(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 645 688**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2009 PCT/EP2009/007923**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10049179**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 09744978 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2356463**

(54) Título: **Prohormona arginina-vasopresina como biomarcador predictivo de la diabetes**

(30) Prioridad:

31.10.2008 EP 08168096

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2017

(73) Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (50.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (50.0%)

(72) Inventor/es:

STRUCK, JOACHIM;
BERGMANN, ANDREAS;
MELANDER, OLLE;
NEWTON-CHEH, CHRISTOPHER y
WANG, THOMAS J.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Prohormona arginina-vasopresina como biomarcador predictivo de la diabetes

Ámbito de la presente invención

La presente invención pertenece al campo de los biomarcadores y ensayos pronosticadores. La solicitud se refiere en particular a la predicción de la diabetes y a la diagnosis del síndrome metabólico.

Antecedentes de la presente invención

La arginina-vasopresina (AVP), también conocida como hormona antidiurética (HAD), se produce en el hipotálamo y se libera desde la glándula neuropituitaria en condiciones de alta osmolalidad plasmática, bajo volumen plasmático y baja presión sanguínea. La AVP se une a tres receptores diferentes (V1aR, V1bR y V2R). El V1aR se expresa de forma general, mientras que el V1bR y el V2R se expresan de forma más específica en la glándula pituitaria y en los conductos colectores renales (Nature 1992:336-339 y FEBS Lett 1994:356:215-220). El efecto antidiurético de la AVP es mediado a través del V2R y el bloqueo farmacológico del V2R tiene efectos favorables en el tratamiento de la hiponatremia y del fallo cardíaco, mientras que los efectos protrombóticos y vasoconstrictores de la AVP – usados clínicamente en caso de trastornos de sangrado e hipotensión – son mediados principalmente a través del V1aR.

Además se ha sugerido que la acción de la AVP está vinculada a la modulación de la liberación de la HACT (V1bR) y a la estimulación de la glicogenólisis hepática (V1aR and stimulation of insulin and glucagon secretion [*V1aR y estimulación de la secreción de insulina y glucagón*] (V1aR) (Morel y otros, Nature 1992;356(6369):523-6; de Keyzer y otros, FEBS letters 1994;356(2-3):215-20; Ventura y otros, Journal of molecular endocrinology 1999;22(3):251-60).

Hay estudios previos en humanos y en modelos animales que han indicado una intervención del sistema AVP en la homeostasis de la glucosa, en la resistencia a la insulina y en la diabetes mellitus. En pacientes con una diabetes mellitus mal controlada y una osmolalidad elevada el nivel de AVP en el plasma es notablemente alto (Lolait y otros, Nature 1992;357(6376):336-9) y en sujetos sanos la infusión de AVP lleva a un aumento de los niveles de glucosa en la sangre (Schrier y otros, N Engl J Med 2006;355(20):2099-112). Los ratones carentes de V1aR muestran peor tolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y niveles altos de AVP (Gheorghiade y otros, Jama 2007;297(12): 1332-43; Federici y otros, Annals of medicine 2007;39(5):346-58), mientras que los ratones carentes de V1bR tienen el fenotipo opuesto de menor nivel plasmático de glucosa en ayunas y mayor sensibilidad a la insulina, respecto a ratones normales (Dunser y otros, Circulation 2003;107(18):2313-9).

El gen de la vasopresina codifica una proteína precursora (pre-pro-AVP) que contiene una secuencia señalizadora de 19 aminoácidos, arginina-vasopresina y dos proteínas asociadas, neurofisina II y un glicopéptido, copeptina. La copeptina es un producto biológicamente inactivo de la escisión del extremo C del precursor de la AVP y se produce en cantidades equimolares con la AVP. No obstante, al contrario que la AVP, la copeptina es estable, tiene una vida media larga, no está unida a plaquetas y por lo tanto se encuentra en el plasma a concentraciones mucho mayores que la AVP y ha sido propuesta como diana diagnóstica alternativa para evaluar la liberación de vasopresina (Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients [*el nivel de un péptido estable derivado del precursor de vasopresina es elevado en el suero de los pacientes de sepsis*]. Peptides. 2005 Dec;26(12):2500-4.).

Resumen de la presente invención

Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que hay una relación entre niveles relativamente elevados de la pro-hormona Arginina-Vasopresina (AVP) o de fragmentos de ella, en particular copeptina; y la presencia del síndrome metabólico y el riesgo de desarrollar diabetes. En este contexto la presente invención proporciona el uso de un ensayo sensible y preciso de Copeptina que incluye al menos un anticuerpo monoclonal.

Así, el tema de la descripción es un método *in vitro* para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para identificar un sujeto con mayor riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

a. preparar una muestra de dicho sujeto,
b. determinar el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella en dicha muestra,
c. usar dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella para predecir la probabilidad de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para inferir de él un riesgo de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en dicho sujeto.

Otro tema de la presente invención es el uso de un ensayo de copeptina sensible y preciso.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a un método para predecir el riesgo de que un sujeto desarrolle diabetes mellitus de tipo II o para identificar un sujeto que tenga mayor riesgo de contraer diabetes mellitus de tipo II, el cual comprende las siguientes etapas:

a. preparar una muestra de dicho sujeto,
b. determinar el nivel de copeptina en dicha muestra,
c. usar dicho nivel de copeptina para predecir la probabilidad de que el sujeto desarrolle diabetes mellitus de tipo II y/o síndrome metabólico, o para inferir de él un riesgo de que el sujeto desarrolle diabetes mellitus de tipo II, y compararlo con la mediana del nivel de copeptina en un conjunto de muestras predeterminadas de una población de sujetos aparentemente sanos.

Aquí "usar dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella para predecir la probabilidad de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para inferir de él un riesgo de que dicho sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en dicho sujeto" puede tener el significado de "relacionar dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella con el riesgo de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o con el diagnóstico del síndrome metabólico en dicho sujeto".

En una forma de ejecución preferida en todos los aspectos de la presente invención dicho sujeto es aparentemente sano.

Tal como usa aquí "aparentemente sano" se refiere a individuos que no sufren diabetes mellitus. En algunas formas de ejecución los sujetos aparentemente sanos padecen síndrome metabólico. El método de la presente invención se puede emplear para diagnosticar si un sujeto tiene síndrome metabólico o no.

Tal como usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un organismo vivo humano o no humano. Aquí, preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a un método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para identificar un sujeto que tenga mayor riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

a. preparar una muestra de dicho sujeto,
b. determinar el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella en dicha muestra,
c. usar dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella para predecir la probabilidad de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para inferir de él un riesgo de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en dicho sujeto.

Aquí, "usar dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella para predecir la probabilidad de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para inferir de él un riesgo de que el sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en dicho sujeto" puede tener el significado de "relacionar dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella con el riesgo del sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o con el diagnóstico del síndrome metabólico en dicho sujeto".

En una forma de ejecución preferida de todos los aspectos de la presente invención dicho sujeto es aparentemente sano.

Tal como se usa aquí, "aparentemente sano" se refiere a individuos que no sufren diabetes mellitus. En algunas formas de ejecución los sujetos aparentemente sanos padecen síndrome metabólico. El método de la presente invención se puede utilizar para diagnosticar si un sujeto tiene síndrome metabólico o no.

Tal como usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un organismo vivo humano o no humano. Aquí, preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Preferiblemente dicho sujeto no es diabético.

En una forma de ejecución muy particular los sujetos aparentemente sanos son individuos que no han tenido antes o no son conscientes de haber tenido un episodio cardiovascular o coronario o un fallo cardíaco, o que no padecen una enfermedad cardiovascular. Los episodios coronarios se definen como síndromes coronarios agudos fatales o no fatales, incluyendo infarto de miocardio o muerte debida a una enfermedad cardíaca isquémica. Los episodios cardiovasculares se definen como síndromes coronarios agudos fatales o no fatales, incluyendo infarto de miocardio,

apoplejía fatal o no fatal, o muerte debida a una enfermedad cardiovascular. Además, en una forma de ejecución muy particular los sujetos aparentemente sanos pueden no tener una enfermedad infecciosa aguda.

En otra forma de ejecución muy particular los sujetos aparentemente sanos pueden estar sufriendo una enfermedad cardiovascular y/o pueden haber tenido un episodio cardiovascular o coronario o un fallo cardíaco. En ciertas formas de ejecución pueden estar sufriendo una enfermedad infecciosa.

En una forma de ejecución el sujeto presenta glicemia alterada en ayunas (glucosa alterada en ayunas), es decir un nivel de glucosa en la sangre (glucosa sanguínea en ayunas (GSA) o azúcar sanguíneo en ayunas (ASA)) inferior a 6,1 pero superior a 5,4 mmol/l. Así, en una forma de ejecución especialmente preferida dicho sujeto no es diabético con un nivel de glucosa sanguínea en ayunas inferior a 6,1 pero superior a 5,4 mmol/l.

En otra forma de ejecución especialmente preferida dicho sujeto es uno sin glicemia alterada en ayunas. Así, en una forma de ejecución especialmente preferida dicho sujeto tiene un nivel de glucosa sanguínea en ayunas inferior a 5,4 mmol/l.

