármacos o puede evitar que el sujeto se administre en fármaco o combinación de fármacos.

35 En diversos casos ejemplares, no se administra una glinida a un sujeto. En diversos casos ejemplares, no se administra una sulfonilurea a un sujeto. En diversos casos ejemplares, no se administra un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glinida y una sulfonilurea a un sujeto.

40 En diversos casos, pueden administrarse opcionalmente uno o más fármacos adicionales además de los que se recomiendan o se han administrado. Un fármaco adicional típicamente no será ningún fármaco que no se recomiende o que debiera evitarse. En realizaciones ejemplares, uno o más fármacos adicionales comprenden uno o más fármacos reductores de glucosa.

45 Uno o más fármacos adicionales pueden comprender uno o más fármacos reductores de glucosa. En diversos casos, uno o más fármacos adicionales comprenden uno o más fármacos reductores de glucosa que comprenden un fármaco o combinación de fármacos seleccionado de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPPIV, metformina, una glinida, una sulfonilurea, un inhibidor de α -glucosidasa y una insulina. En diversos casos, la insulina se selecciona de una insulina humana regular, una insulina humana regular de acción intermedia, una insulina retardada con Zn, un análogo de insulina de acción corta y un análogo de insulina de acción larga. En casos ejemplares, uno o más fármacos adicionales comprenden uno o más fármacos reductores de glucosa excluyendo un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea, una glinida y una insulina humana regular.

50 Uno o más fármacos reductores de glucosa pueden comprender un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un inhibidor de DPPIV, metformina y un inhibidor de α -glucosidasa. En casos ejemplares, uno o más fármacos reductores de glucosa comprenden un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de metformina y un inhibidor de α -glucosidasa. En casos ejemplares, un fármaco reductor de glucosa es un inhibidor de α -glucosidasa. En casos ejemplares, uno o más fármacos reductores de glucosa comprenden un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una glinida, una sulfonilurea y un inhibidor de α -glucosidasa.

60 Pueden combinarse uno o más fármacos con uno o más regímenes de tratamiento tales como dieta, ejercicio y así sucesivamente.

65 El concepto de una terapia orientada a patofisiología de diabetes de tipo 2 con tratamiento de resistencia a insulina eficaz muestra efectos antiinflamatorios y antitrombóticos beneficiosos y debería preferirse claramente a medidas de "cosméticos de glucosa". Los paneles de marcadores que describen resistencia a insulina, disfunción de células β , adipogénesis y aterosclerosis pueden ser más predictivos y significativos que HbA1c.

Una combinación de agentes protectores de células β (por ejemplo, una insulina, un inhibidor de DPPIV, un análogo de GLP-1) podría convertir la diabetes de tipo 2 en una enfermedad no progresiva. La Tabla 5 muestra el efecto de varios compuestos en los niveles de los biomarcadores adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta. Una flecha hacia arriba indica un aumento en los niveles de biomarcadores, una flecha hacia abajo indica una reducción y "O" indica sustancialmente sin cambios. Por lo tanto, en una realización, se administra a un sujeto una sulfonilurea, una glinida, metformina, un inhibidor de DPPIV, un análogo de GLP-1, una glitazona o una insulina o combinaciones de las mismas para el tratamiento de cardiometabolismo.

TABLA 6

	hsCRP	proinsulina intacta	adiponectina
Sulfonilurea	↑	↑	↓
Glinidas	↑	↑	↓
Metformina	O	↓	↑
Inhibidor de DPPIV	O	↓	O
Análogo de GLP-1	O	↓	O
TZD	↓	↓	↑
Insulina	O	↓	O

Matrices de decisión

La terapia elegida por un practicante puede depender de las concentraciones de biomarcadores determinadas en una muestra. En diversas realizaciones ejemplares, la terapia depende de en qué categoría de una serie de categorías particulares para cada biomarcador quede la concentración medida de cada biomarcador. En diversas realizaciones ejemplares, la terapia depende de la combinación de niveles de riesgo para diferentes síntomas o enfermedades que se indican por un panel de biomarcadores.