La de glucosa sanguínea en ayunas se mide al menos 8 horas después de la última ingestión de comida del sujeto, normalmente entre 8 y 10 horas después de la última ingestión de alimento.

Aquí los niveles de glucosa sanguínea (en ayunas) están expresados como niveles de glucosa en sangre entera. En general la glucosa se puede medir en sangre entera, en suero o en plasma, pero los valores de referencia dependen del tipo de muestra.

Aquí la determinación (o medición o detección) del nivel de la pro-hormona arginina vasopresina o de fragmentos de ella se lleva a cabo mediante un ensayo diagnóstico, tal como se explica más adelante.

Un fragmento preferido de la pro-hormona arginina vasopresina (pro-AVP) es la pro-AVP C-terminal (CT-pro-AVP o copeptina), es decir un péptido modificado postranslacionalmente (glicosilado) que cubre las posiciones 107-145 de aminoácidos de la pro-AVP (126-164 de la pre-pro-AVP).

En una forma de ejecución preferida el fragmento de la pro-hormona arginina vasopresina (pro-AVP) no es la AVP madura.

En una forma de ejecución del método especialmente preferida se determina el nivel de copeptina.

Tal como se ha indicado aquí en el contexto de las pro-hormonas y otros péptidos, el término “fragmento” se refiere a proteínas o péptidos más pequeños, derivados de proteínas o péptidos más grandes, que comprenden por tanto una secuencia parcial de la proteína o péptido de mayor tamaño. Dichos fragmentos pueden obtenerse a partir de las proteínas o péptidos más grandes por saponificación de uno más de sus enlaces peptídicos.

“Fragmentos” de pro-hormona arginina vasopresina (pro-AVP) se refiere preferiblemente a fragmentos cuya longitud es de al menos 6 aminoácidos, con mayor preferencia cuya longitud es de al menos 12 restos de aminoácidos. Tales fragmentos se pueden detectar mediante ensayos inmunológicos como los que aquí se describen.

En el contexto de la presente invención el término “nivel” en expresiones tales como “nivel de una pro-hormona” y otras similares se refiere a la cantidad de la entidad molecular mencionada en el respectivo contexto o, en el caso de enzimas, se puede referir a la actividad enzimática.

Los métodos según la presente invención son especialmente idóneos para predecir el riesgo de desarrollar diabetes de tipo II.

En una forma de ejecución, la predicción del riesgo que tiene el sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o la diagnosis del síndrome metabólico se pueden mejorar determinando adicionalmente y utilizando el nivel de al menos un parámetro de laboratorio u otro marcador sanguíneo o plasmático en ayunas seleccionado del grupo formado por glucosa, triglicéridos, colesterol HDL o subfracciones del mismo, colesterol LDL o subfracciones del mismo, cistatina C, insulina, PCR, péptidos natriuréticos de tipo A y B, así como sus precursores y fragmentos de ellos, incluyendo ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, GDF15, ST2, procalcitonina y fragmentos de ella, pro-adrenomedulina y fragmentos de ella, incluyendo ADM, PAMP, MR-proADM, CT-proADM, pro-endotelina-1 y fragmentos de ella, incluyendo CT-proET-1, NT-proET-1, endotelina-1 grande y endotelina-1.

En formas de ejecución particulares de la presente invención se determina adicionalmente al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo formado por edad, género, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensivo (TAH), índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, relación cintura-cadera, fumador habitual, herencia de diabetes y enfermedad cardiovascular (ECV) previa.

Según la Organización mundial de la salud (OMS) la diabetes es una enfermedad crónica que tiene lugar cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede usar efectivamente la insulina que produce, lo cual conlleva un incremento de la concentración de glucosa en la sangre (hiperglicemia). La diabetes de tipo 1 (conocida anteriormente como diabetes insulinodependiente o diabetes de inicio juvenil) se caracteriza por una falta de producción de insulina. La diabetes de tipo 2 (conocida anteriormente como diabetes no dependiente de insulina o diabetes de inicio adulto) está causada por el uso inefectivo de la insulina por parte del cuerpo. A menudo aparece como resultado del exceso de peso corporal y de la inactividad física.

La diabetes mellitus de tipo 2 o diabetes de tipo 2 es un trastorno metabólico que se caracteriza principalmente por resistencia a la insulina, deficiencia relativa de insulina e hiperglicemia. La definición de diabetes de la Organización mundial de la salud se refiere a una sola lectura elevada de glucosa, acompañada de síntomas, o bien a valores elevados en dos ocasiones: (i) glucosa plasmática en ayunas ≥ 7,0 mmol/l (126 mg/dl) o (ii) con un test de tolerancia a la glucosa (TTG), una glucosa plasmática ≥ 11,1 mmol/l (200 mg/dl) a las dos horas de la dosis oral. Un síntoma inicial corriente de la diabetes de tipo 2 es un ligero olor a fruta o verdura en el aliento, que es causado por la cetosis inducida por la falta de respuesta a la insulina y produce carencia de glucosa en el interior de las células. A menudo acompaña a unos niveles elevados de glucosa en sangre, que también son el resultado de la menor sensibilidad a la insulina.

El síndrome metabólico es una combinación de trastornos médicos que incrementa el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y diabetes. Afecta a un gran número de personas y la prevalencia aumenta con la edad. Algunos estudios calculan que la prevalencia en USA llega hasta el 25% de la población. El síndrome metabólico también es conocido como síndrome metabólico X, síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven y CHAOS (Australia). Es importante la identificación temprana de los sujetos con síndrome metabólico, para poder prevenir el desarrollo de diabetes y/o enfermedades cardiovasculares mediante intervenciones en el estilo de vida y tratamientos. La causa subyacente al síndrome metabólico continúa siendo un desafío para los expertos. Tanto la resistencia a la insulina como la obesidad central se consideran factores básicos. La genética, la inactividad física, el envejecimiento, un estado proinflamatorio y los cambios hormonales también pueden tener un efecto causal, aunque su papel depende del grupo étnico. Como consecuencia de la incertidumbre sobre la causa mecánica del síndrome metabólico ha habido mucha confusión acerca de su definición. La existencia de múltiples definiciones del síndrome metabólico ha causado confusión y ha dado lugar a muchos estudios y artículos de investigación que comparan los méritos de cada definición. Conforme al resumen ejecutivo del tercer informe del panel de expertos de The National Cholesterol Education Program (NCEP) sobre la detección, la evaluación y el tratamiento del colesterol sanguíneo alto en adultos (Panel III de tratamiento de adultos) (JAMA. 2001;285(19):2486-2497), el síndrome metabólico se define como la presencia de tres o más de los siguientes componentes: (1) circunferencia de la cintura ≥ 88 cm (35 pulgadas) en mujeres o ≥ 102 cm (40 pulgadas) en hombres, (2) PS ≥ 130/85 mm Hg o tratamiento de hipertensión, (3) triglicéridos en ayunas ≥ 150 mg/dl, (4) colesterol HDL ≤ 40 mg/dl en hombres o ≤ 50 mg/dl en mujeres, y (5) glucosa sanguínea en ayunas ≥ 110 mg/dl o tratamiento de diabetes. La International Diabetes Federation (http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf) ha presentado una definición más reciente, con algunas modificaciones. Como el objetivo de definir el síndrome metabólico es la identificación de los sujetos que tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes y/o enfermedades cardiovasculares, los factores de pronóstico relacionados independientemente con dicho riesgo se pueden asociar directamente al síndrome metabólico y en este sentido son diagnósticos de la presencia del síndrome metabólico. Por lo tanto un marcador independientemente predictivo de diabetes, tal como se demuestra para la copeptina en la presente invención, debe considerarse al mismo tiempo un marcador diagnóstico (junto con otros parámetros clínicos y de laboratorio diagnóstico) de la presencia del síndrome metabólico, e incluso puede anticiparse que en el futuro formará parte de la definición del síndrome metabólico.

Por lo tanto los niveles de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella determinados en muestras de sujetos se pueden utilizar conjuntamente con otros parámetros clínicos y de laboratorio para ayudar a definir el “síndrome metabólico” como un problema médico. En otras palabras, el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella se puede usar como parámetro adicional para mejorar la definición del síndrome metabólico en cuanto a criterios decisivos, ya que los criterios actuales arriba descritos no producen resultados satisfactorios en todos los casos.

La resistencia a la insulina (RI) es un estado en el cual una concentración determinada de insulina produce un efecto biológico menor que el esperado. La resistencia a la insulina también ha sido definida arbitrariamente como el requerimiento de 200 o más unidades de insulina diarias para conseguir el control glicémico y evitar la cetosis. Los elevados niveles plasmáticos de insulina y glucosa debidos a la resistencia a la insulina conducen frecuentemente al síndrome metabólico y a diabetes de tipo 2, incluyendo sus complicaciones. Los síntomas de RI pueden comprender fatiga, neblina cerebral, incapacidad de enfoque, bajo nivel de azúcar en sangre, hinchazón intestinal, somnolencia, ganancia de peso, acumulación de grasa, dificultad para perder peso, niveles superiores de triglicéridos en sangre y depresión.

La presente invención también se refiere a un método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para identificar un sujeto con un mayor riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto del modo anteriormente descrito, que consiste en usar el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella, solo o combinado con otros

parámetros clínicos y de laboratorio útiles para el pronóstico, con el fin de predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o de diagnosticar el síndrome metabólico mediante un método a escoger entre las siguientes alternativas:

- comparación con la mediana del nivel de la pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella en un conjunto de muestras predeterminadas de una población de sujetos aparentemente sanos,
- comparación con un cuantil del nivel de la pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella en un conjunto de muestras predeterminadas de una población de sujetos aparentemente sanos,
- cálculo basado en el análisis de riesgo proporcional de Cox o en cálculos de índice de riesgos tales como el INR (índice neto de reclasificación) o el IDI (índice de discriminación integrado).

En una forma de ejecución preferida se determina mediante un ensayo diagnóstico, preferiblemente mediante un ensayo inmunológico, el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina (AVP) o de fragmentos de ella con una longitud de al menos 12 aminoácidos. Se prefiere en particular la determinación del nivel de copeptina o de fragmentos de la misma con una longitud de al menos 12 aminoácidos.

La presente invención también puede implicar la comparación del nivel de un marcador para el sujeto (en este caso de pro-hormona arginina-vasopresina (AVP) o fragmentos de ella como la copeptina) con un valor predeterminado.
El valor predeterminado puede tener varias formas. Puede ser un solo valor límite, como por ejemplo una mediana o media o el percentil 75º, 90º, 95º o 99º de una población. Se puede establecer basándose en grupos comparativos, por ejemplo en un grupo definido cuyo riesgo sea el doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo en el cual la población analizada se divida por ejemplo en grupos iguales (o desiguales) tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio o un grupo de alto riesgo, o en cuartiles, correspondiendo el cuartil más bajo a los sujetos con el menor riesgo y el cuartil más alto a los sujetos con el mayor riesgo.

El valor predeterminado puede variar entre las poblaciones concretas seleccionadas, dependiendo de sus hábitos, etnicidad, genética, etc. Por ejemplo, una población aparentemente sana y no fumadora (sin ninguna enfermedad detectable, en particular sin diabetes mellitus) podría tener un intervalo “normal” de marcadores diferente del de una población fumadora o del de una población cuyos miembros tengan diabetes mellitus. Por consiguiente los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría a la cual pertenece un sujeto. Los especialistas usuales en la materia pueden elegir los intervalos y categorías convenientes sin más medios que la experimentación rutinaria.
Según una forma de ejecución específica del método de la presente invención, el uso de dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella comporta la comparación de dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella con un nivel umbral; cuando dicho nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella supera dicho nivel umbral se predice diabetes mellitus y/o síndrome metabólico en un sujeto o se identifica un sujeto con mayor riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico.

Otros valores umbral preferidos son, por ejemplo, el percentil 90º, 95º o 99º de una población normal. Al utilizar un percentil superior al percentil 75º se reduce el número de sujetos identificados como falsos positivos, pero se podrían dejar sin identificar sujetos con un riesgo moderado pero aun así incrementado. Por tanto el valor umbral se podría adoptar teniendo en cuenta si se considera más apropiado identificar la mayoría de sujetos en riesgo a expensas de identificar también “falsos positivos” o si se considera más conveniente identificar principalmente los sujetos de alto riesgo en detrimento de varios sujetos de riesgo moderado.

Otras posibilidades matemáticas de calcular el riesgo de un sujeto usando su valor de copeptina y otros parámetros clínicos y pronosticadores de laboratorio están basadas, por ejemplo, en el análisis de regresión de Cox o en el INR (índice neto de reclasificación) o en el IDI (índice de discriminación integrado). Los índices se pueden calcular según Pencina (Pencina MJ y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond [*Evaluación de la capacidad predictiva adicional de un nuevo marcador: desde el área bajo la curva CRO hasta la reclasificación y más allá*]. Stat Med. 2008;27:157-172).

Por ejemplo, un nivel de copeptina de 5,04 pmol/l (es decir, la mediana de la concentración de una población de referencia constituida por sujetos aparentemente sanos) o mayor, preferiblemente superior a 7,93 pmol/l (es decir, la concentración en el límite Q3/Q4 de una población de sujetos aparentemente sanos) en la muestra puede indicar un alto riesgo de que el paciente contraiga diabetes mellitus. Aquí Q1, Q2, Q3 y Q4 se refieren a los cuartiles de una población de referencia constituida por sujetos aparentemente sanos.

En otro aspecto particular, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

a. preparar una muestra de dicho sujeto,
b. determinar el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella en dicha muestra,
c. determinar otros parámetros clínicos y/o de laboratorio asociados a la diagnosis del síndrome metabólico,
d. correlacionar el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella, conjuntamente con otros parámetros clínicos y/o de laboratorio asociados a la diagnosis del síndrome metabólico.

También cae dentro del ámbito de la presente invención un ensayo para la determinación del nivel de copeptina en una muestra, a fin de predecir el riesgo que tiene un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o de diagnosticar el síndrome metabólico.

El ensayo tiene preferiblemente una imprecisión total del 20% de CV para una concentración inferior a 2,2 pmol/l y menor del 20% de CV para concentraciones superiores a esta, incluidas en un intervalo normal, y/o del 10% de CV para una concentración inferior a 9 pmol/l y menor del 10% de CV para concentraciones superiores a esta, incluidas en un intervalo normal.

En otra forma de ejecución preferida el ensayo tiene como máximo una imprecisión total del 12% a la concentración mediana de copeptina determinada en el suero o en el plasma de una población caucásica de mujeres sanas en ayunas y en reposo.

En una forma de ejecución preferida de los ensayos arriba descritos, el ensayo comprende dos anticuerpos anti-copeptina, de los cuales al menos uno es un anticuerpo monoclonal o un fragmento o una variante recombinante del mismo.

La presente invención también se refiere a un ensayo para la determinación del nivel de copeptina en una muestra, el cual incluye dos anticuerpos anti-copeptina, de los que al menos uno es un anticuerpo monoclonal o un fragmento o una variante recombinante del mismo.

El ensayo comprende preferiblemente un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal.

En otra forma de ejecución preferida de los ensayos de la presente invención, un anticuerpo monoclonal se une a un epítopo contenido en un péptido que representa las posiciones 132 - 147 de pre-pro-vasopresina.

Los niveles de los marcadores obtenidos mediante los métodos o los ensayos según la presente invención pueden analizarse de diversas maneras bien conocidas de un especialista en la materia. Por ejemplo, cada resultado de ensayo obtenido se puede comparar con un valor “normal” o con un valor indicativo de una enfermedad o resultado particular. Un diagnóstico/pronóstico concreto puede depender de la comparación de cada resultado de ensayo con dicho valor, el cual puede representar un “umbral” de referencia para el diagnóstico o pronóstico. En ciertas formas de ejecución los ensayos de uno o más indicadores de diagnóstico o pronóstico se relacionan con una condición o enfermedad por la mera presencia o ausencia del o de los indicadores en el ensayo. Por ejemplo, un ensayo puede diseñarse de tal manera que una señal positiva solo aparezca por encima de una concentración umbral concreta de interés y que por debajo de ella el ensayo no proporcione ninguna señal sobre el fondo.

La sensibilidad y especificidad de un ensayo de diagnosis y/o de pronóstico no depende solamente de la “calidad” del ensayo, también depende de la definición de qué es lo que constituye un resultado anormal. En la práctica las curvas características receptor-operador (curvas CRO) se calculan habitualmente representando el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones “normales” (es decir, aparentemente sanas) y “enfermas” (es decir, de pacientes que sufren diabetes, resistencia a la insulina y/o síndrome metabólico). Para cualquier marcador particular, una distribución de los niveles de marcador en sujetos con o sin enfermedad probablemente se solapará.

En tales condiciones un ensayo no distingue absolutamente entre sujetos normales y enfermos con un 100% de exactitud y el área de solapamiento indica donde el ensayo no puede distinguirlos. Se selecciona un valor umbral por encima del cual (o por debajo del cual, dependiendo de cómo un marcador cambia con la enfermedad) el ensayo se considera anormal y por debajo del cual se considera normal. El área por debajo de la curva CRO es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita la identificación correcta de un estado. Las curvas CRO pueden utilizarse aunque los resultados del ensayo no den necesariamente un número exacto. Siempre que sea posible ordenar los resultados se podrá crear una curva CRO. Por ejemplo, los resultados de un ensayo de muestras de “enfermedad” se podrían clasificar según el grado (p.ej. 1 = bajo, 2 = normal, y 3 = alto). Esta clasificación se puede correlacionar con los resultados de la población “normal” y con una curva CRO creada. Estos métodos son bien conocidos del estado técnico. Véase p.ej. Hanley y otros, Radiology 143: 29-36 (1982). Preferiblemente se elige un valor umbral de manera que el área de la curva CRO sea mayor que 0,5 aproximadamente, con mayor preferencia superior a 0,7 aproximadamente, con aún mayor preferencia superior a 0,8 aproximadamente, con incluso mayor preferencia superior a 0,85 aproximadamente y sobre todo superior a 0,9 aproximadamente. En este contexto el término “aproximadamente” se refiere a ± 5% de una determinada medición.