Con respecto a las mediciones de concentración de un biomarcador, el término "categoría" se refiere a un subconjunto de una partición de las posibles concentraciones que puede tener un biomarcador. Cada categoría puede estar asociada con una etiqueta o clasificación elegida por el practicante. Las etiquetas pueden referirse a, por ejemplo, el nivel de riesgo de un individuo para tener o ser objeto de una patología. Las categorías y etiquetas pueden derivar de la bibliografía actual o de acuerdo con los hallazgos del practicante. Por ejemplo, se sabe en la técnica que un individuo con una concentración en suero de adiponectina que es mayor de 10 mg/l tiene un bajo riesgo de arteriosclerosis y resistencia a insulina, mientras que un individuo con una concentración en suero de 7-10 mg/l tiene un riesgo medio para estos trastornos. Una concentración de adiponectina de más de 10 mg/l puede por lo tanto etiquetarse como una concentración "de bajo riesgo" y la de 7-10 mg/l, una concentración de "riesgo medio" o "riesgo moderado". La Tabla 2A muestra que las concentraciones de adiponectina pueden dividirse en tres categorías para los fines de los métodos descritos en el presente documento. El número de categorías y los límites que las dividen pueden variar. Por ejemplo, la Tabla 2B muestra una categorización alternativa para adiponectina. El número de categorías y los límites que las dividen para cualquier biomarcador no se limitan a los desvelados específicamente en el presente documento y pueden encontrarse en la técnica.

Cada biomarcador de un panel de biomarcadores puede por lo tanto asociarse con un conjunto discreto de categorías, por ejemplo, categorías de riesgo. La combinación de una categoría de cada biomarcador forma un "punto de decisión". En diversas realizaciones ejemplares, el conjunto completo de puntos de decisión comprende todas las n -tuplas posibles de categorías, donde n es el número de biomarcadores en el panel de biomarcadores. Este conjunto completo tendrá $m_1 \times m_2 \times \dots \times m_n$ puntos de decisión posibles, donde m_i es el número de categorías para el biomarcador i .

Cada punto de decisión puede asociarse con una afección o una patología, que no es necesariamente única. Es decir, pueden asociarse uno o más puntos de decisión con la misma patología. La asociación de cada punto de decisión posible con una afección o patología puede denominarse "matriz de clasificación de enfermedad" o un "árbol de clasificación de enfermedad". Por lo tanto, correlacionando una medición de un panel de biomarcadores con un punto de decisión, el practicante puede clasificar la afección o patología de un paciente.

Cada punto de decisión también puede asociarse con una terapia particular, que no es necesariamente única. Es decir, uno o más puntos de decisión pueden asociarse con la misma terapia. La asociación de cada posible punto de decisión con una o más terapias puede denominarse "matriz de decisión de terapia" o "árbol de decisión de terapia".

Cada punto de decisión puede asociarse con más de un tipo de información. Por ejemplo, tanto la patología como la terapia pueden indicarse por un punto de decisión.

En diversas realizaciones ejemplares, el panel de biomarcadores consiste en adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta. En diversas realizaciones ejemplares, las posibles concentraciones de adiponectina en una muestra se

dividen en 3 categorías de riesgo. En diversas realizaciones ejemplares, las posibles concentraciones de hsCRP en una muestra se dividen en 3 categorías de riesgo. En diversas realizaciones ejemplares, las posibles concentraciones de proinsulina intacta en una muestra se dividen en 2 categorías de riesgo. En diversas realizaciones ejemplares, la matriz de decisión de terapia consiste en 18 puntos de decisión, cada uno asociado con una terapia que puede o no ser única entre el conjunto de todas las terapias.

Las categorías de riesgo para adiponectina se proporcionan por la Tabla 2A. Las categorías de riesgo para hsCRP se proporcionan por la Tabla 3. Las categorías de riesgo para proinsulina intacta se proporcionan por la Tabla 4.

En diversas realizaciones ejemplares, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta en una muestra respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y alto; (b) alto, medio y alto; (c) medio, alto y alto; (d) bajo, alto y alto; (e) bajo, medio y alto; y (f) bajo, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1 y una insulina. En diversas realizaciones ejemplares, la terapia no comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa que comprenden un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un inhibidor de DDPIV, metformina y un inhibidor de α -glucosidasa.

En diversas realizaciones ejemplares, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta en una muestra respectivamente se selecciona de (a) alto, bajo y alto; (b) medio, medio y alto; y (c) medio, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPPIV. En diversas realizaciones ejemplares, la terapia no comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa que comprenden un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de metformina y un inhibidor de α -glucosidasa.