El eje horizontal de la curva CRO representa (1 – especificidad), que aumenta con la proporción de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la proporción de positivos verdaderos. Por lo tanto, para un valor umbral seleccionado en particular se puede determinar el valor de (1 – especificidad) y se puede obtener una correspondiente sensibilidad. El área por debajo de la curva CRO es una medición de la probabilidad de que el nivel de marcador medido permita identificar correctamente una enfermedad o condición. Por consiguiente el área por debajo de la curva CRO se puede usar para determinar la efectividad del ensayo.

En algunas formas de ejecución los valores umbral propios de uno o más marcadores de un panel no son fiables para determinar si un perfil de niveles de marcadores obtenidos de un sujeto son indicativos de un diagnóstico/ pronóstico concreto. La presente invención emplea más bien una evaluación del "perfil" de un panel de marcadores como un todo unitario. De hecho un patrón "único" y particular de cambios actúa en un panel de este tipo como un indicador específico de diagnosis o pronóstico. Como se ha referido aquí, este patrón de cambios se puede obtener de una sola muestra o de cambios temporales en uno o más componentes del panel (o de un valor de respuesta del panel). Panel se refiere aquí a una serie de marcadores.

Tal como se describe más adelante, un valor de respuesta del panel se determina preferiblemente representando las curvas CRO de sensibilidad de un panel particular de marcadores frente a 1-(especificidad) del panel para diversos valores umbral. En estos métodos se considera que un perfil de mediciones de marcadores de un sujeto proporciona en conjunto una probabilidad global (expresada como calificación numérica o riesgo porcentual) de un diagnóstico o pronóstico. En estas formas de ejecución un incremento en un determinado subconjunto de marcadores puede ser suficiente para indicar un diagnóstico/pronóstico particular de un paciente, mientras que un incremento en un distinto subconjunto de marcadores puede ser suficiente para indicar el mismo o un diagnóstico/pronóstico diferente en otro paciente. También pueden aplicarse factores de ponderación a uno o más marcadores de un panel; así por ejemplo, cuando un marcador es especialmente de gran utilidad para identificar un diagnóstico/pronóstico particular, se puede ponderar de forma que a un nivel determinado sea suficiente para señalar un resultado positivo. Asimismo un factor de ponderación puede poner de manifiesto que ningún nivel de un marcador particular sea suficiente para señalar un resultado positivo y en cambio solo indique un resultado cuando haya otro marcador que contribuya al análisis.

En algunas formas de ejecución los marcadores y/o los paneles de marcadores se eligen para mostrar al menos un 70% aproximadamente de sensibilidad, con preferencia al menos un 80% aproximadamente de sensibilidad, con mayor preferencia al menos un 85% aproximadamente de sensibilidad, con aun mayor preferencia al menos un 90% aproximadamente de sensibilidad y sobre todo al menos un 95% aproximadamente de sensibilidad, combinada con al menos un 70% aproximadamente de especificidad, preferiblemente con al menos un 80% aproximadamente de especificidad, aún más preferiblemente con al menos un 85% aproximadamente de especificidad, incluso todavía más preferiblemente con al menos un 90% aproximadamente de especificidad y sobre todo con al menos un 95% aproximadamente de especificidad. En este contexto el término "aproximadamente" se refiere a ± 5% de una medición determinada.

En otras formas de ejecución se emplea una tasa de probabilidad positiva, una tasa de probabilidad negativa, un índice de probabilidad o un índice de riesgo como medida de la capacidad de un ensayo para predecir el riesgo o diagnosticar una enfermedad. En el caso de una tasa de probabilidad positiva un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente posible entre los sujetos de los grupos tanto de "enfermos" como de "control", un valor mayor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de enfermos y un valor menor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En el caso de una tasa de probabilidad negativa un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente posible entre los sujetos de los grupos tanto de "enfermos" como de "control", un valor mayor que 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de ensayo y un valor menor que 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de control. En algunas formas de ejecución preferidas los marcadores y/o los paneles de marcadores se eligen preferiblemente para mostrar una tasa de probabilidad positiva o negativa de al menos 1,5 aproximadamente o más o de 0,67 aproximadamente o menos, con mayor preferencia de al menos 2 aproximadamente o más o de 0,5 aproximadamente o menos, con aún mayor preferencia de al menos 5 aproximadamente o más o de 0,2 aproximadamente o menos, con incluso mayor preferencia de al menos 10 aproximadamente o más o de 0,1 aproximadamente o menos y sobre todo de al menos 20 aproximadamente o más o de 0,05 aproximadamente o menos. En este contexto el término "aproximadamente" se refiere a ± 5% de una medición determinada.

En el caso de un índice de probabilidad un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente posible entre los sujetos de los grupos tanto de "enfermos" como de "control", un valor mayor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de enfermos y un valor menor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En algunas formas de ejecución preferidas los marcadores y/o los paneles de marcadores se seleccionan preferiblemente de manera que muestren un índice de probabilidad de al menos 2 aproximadamente o más o de 0,5 aproximadamente o menos, con mayor preferencia de al menos 3 aproximadamente o más o de 0,33 aproximadamente o menos, con todavía mayor preferencia de al menos 4 aproximadamente o más o de 0,25 aproximadamente o menos, con incluso mayor preferencia de al menos 5 aproximadamente o más o de 0,2 aproximadamente o menos y sobre todo de al menos 10 aproximadamente o más o de 0,1 aproximadamente o menos. En este contexto el término "aproximadamente" se refiere a ± 5% de una medición determinada.

En el caso de un índice de riesgo un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (p.ej. muerte) es igual tanto en el grupo de "enfermos" como en el de "control", un valor mayor que 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de enfermos y un valor menor que 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de control. En algunas formas de ejecución preferidas los marcadores y/o los paneles de marcadores se seleccionan preferiblemente de manera que muestren un riesgo de al menos 1,1 aproximadamente o más o de 0,91 aproximadamente o menos, con mayor preferencia de al menos 1,25 aproximadamente o más o de 0,8 aproximadamente o menos, con todavía mayor preferencia de al menos 1,5 aproximadamente o más o de 0,67 aproximadamente o menos, con incluso mayor

preferencia de al menos 2 aproximadamente o más o de 0,5 aproximadamente o menos y sobre todo de al menos 2,5 aproximadamente o más o de 0,4 aproximadamente o menos. En este contexto el término “aproximadamente” se refiere a ± 5% de una medición determinada.

El especialista entenderá que la asociación de un indicador diagnóstico o pronosticador a un riesgo de diagnóstico o pronóstico de un futuro resultado clínico es un análisis estadístico. Por ejemplo, un nivel de marcador superior a X puede indicar que un paciente tiene mayor probabilidad de sufrir un resultado adverso que los pacientes con un nivel inferior o igual a X, determinada por un nivel de significancia estadística. Además un cambio en la concentración del marcador a partir de los niveles de la línea base puede reflejar el pronóstico del paciente y el grado de variación del nivel del marcador se puede relacionar con la gravedad de los resultados adversos. La significancia estadística suele determinarse comparando dos o más poblaciones y calculando un intervalo de confianza y/o un valor p. Véase p.ej. Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos de la presente invención son 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% y 99.99%, mientras que los valores p preferidos son 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 y 0,0001.

En otras formas adicionales de ejecución se pueden hacer determinaciones múltiples de marcadores diagnósticos o pronosticadores y un cambio temporal en el marcador puede usarse para determinar un diagnóstico o un pronóstico. Por ejemplo, una concentración del marcador en una muestra de un sujeto se puede determinar en un momento inicial y luego en un segundo momento a partir de una segunda muestra del sujeto. En tales formas de ejecución un incremento del marcador entre el momento inicial y el segundo momento puede ser indicativo de un diagnóstico o de un pronóstico particular. Asimismo, una disminución del marcador entre el momento inicial y el segundo momento puede ser indicativa de un diagnóstico o de un pronóstico particular.

Tal como se usa aquí, el término “muestra” se refiere a una muestra de un fluido corporal obtenido para diagnosticar, pronosticar o evaluar un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de ensayo preferidas incluyen sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones pleurales. Igualmente un especialista en la materia entenderá que algunas muestras se analizarían más fácilmente después de un proceso de fraccionamiento o purificación, como por ejemplo la separación de la sangre entera en sus componentes de suero o plasma.

Así, en una forma de ejecución preferida de la presente invención la muestra se escoge del grupo constituido por muestras de sangre, de suero, de plasma, de fluido cerebroespinal, de saliva y de orina o un extracto de cualquiera de dichas muestras. La muestra es preferiblemente de sangre y con mayor preferencia de suero o de plasma.

Tal como se emplea aquí, el término “correlacionar” respecto al uso de marcadores diagnósticos y pronosticadores se refiere a comparar la presencia o cantidad del o de los marcadores en un paciente con su presencia o cantidad en personas conocidas por sufrir o tener riesgo de padecer una enfermedad determinada, o en personas conocidas por estar libres de una enfermedad determinada. Como se ha expuesto arriba, un nivel de marcador en una muestra de un paciente se puede comparar con un nivel conocido para relacionarlo con un diagnóstico específico. Se dice que el nivel de marcador en la muestra ha sido correlacionado con un diagnóstico; es decir, el especialista puede utilizar el nivel del marcador para determinar si el paciente sufre de un tipo específico de diagnosis y responder en consecuencia. Como alternativa, el nivel del marcador se puede comparar con un nivel de marcador conocido por estar asociado a un buen resultado (p.ej. ausencia de enfermedad, etc.). En formas de ejecución preferidas un perfil de niveles de marcadores se correlaciona con una probabilidad global de un resultado particular.

La presente invención también se refiere a un método para clasificar un paciente en grupos de riesgo, que consta de las etapas anteriormente descritas.

La presente invención también se refiere al uso de cualquiera de los ensayos arriba descritos para predecir el riesgo que tiene un sujeto de desarrollar diabetes mellitus de tipo II.

La presente invención se refiere además al uso de un ensayo inmunológico para un método de la presente invención en el cual se emplea al menos un anticuerpo anti-copeptina o un fragmento o variante recombinante del mismo para determinar el nivel de copeptina o de variantes moleculares de ella en una muestra. El anticuerpo anti-copeptina que se usa como mínimo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

El ensayo inmunológico es preferiblemente un ensayo de tipo sándwich y en él, además del primer anticuerpo anti-copeptina, se emplea un segundo anticuerpo anti-copeptina para determinar el nivel de copeptina o de variantes moleculares de la misma en una muestra. Al menos uno de dichos anticuerpos es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

También pertenece al ámbito de la presente invención el empleo *in vitro* de una sonda de captura dirigida contra la vasopresina o fragmentos de ella o sus precursores o fragmentos de ellos para predecir el riesgo de que un sujeto aparentemente sano contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto. Las sondas de captura están dirigidas preferiblemente contra uno o más epítopos localizados en las posiciones 126-164 de aminoácidos de la pre-pro-AVP.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento o variante recombinante del mismo que se une a un epítopo incluido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de la pre-pro-AVP.

Los fragmentos o variantes recombinantes de dicho anticuerpo monoclonal despliegan al menos un 80% de la afinidad de dicho anticuerpo monoclonal por la pre-pro-AVP. Los fragmentos o variantes recombinantes de dicho anticuerpo monoclonal muestran preferiblemente, al menos, un 80% de la afinidad de dicho anticuerpo monoclonal por el epítopo incluido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de la pre-pro-AVP, lo cual constituye un requisito previo para la presente invención, pues solo los fragmentos y variantes recombinantes antedichos son tan útiles como el anticuerpo monoclonal para facilitar un ensayo según la presente invención, que tiene una imprecisión total del 20% de CV a una concentración inferior a 2,2 pmol/l y menor del 20% de CV a concentraciones superiores a esta, incluidas en un intervalo normal, y/o del 10% de CV a una concentración inferior a 9 pmol/l y menor del 10% de CV a concentraciones superiores a esta, incluidas en un intervalo normal. Este ensayo es factible si al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal o un fragmento o variante recombinante del mismo que despliegue al menos un 80% de la afinidad de dicho anticuerpo monoclonal por el epítopo incluido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de la pre-pro-AVP.

La presente invención también se refiere al uso de una sonda de captura dirigida contra la vasopresina o fragmentos de ella para predecir el riesgo de que un sujeto contraiga diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o diagnosticar el síndrome metabólico. Las sondas de captura están dirigidas preferiblemente contra uno o más epítopos localizados en las posiciones 126-164 de aminoácidos de la pre-pro-vasopresina (pre-pro-AVP).

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los ensayos o métodos arriba descritos en una terapia profiláctica contra la diabetes mellitus, la resistencia a la insulina y/o el síndrome metabólico.

La secuencia de aminoácidos de la pre-pro-AVP está representada en SEQ ID NO:1 (figura 1). La secuencia de aminoácidos de la copeptina está representada en SEQ ID NO:2 (figura 2). La copeptina puede estar glicosilada. La pre-pro-AVP es el péptido precursor de la pro-hormona arginina-vasopresina (pro-AVP, SEQ ID NO:3, fig. 3) y de sus fragmentos (incluyendo arginina-vasopresina, neurofisina II y copeptina). Además de pro-AVP la pre-pro-AVP comprende una secuencia señalizadora N-terminal de 19 aminoácidos. A no ser que se indique lo contrario, todas las secuencias aquí descritas hacen referencia a la secuencia de la pre-pro-AVP.

Tal como se menciona aquí, un “ensayo” o “ensayo diagnóstico” puede ser de cualquier tipo empleado en el campo de la diagnosis. Dicho ensayo puede estar basado en la unión del analito que debe detectarse a una o más sondas de captura con cierta afinidad. En lo referente a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferiblemente mayor de 10^8 M^{-1}.

En el contexto de la presente invención las “moléculas de captura” son moléculas que se pueden utilizar para fijar moléculas diana o moléculas de interés, es decir analitos (o sea, en el contexto de la presente invención el péptido o los péptidos cardiovasculares) de una muestra. Por tanto las moléculas de captura deben tener la forma adecuada, tanto espacialmente como en cuanto a las características de su superficie, tales como carga superficial, hidrofobia, hidrofilia, presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para fijar específicamente las moléculas diana o moléculas de interés. En este caso, por ejemplo, la unión puede estar mediada por interacciones de tipo iónico, van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobas o enlaces de hidrógeno, o una combinación de dos o más dichas interacciones entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención las moléculas de captura se pueden elegir, por ejemplo, del grupo formado por una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de ARN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Las moléculas de captura son preferiblemente anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos con afinidad suficiente por una diana o molécula de interés y anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo recombinante, así como derivados modificados química y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos procedentes de la cadena variante con una longitud de al menos 12 de sus aminoácidos.

Los métodos de detección preferidos incluyen ensayos inmunológicos de varios formatos, tales como, por ejemplo, un radioinmunoensayo (RIE), ensayos inmunológicos quimioluminiscentes y fluorescentes, ensayos inmunológicos ligados a enzimas (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatriz proteica y formatos de ensayo rápido como, por ejemplo, pruebas con tiras inmunocromatográficas.

Los ensayos pueden ser homogéneos o heterogéneos, competitivos y no competitivos de tipo sándwich. En una forma de ejecución especialmente preferida el ensayo tiene el formato sándwich, que es un ensayo inmunológico no competitivo, donde la molécula que se debe detectar y/o cuantificar se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede estar unido a una fase sólida, como p.ej. una perla, la superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo va marcado, p.ej. con un colorante, con un radioisótopo o con una fracción reactiva o catalíticamente activa. Después se mide mediante un método apropiado la cantidad de anticuerpo marcado que está unida al analito. La composición general y los procedimientos usados en los “ensayos sándwich” están bien establecidos y son conocidos del especialista (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C y otros, Curr Opin Chem Biol. Feb. de 2006; 10(1):4-10. PMID: 16376134, incorporado aquí como referencia).

En una forma de ejecución especialmente preferida el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferiblemente dos anticuerpos que se encuentran en forma de dispersiones dentro de una mezcla reactiva líquida en la cual hay un primer componente marcador, unido a la primera molécula de captura, que forma parte de un sistema de marcaje basado en la extinción o amplificación fluorescente o quimioluminiscente, y un segundo componente marcador de dicho sistema de marcaje que se une a la segunda molécula de captura, de modo que al unirse ambas moléculas de captura al analito se genera una señal medible que permite detectar los complejos sándwich formados en la solución que contiene la muestra.

Con mayor preferencia dicho sistema de marcaje comprende criptatos o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante fluorescente o quimioluminiscente, en particular con un colorante de tipo cianina.

En el contexto de la presente invención los ensayos a base de fluorescencia comprenden el uso de colorantes que se pueden elegir, por ejemplo, del grupo formado por FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, también CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, CY7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxi-rodamina-6G (R6G5), 6-carboxi-rodamina-6G (RG6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina, rodamina 110, colorantes BODIPY tales como BODIPY TMR, verde Oregón, cumarinas como la umbeliferona, bencimidas como Hoechst 33258; fenantridinas tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina, etc.

En el contexto de la presente invención los ensayos a base de fluorescencia comprenden el uso de colorantes que están basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en la enciclopedia Kirk-Othmer de tecnología química, 4ª ed., director editorial, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-562, que se incorpora aquí como referencia, incluyendo las citaciones de las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son los ésteres de acridinio.