En diversas realizaciones ejemplares, si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta en una muestra respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y bajo; (b) medio, alto y bajo; (c) bajo, alto y bajo; (d) bajo, medio y bajo; y (e) bajo, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DDPIV y una insulina. En diversas realizaciones ejemplares, la terapia no comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar un fármaco reductor de glucosa que comprende un inhibidor de α -glucosidasa.

En diversas realizaciones ejemplares, cuando la concentración de adiponectina en una muestra de un sujeto es si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta en una muestra respectivamente se selecciona de (a) alto, medio y bajo; (b) alto, bajo y bajo; (c) medio, medio y bajo; y (d) medio, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un inhibidor de DPPIV y una insulina. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa. En diversas realizaciones ejemplares, opcionalmente la terapia comprende administrar uno o más fármacos reductores de glucosa que comprenden un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una glinida, una sulfonilurea y un inhibidor de α -glucosidasa.

Los artículos “un” y “el” como se usan en el presente documento no excluyen un número plural del referente, a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. La conjunción “o” no es mutuamente exclusiva, a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. El término “incluir” se usa para referirse a ejemplos no limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar cardiometabolismo en un sujeto normoglicémico o de determinar si el sujeto se beneficiaría de una terapia, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de un sujeto normoglicémico con una composición que comprende un soporte sólido que comprende: (i) un ligando de unión de captura selectivo para adiponectina, (ii) un ligando de unión de captura selectivo para hsCRP y (iii) un ligando de unión de captura selectivo para proinsulina intacta; y medir las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1 donde la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1 y una insulina, y donde el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y alto; (b) alto, medio y alto; (c) medio, alto y alto; (d) bajo, alto y alto; (e) bajo, medio y alto; y (f) bajo, bajo y alto, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.
3. El método de la reivindicación 1 donde la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPP-IV, y donde el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, bajo y alto; (b) medio, medio y alto; y (c) medio, bajo y alto, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.
4. El método de la reivindicación 1 donde la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPP-IV y una insulina, y donde el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y bajo; (b) medio, alto y bajo; (c) bajo, alto y bajo; (d) bajo, medio y bajo; y (e) bajo, bajo y bajo, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.
5. El método de la reivindicación 1 donde la terapia comprende administrar una metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un inhibidor de DPP-IV y una insulina, y donde el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, medio y bajo; (b) alto, bajo y bajo; (c) medio, medio y bajo; y (d) medio, bajo y bajo, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la terapia no comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde la terapia comprende además administrar uno o más fármacos reductores de glucosa adicionales.
8. Uso de una composición para determinar cardiometabolismo en un sujeto normoglicémico, comprendiendo la composición un soporte sólido que comprende: (a) un ligando de unión de captura selectivo para adiponectina, (b) un ligando de unión de captura selectivo para hsCRP y (c) un ligando de unión de captura selectivo para proinsulina intacta, siempre que el uso no sea un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.
9. El uso de la reivindicación 8 que comprende poner en contacto la composición con la muestra del sujeto y medir las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y alto; (b) alto, medio y alto; (c) medio, alto y alto; (d) bajo, alto y alto; (e) bajo, medio y alto; y (f) bajo, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar una glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1 y una insulina, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica

un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.

5 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, bajo y alto; (b) medio, medio y alto; y (c) medio, bajo y alto, entonces la terapia comprende administrar glitazona y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de un análogo de GLP-1, una insulina y un inhibidor de DPPIV, donde una
10 concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.

15 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, alto y bajo; (b) medio, alto y bajo; (c) bajo, alto y bajo; (d) bajo, medio y bajo; y (e) bajo, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un análogo de GLP-1, un inhibidor de DPPIV y una insulina, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-
20 10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.

25 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde si el nivel de riesgo asociado con cada una de las concentraciones de adiponectina, hsCRP y proinsulina intacta respectivamente se selecciona de (a) alto, medio y bajo; (b) alto, bajo y bajo; (c) medio, medio y bajo; y (d) medio, bajo y bajo, entonces la terapia comprende administrar metformina y un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una glitazona, un inhibidor de DPPIV y una insulina, donde una concentración de adiponectina de >10 mg/l, 7-10 mg/l y <7 mg/l indica un nivel de
30 riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para adiponectina; una concentración de hsCRP de 0-1 mg/l, >1-3 mg/l y >3-10 mg/l indica un nivel de riesgo bajo, medio y alto, respectivamente, para hsCRP; y una concentración de proinsulina intacta de ≤ 11 pmoles/l y >11 pmoles/l indica un nivel de riesgo bajo y alto, respectivamente, para proinsulina intacta.