La forma de ejecución más preferida, en la cual el ensayo comprende un anticuerpo monoclonal y otro policlonal, se comparó con un ensayo que incluía dos anticuerpos policlonales. Para valorar comparativamente la precisión de ambos ensayos se determinó la imprecisión total del ensayo midiendo por duplicado 22 muestras de suero humano con varias concentraciones de copeptina. Estos datos fueron generados por 6 operadores diferentes en 12 ensayos, con 2 lotes distintos de reactivos, en 2 laboratorios diferentes. Las curvas de precisión resultantes se muestran en las figs. 4 y 5. Para el ensayo poli/poli se obtuvo un CV del 20% a 2,2 pmol/l y un CV del 10% a 9 pmol/l. En cambio para el ensayo mono/poli el CV del 20% se obtuvo a 0,75 pmol/l y el CV del 10% a 2,9 pmol/l.

Se ha referido que la mediana de concentraciones de copeptina en mujeres sanas en ayunas y en reposo es de 3,2 pmol/l (Bhandari SS, Loke I, Davies JE, Squire IB, Struck J, Ng LL. Gender and renal function influence plasma levels of copeptin in healthy individuals.Clin Sci [*Sexo e influencia de los niveles plasmáticos de copeptina en la función renal de individuos sanos*] (Lond). 2008 Jul 22. [Publicación electrónica anterior a la impresa]) y de 3,7 pmol/l (Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin [*Ensayo para la medición de la copeptina, un péptido estable derivado del precursor de la vasopresina*]. Clin Chem. 2006 Jan; 52(1):112-9.). En el presente análisis se halló que la imprecisión total del ensayo a 3,2 pmol/l era del 15% para el ensayo poli/poli y del 9,5% para el ensayo mono/poli. Por lo tanto el ensayo mono/poli es claramente mucho más adecuado para evaluar los niveles de copeptina en la población normal. A continuación se describen detalladamente ambos ensayos:

Ensayo 1 (poli/poli)

La determinación de copeptina en formato de quimioluminiscencia con tubo recubierto se llevó a cabo tal como se ha descrito (Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin [*Ensayo para la medición de la copeptina, un péptido estable derivado del precursor de la vasopresina*]. Clin Chem. 2006 Jan; 52(1):112-9.). Breve: los tubos se recubrieron con un anticuerpo policlonal de oveja purificado (2 µg/tubo) producido contra un péptido que representa las posiciones 132-147 de la pre-pro-vasopresina. Un anticuerpo policlonal de oveja purificado, producido contra un péptido que representa las posiciones 149-164 de la pre-pro-vasopresina, se marcó con MACN-acridinio-N-hidroxisuccinimida-éster y se empleó como trazador. Las diluciones de un péptido que representa las posiciones 132-164 de la pre-pro-vasopresina en suero normal de caballo sirvieron de patrones. El ensayo inmunológico se efectuó incubando durante 2 horas a la temperatura ambiente 50 µl de muestras/patrones y 200 µl de trazador en tubos recubiertos. Los tubos se lavaron 4 veces con 1 ml de solución de lavado LUMItest (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania) y se midió la quimioluminiscencia fijada con un luminómetro (Berthold, Bad Wildbach, Alemania).

Ensayo 2 (mono/poli)

Se desarrolló un anticuerpo monoclonal (294/1A7) que tiene un epítopo en copeptina localizado en las respectivas posiciones 132-147 de la pre-pro-vasopresina. El anticuerpo se desarrolló usando procedimientos estándar descritos (Harlow E, Lane D "Antibodies - A Laboratory Manual" 1988 by Cold Spring Harbor Laboratory, páginas 148 y sigtes.,

ISBN 0-87969-314-2). Breve: un péptido sintetizado químicamente que representa las posiciones 132-164 de la pre-pro-vasopresina, extendido con un resto adicional de cisteína en el extremo N-terminal, se acopló a ASB utilizando sulfo-MBS como reticulante. Con este conjugado se inmunopotenciaron ratones Balb/c. Se fusionaron células del bazo de los ratones inmunizados con una línea celular de mieloma SP2/0 y se seleccionaron células de hibridoma productoras de anti-copeptina por su capacidad de secretar anticuerpos que reconocen un péptido que cubre las posiciones 132-147 de la pre-pro-vasopresina. Se reclonaron las células de hibridoma seleccionadas positivamente y como resultado se obtuvieron varias líneas celulares de hibridoma, entre ellas una línea productora del anticuerpo monoclonal 294/1A7 que se usó después.

El anticuerpo monoclonal se usó para reemplazar el anticuerpo policlonal empleado sobre la fase sólida del ensayo poli/poli arriba descrito. Todos los demás componentes y la realización del ensayo no variaron respecto al ensayo poli/poli arriba descrito.

Los métodos y ensayos de la presente invención permiten determinar el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico. En otros casos se puede realizar un diagnóstico del síndrome metabólico de un sujeto, sobre todo en combinación con otros parámetros clínicos y/o de laboratorio. Los resultados de los métodos y ensayos de la presente invención permiten elegir un tratamiento adecuado o una estrategia de prevención para un sujeto. Los sujetos con mayor riesgo de contraer síndrome metabólico y/o diabetes mellitus son advertidos para que cambien su estilo de vida, p.ej. moderando su ingesta calórica diaria, modificando la composición de la dieta y/o aumentando la actividad física.

La correlación encontrada por los presentes inventores entre el nivel de pro-hormona arginina-vasopresina o de fragmentos de ella en las muestras de los sujetos y su riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico sugiere la intervención del sistema de vasopresina en la homeostasis de la glucosa y en el desarrollo de la diabetes.

El incremento de los niveles de vasopresina (y de su pro-hormona y fragmentos de la misma) están asociados con la diabetes mellitus y el síndrome metabólico. El efecto de la vasopresina puede ser mediado especialmente a través del receptor V1b (V1bR). Por consiguiente la presente invención también se refiere al tratamiento o prevención del síndrome metabólico y/o de la diabetes mellitus mediante la inhibición del receptor V1bR. La presente invención se refiere al uso de antagonistas de V1bR en el tratamiento y/o prevención del síndrome metabólico y/o de la diabetes mellitus. Los antagonistas de V1bR especialmente preferidos se pueden elegir del grupo constituido por anticuerpos y pequeñas moléculas. Los posibles antagonistas de V1bR se pueden identificar en ensayos de fijación conocidos del especialista, determinando sus valores IC_{50}, p.ej. mediante un ensayo radio-receptor.

Descripción de las figuras

Figura 1: secuencia de aminoácidos de la pre-pro-AVP (SEQ ID NO: 1).
Figura 2: secuencia de aminoácidos de la CT-pro-AVP (copeptina) (SEQ ID NO:2).
Figura 3: secuencia de aminoácidos de la pro-AVP (SEQ ID NO:3).
Figura 4: curva de precisión del ensayo de copeptina con anticuerpo policlonal/policlonal. Representación gráfica del coeficiente de variación inter-ensayo (CV [%]) frente a las concentraciones de copeptina [pmol/l]. Se marcan las concentraciones de copeptina determinadas con un CV del 10% y 20% respectivamente.
Figura 5: curva de precisión del ensayo de copeptina con anticuerpo monoclonal/policlonal. Representación gráfica del CV [%] interensayo frente a las concentraciones de copeptina [pmol/l]. Se marcan las concentraciones de copeptina determinadas con un CV del 10% y 20% respectivamente.
Figura 6: el incremento de copeptina en el plasma está relacionado independientemente con la diabetes. Se representan los IP de diabetes correspondientes a los cuartiles de los niveles de copeptina. Ajustados por: edad, sexo, TG, HDL, PSS, PSD, TAH, IMC, cintura, C/C, cistatina C, PCR, ECV previa.
Figura 7: el incremento de copeptina en el plasma es un predictor independiente de futura diabetes (excluidos los diabéticos conocidos o los sujetos con GSA > 6,0 mM en la línea base). El efecto es independiente de la glucosa basal. Se representan los IP de diabetes incidente correspondientes a los cuartiles de los niveles de copeptina. Ajustados por: edad, sexo, TG, HDL, PSS, PSD, TAH, IMC, cintura, C/C, cistatina C, PCR, ECV previa, fumador, herencia de diabetes, insulina plasmática en ayunas y glucosa sanguínea en ayunas.
Figura 8: el incremento de copeptina en el plasma es un predictor independiente de futura diabetes (excluidos los diabéticos conocidos o los sujetos con GSA ± 5,4 mM en la línea base). El efecto es independiente de la glucosa y permanente (se intensifica después de la exclusión de la GAA). Se representan los IP de diabetes incidente correspondientes a los cuartiles de los niveles de copeptina. Ajustados por: edad, sexo, TG, HDL, PSS, PSD, TAH, IMC, cintura, C/C, cistatina C, PCR, ECV previa, fumador, herencia de diabetes, insulina plasmática en ayunas y glucosa sanguínea en ayunas.
Figura 9: curvas CRO de predicción de la diabetes futura utilizando a) una combinación de edad, sexo, IMC y herencia de DM, y b) añadiendo copeptina a esta combinación.
Figura 10: curvas CRO de predicción de la diabetes futura utilizando a) una combinación de edad, sexo, PSS, IMC, cintura, glucosa, TG, HDL y herencia de DM, y b) añadiendo copeptina a esta combinación.
Figura 11: correlación del nivel de glucosa sanguínea en ayunas (mmol/l) con los cuartiles de copeptina creciente en plasma, expresado como media con intervalos de confianza del 95% en sujetos no diabéticos (n = 4377). P (tendencia lineal) < 0,001

Figura 12: correlación del nivel de insulina en ayunas (mU/l) con los cuartiles de copeptina creciente en plasma, expresado como media con intervalos de confianza del 95% en sujetos no diabéticos (n = 4377). P (tendencia lineal) < 0,001

Ejemplos

Ejemplo 1: estudio clínico

El estudio de dieta y cáncer de Malmö (MDC) es una cohorte prospectiva basada en una población que consta de 28.449 personas evaluadas en 1991-1996. De esta cohorte se seleccionaron al azar 6103 personas para estudiar la epidemiología de la enfermedad de las arterias carótidas y este grupo se designó como la cohorte cardiovascular del MDC (MDC-CC). Se obtuvieron muestras de plasma en ayunas de 5405 sujetos de la MDC-CC. De estos se dispuso de datos completos sobre covariables, incluyendo factores conocidos de riesgo de diabetes, factores distorsionantes potenciales y copeptina plasmática (P-copeptina), en 4742 individuos (tabla 1).

Como punto de referencia la diabetes se definió según un informe de un diagnóstico médico o según el uso de una medicación antidiabética o por un nivel de glucosa sanguínea en ayunas (GSA) ≥ 6,1 mmol/l. Todos los análisis en plasma y en sangre se realizaron de muestras extraídas tras una noche en ayunas. La GSA se midió en sangre entera por un método de hexoquinasa-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El colesterol LDL se calculó por la fórmula de Friedewald. En las muestras de plasma en ayunas, que se habían conservado a -80ºC, medimos la copeptina mediante el ensayo 2 (mono/poli) arriba descrito. La proteína C reactiva (PCR) se midió mediante un ensayo muy sensible (Tina-quant CRP, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La cistatina C se midió utilizando un ensayo inmuno-nefelométrico reforzado con partículas (N Latex Cystatin C, Dade Behring, IL).

La presión sanguínea se midió con un esfigmomanómetro de columna de mercurio tras 10 minutos de reposo en posición supina. La información sobre fumadores de cigarrillos se obtuvo mediante un cuestionario autoadministrado en el que se definía como fumador actual haber fumado de cualquier modo durante el año anterior. La enfermedad cardiovascular previa se definió como la presencia de infarto de miocardio o de apoplejía antes del examen inicial. La herencia de diabetes se dedujo de un cuestionario y se definió como diabetes conocida en al menos un pariente de primer grado.

El inicio de una diabetes tras el examen inicial hasta junio de 2007 se valoró mediante tres registros: (1) el registro de la HbA1c de Malmö (MHR) en el Departamento de química clínica del hospital de la universidad de Malmö, que analizó y catalogó todas las muestras de HbA1c tomadas por servicios de atención institucional y no institucional en el área metropolitana de Malmö desde 1990 en adelante. En el MHR se definió que los individuos eran diabéticos si tenían al menos dos registros de HbA1c ≥ 6,0% según el sistema sueco de normalización Mono-S, que corresponde a 7,0% según el programa nacional US de normalización de la glicohemoglobina (NGSP) o al menos tres registros de HbA1c ≥ 5,5% (correspondiente a 6,5% según el NGSP); (2) el registro nacional sueco de diabetes (NDR), que se inició en 1996 y cubre aproximadamente el 50% de todos los pacientes diabéticos de Suecia en 2007; (3) un registro regional de la provincia de Escania, cuya ciudad principal es Malmö (Diabetes registro 2000) (Lindholm E, Eur J Epidemiol 2001:17:983-989), el cual se inició en 2000 y cubre aproximadamente el 25% de todos los pacientes diabéticos de la provincia de Escania en 2001.

Los sujetos que no figuraban en ninguno de los tres registros antes del examen inicial y que no tenían diabetes en el momento de dicho examen en la MDC-CC según nuestros criterios (es decir, sin historial declarado personalmente de diabetes diagnosticada por el médico, ausencia de terapia antidiabética, GSA < 6,0 mmol/l en el examen inicial) y que estaban registrados como pacientes diabéticos en el NDR o en Diabetes registro 2000, o que cumplieron en el MHR nuestros criterios de diabetes basados en HbA1c, en cualquier momento desde su examen inicial en el MDC-CC hasta junio de 2007, se clasificaron como nuevos diabéticos. Los protocolos del estudio fueron aprobados por el comité de ética de la universidad de Lund. Todos los participantes dieron su consentimiento por escrito.

Estadística

Para todos los cálculos se empleó el programa estadístico SPSS (versión 14,0). Las diferencias entre las variables continuas por grupos se analizaron mediante la prueba t de Student, expresándolas como media ± DE en caso de distribución normal, o mediante la prueba de Mann-Whitney, expresándolas como mediana e intervalos intercuartiles cuando la distribución no es normal. Las diferencias entre las variables dicotómicas se analizaron usando la prueba de ji-cuadrado. El valor P de la tendencia lineal de la glucosa y la insulina en ayunas a través de los cuartiles de P-copeptina en sujetos no diabéticos se evaluó mediante regresión lineal, con la concentración de insulina en ayunas convertida a logaritmo natural. Utilizamos regresión logística bruta y regresión logística con ajuste multivariante para comprobar si los cuartiles de P-copeptina crecientes (Q1 de copeptina – Q4 de copeptina, siendo Q1 la categoría de referencia) estaban relacionados con la diabetes en la línea base de toda la cohorte (n = 4742). Para los sujetos sin diabetes en la línea base (n = 4377) se utilizó regresión logística bruta y multivariante para comprobar si los cuartiles de P-copeptina crecientes (Q1 de copeptina – Q4 de copeptina, siendo Q1 la categoría de referencia) estaban relacionados con la resistencia a la insulina, definida como perteneciente al cuartil superior de insulina en ayunas, y con la aparición nueva de diabetes. Por último se comprobó la relación entre los cuartiles de P-copeptina crecientes

y el riesgo de aparición nueva de diabetes en sujetos sin glucosa alterada en ayunas (glucosa plasmática en ayunas igual a 6,1 mmol/l, que corresponde a una GSA < 5,5 mmol/l) (n = 3702). Los datos obtenidos de los análisis de regresión logística se expresaron como índice de probabilidad (IP) e intervalos de confianza (IC) del 95%.
Se consideró estadísticamente significativo un valor P bilateral < 0,05. Para valorar la sensibilidad y la especificidad de la P-copeptina en la predicción de aparición nueva de diabetes, además de las series de predictores clásicos de diabetes, comparamos el área bajo las curvas características receptor-operador (CRO) empleando un modelo tanto personal (edad, sexo, IMC y herencia de diabetes), como clínico (modelo personal + presión sanguínea sistólica, triglicéridos, HDL, circunferencia de la cintura y GSA), con y sin P-copeptina en cada uno de los modelos.

RESULTADOS

De los pacientes con diabetes en el examen inicial (n = 365) solo el 29% refirió un historial de diabetes diagnosticada por el médico o de tratamiento, mientras que la mayoría (71%) fueron clasificados como diabéticos por presentar una GSA ≥ 6,1 mmol/l en el examen inicial. El nivel de P-copeptina fue mayor entre los pacientes diabéticos que entre los pacientes no diabéticos (tabla 1). En el segmento no diabético de la población, la GSA aumentó con la copeptina (figura 11). Hubo un incremento gradual del IP de diabetes con los cuartiles crecientes de copeptina, tanto en el modelo bruto como después de ajustar todas las características de la línea base, que difirió significativamente en las comparaciones univariantes entre los pacientes de diabetes y los controles (tabla 1), exceptuando la concentración plasmática de insulina (modelo 1, ajuste) (tabla 2) (fig. 6). Entre los sujetos no diabéticos la concentración plasmática de insulina subió gradualmente con los cuartiles de P-copeptina (figura 12) y el IP de resistencia a la insulina (cuartil superior de insulina plasmática en ayunas del segmento no diabético de la población) aumentó con la P-copeptina, tanto en el análisis bruto como después del ajuste extendido del modelo 1, incluyendo las covariables del modelo 1 y la GSA (tabla 2). Entre los sujetos sin diabetes en la línea base, las concentraciones de copeptina en los límites de los cuartiles fueron las siguientes: Q1/Q2: 3,13 pmol/l, Q2/Q3: 5,05 pmol/l, Q3/Q4: 7,94 pmol/l.