35 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12 donde la terapia comprende no administrar un fármaco o combinación de fármacos seleccionados de una sulfonilurea y una glinida.

40 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-14 donde la terapia comprende además administrar uno o más fármacos reductores de glucosa adicionales.

45 16. Una composición para determinar cardiometabolismo en un sujeto normoglicémico, comprendiendo la composición un soporte sólido que comprende ligandos de captura, donde dichos ligandos de captura consisten en:

- (a) un ligando de unión de captura selectivo para adiponectina,
- (b) un ligando de unión de captura selectivo para hsCRP y
- (c) un ligando de unión de captura selectivo para proinsulina intacta.

17. La composición de la reivindicación 16 donde uno de los ligandos de unión de captura comprende un anticuerpo.

50 18. La composición de la reivindicación 16 o 17 donde la composición comprende además:

- (a) un ligando de captura soluble selectivo para adiponectina,
- (b) un ligando de captura soluble selectivo para hsCRP, y
- (c) un ligando de captura soluble selectivo para proinsulina intacta.

55 19. La composición de la reivindicación 18 donde cada uno de los ligandos de captura solubles comprende un marcador detectable.

60 20. La composición de la reivindicación 19 donde un marcador detectable es un fluoróforo.

21. La composición de la reivindicación 19 donde un marcador detectable es una enzima conjugada.

22. La composición de la reivindicación 21 donde la enzima conjugada es peroxidasa de rábano rústicano.

65 23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 16-22 que comprende además un detector.

FIG. 1

	alto para adiponectina	medio para adiponectina	bajo para adiponectina
Alto riesgo para proinsulina	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
alto para hsCRP	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins/DPPiV No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
medio para hsCRP	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins/DPPiV No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
bajo para hsCRP	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins/DPPiV No: SU, Glin posible: todos los demás	Si: Gltt & GLP-1/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
Bajo riesgo para proinsulina	alto para adiponectina Si: Met&Gltt/GLP-1/ DPPiV/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	medio para adiponectina Si: Met&Gltt/GLP-1/ DPPiV/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás	bajo para adiponectina Si: Met&Gltt/GLP-1/ DPPiV/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
alto para hsCRP	Si: Met&Gltt/DPPiV/Ins posible: todas las clases	Si: Met&Gltt/DPPiV/Ins posible: todas las clases	Si: Met&Gltt/GLP-1/ DPPiV/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
medio para hsCRP	Si: Met&Gltt/DPPiV/Ins posible: todas las clases	Si: Met&Gltt/DPPiV/Ins posible: todas las clases	Si: Met&Gltt/GLP-1/ DPPiV/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
bajo para hsCRP	Si: Met&Gltt/DPPiV/Ins posible: todas las clases	Si: Met&Gltt/DPPiV/Ins posible: todas las clases	Si: Met&Gltt/GLP-1/ DPPiV/Ins No: SU, Glin posible: todos los demás
Leyenda			
Gltt:	Glitazona (Pioglitazona, Rosiglitazona)	Si:	terapia recomendada (si no hay contraindicaciones)
GLP-1	Análogo de GLP-1 (Exenatida, Liraglutida etc.)	no:	evitar, tiene impacto negativo
DPPiV	Inhibidor de DPPiV (Sitagliptina, Vildagliptina, Saxagliptina)	posible:	pueden añadirse fármacos si es necesario para reducción de glucosa
Metf	Metformina		
Glin	Glinidas (Repaglinida, Nateglinida)		
SU	Sulfonilurea (Gliclazida, Glimpirida, etc.)		
Acarb	Inhibidor de Alfa-Glucosidasa (Acarbosa)		
todas	todas las clases posibles para reducción de glucosa		
ins	todos los tipos de insulina		
RHI	insulina humana regular		
NPH	insulina humana regular de acción intermedia		
(U)L	insulina retardadas por Zn (lenta, Ultralenta)		
SIA	Análogo de insulina de acción corta (Lispro, Asparta, Glulisina)		
DB2/21232837.1	Análogo de insulina de acción larga (Glargina, levemir)		
LIA			