Entre los sujetos sin diabetes en la línea base (n = 4377), 174 desarrollaron diabetes nueva y entre los sujetos libres de glucosa alterada en ayunas en la línea base (n = 3702), 79 desarrollaron diabetes nueva durante el seguimiento (tabla 3). La P-copeptina en la línea base fue significativamente superior en los sujetos que desarrollaron diabetes nueva, en comparación con los que no la desarrollaron, tanto entre los sujetos sin diabetes en la línea base como entre los sujetos sin glucosa alterada en ayunas en la línea base (tabla 3). La probabilidad de desarrollar diabetes nueva aumentó con los cuartiles de P-copeptina en el análisis bruto y también después del ajuste de las covariables del modelo 1 más insulina en ayunas, GSA, fumador, herencia de diabetes y LDL, tanto en los sujetos sin diabetes (fig. 7) como en los sujetos sin glucosa alterada en ayunas en la línea base (fig. 8) (tabla 4). En los sujetos sin diabetes en la línea base, el área bajo la curva característica receptor-operador (CRO) para predecir diabetes futura aumentó de 69,4 hasta 71,0% (P = 0,08) y de 83,2 hasta 84,1% (P = 0,007) al añadir copeptina al modelo personal y al modelo clínico de predicción de diabetes, respectivamente. En los sujetos sin glucosa alterada en ayunas en la línea base, el área bajo la curva CRO para predecir diabetes futura aumentó de 66,3 hasta 71,3% (P = 0,03) (fig. 9) y de 78,3 hasta 80,5% (P = 0,04) (fig. 10) al añadir copeptina al modelo personal y al modelo clínico de predicción de diabetes, respectivamente.

DISCUSIÓN

Aquí, en una cohorte basada en una amplia población, demostramos que la P-copeptina es notablemente alta en los pacientes de diabetes y que aumenta linealmente con la GSA en los sujetos no diabéticos, es decir en sujetos con niveles de GSA que en definitiva no afectan a la osmolalidad. En los sujetos no diabéticos hubo una fuerte relación transversal entre P-copeptina y resistencia a la insulina (estimada mediante la insulina plasmática en ayunas) y esta relación era independiente de un gran número de factores distorsionantes, incluida la GSA. Además la P-copeptina en la línea base fue un gran factor de riesgo de desarrollo de diabetes nueva durante el seguimiento. Lo importante es que esta relación era independiente de una amplia variedad de factores de riesgo bien conocidos de diabetes en la línea base, incluyendo GSA e insulina en ayunas, estando estas dos últimas muy relacionadas transversalmente con la P-copeptina. Al restringir la cohorte a los sujetos sin glucosa alterada en ayunas, la relación entre P-copeptina y aparición de diabetes nueva se consolidó a pesar del hecho de que casi la mitad de los nuevos casos de aparición de diabetes nueva ocurrieron entre sujetos que habían tenido glucosa alterada en ayunas en la línea base. Tal como era de esperar, la GSA fue el mayor factor de riesgo de aparición de diabetes nueva. Cada 1 mmol/l de aumento de la GSA en la línea base incrementó el riesgo de diabetes futura, con un IP de 11,4 (95% IC: 7,4-17,5) en el modelo totalmente ajustado (tabla 4). Teniéndolo cuenta es sorprendente que la relación entre los cuartiles superior e inferior de copeptina se asociara a un IP de 3,6 de aparición de diabetes nueva en sujetos sin glucosa alterada en ayunas, después del ajuste total de covariables en la línea base, incluida la GSA (tabla 4). Lo importante es que en sujetos sin glucosa alterada en ayunas hubo una mejoría significativa de un 2,2-4,0% del área bajo la curva CRO cuando se añadió P-copeptina a modelos de factores clásicos de riesgo de diabetes, lo cual indica que la P-copeptina mejora la sensibilidad y especificidad de la predicción del riesgo individual de diabetes. En la muestra más amplia, que incluía los sujetos con glucosa alterada en ayunas, la P-copeptina no mejoró el área bajo la curva CRO tan marcadamente.

La menor mejoría del área bajo la curva CRO en los análisis que incluyen sujetos con altos niveles de GSA (es decir, sujetos con glucosa alterada en ayunas) puede ser debida a que la GSA sea un predictor más potente de diabetes a niveles cercanos al límite diagnóstico de 6,1 mmol/l, mientras que los marcadores no diagnósticos de diabetes, como

la P-copeptina, pueden señalar antes y mejor la susceptibilidad a la diabetes en el estado prediabético. Cabe señalar que, como herramientas de detección de diabetes futura, los nuevos marcadores de riesgo son más importantes en sujetos con GSA normal, porque de todos modos los sujetos con glucosa alterada en ayunas suelen recibir atención médica para predecir la diabetes, pues, como es bien sabido, una GSA elevada tiene un gran valor predictivo de la diabetes. Por lo tanto nuestros hallazgos indican que la adición de P-copeptina a las herramientas ya consolidadas de detección de la diabetes puede ser valiosa clínicamente para predecirla. No disponemos de datos de subtipos de diabetes de nueva aparición; no obstante, como la edad media en el segmento no diabético de nuestra población es de 57 años y hay una fuerte relación transversal entre la P-copeptina y la resistencia a la insulina, asumimos que el incremento de la P-copeptina indica riesgo de contraer diabetes de tipo 2, más que diabetes de tipo 1.

Aparte de sus implicaciones para la detección de la diabetes, nuestros hallazgos sugieren la intervención del sistema de AVP en la patofisiología de la diabetes y sus posibilidades para el desarrollo de nuevos regímenes de tratamiento antidiabético. Los estudios con animales han demostrado que los ratones carentes del V1aR (V1aR -/-) presentan niveles altos de AVP, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, mientras que los ratones carentes del V1bR (V1bR -/-) adquieren el fenotipo contrario de baja GSA y mejor sensibilidad a la insulina. Basándonos en estos datos de los animales y en nuestros hallazgos de que la P-copeptina alta está relacionada con GSA elevada, resistencia a la insulina y mayor riesgo de futura diabetes, se puede especular con que la AVP elevada, como consecuencia de la resistencia a la AVP al nivel del V1aR o en otro lugar, favorece la resistencia a la insulina y la diabetes mediante la estimulación del V1bR. De hecho, el bloqueo farmacológico del V2R, un potente estímulo de la mayor secreción de AVP como reacción negativa en el eje hipotalámico-neuropituitario, fue relacionado con un aumento quíntuple de los episodios hiperglicémicos durante 30 días de tratamiento con tolvaptán en pacientes con hiponatremia. Por tanto un aumento de AVP, cualquiera que sea el mecanismo subyacente, puede contribuir a la alteración de la homeostasis de la glucosa, probablemente mediante la estimulación del V1bR. Estas observaciones justifican los estudios sobre manipulaciones farmacológicas del sistema de AVP en relación con el metabolismo de la glucosa en el hombre.

El número de casos de aparición de diabetes nueva en la MDC-CC puede parecer menor de lo esperado. Hay tres razones importantes que son las más plausibles para explicarlo. (1) La tasa de participación en el estudio MDC fue solo del 40% y por lo tanto la población del MDC es más sana e incluye de forma desproporcionada muchas mujeres respecto a la población original (Manjer 2001). Como resultado la relación entre P-copeptina y aparición de diabetes nueva que describimos está probablemente subestimada. (2) La incidencia de diabetes que observamos en los tres registros está basada en la condición previa de gente que busca activamente asistencia médica y no en la detección de los niveles glucosa en la población, lo cual arroja una menor incidencia que la observada en los estudios basados en la detección de la diabetes mediante la medición de la GSA. Asimismo, al contrario que nuestra definición de la diabetes de nueva aparición, la definición de la diabetes en el examen inicial de la MDC-CC incluía la medición de la GSA. De hecho el 71% que se había definido como diabético no informaron de un historial de diabetes o tratamiento antidiabético, sino que fueron diagnosticados basándose solamente en la GSA. La exclusión de este gran número de pacientes diabéticos que ignoraban tener diabetes antes del examen inicial ha disminuido notablemente la incidencia de diabetes de nueva aparición durante el seguimiento. (3) A pesar de los temas discutidos anteriormente es posible que nuestro estudio haya omitido varios casos de nueva aparición, que de hecho ya se habían diagnosticado como diabetes en el sistema de asistencia sanitaria. El MHR registró todos los valores de HbA1c en el área metropolitana de Malmö desde 1990 en adelante; pero omitimos los casos diagnosticados de diabetes en el área metropolitana de Malmö si en ellos no se había medido la HbA1c o si solo se había medido una vez o si solo era marginalmente alta en repetidas ocasiones. Los casos de diabetes de nueva aparición no detectados en el MHR por encontrarse fuera del área metropolitana de Malmö tras el examen inicial de la MDC-CC habrían tenido una oportunidad razonable de ser detectados por el NDR, de ámbito nacional, y/o por el registro regional Diabetes 2000, en particular por el NDR, pues se estimó que este registro cubría el 50% de todos los pacientes diabéticos de Suecia en 2007. La cobertura de los registros NDR y Diabetes 2000 aún no es completa. Por estos motivos hemos clasificado como no diabéticos un número desconocido de sujetos que de hecho desarrollaron diabetes durante el seguimiento. Por otro lado, como los criterios de HbA1c para la diabetes de nueva aparición en el MHR y su validez comprobada en los registros NDR y Diabetes 2000 son estrictos, confiamos en el valor del punto final en aquellos sujetos que clasificamos como casos de diabetes de nueva aparición. La validez del diagnóstico de diabetes de nueva aparición basado en los registros también está respaldada por el hecho de que la mayoría de los factores bien conocidos de riesgo de diabetes fueron notablemente altos en la línea base de la MDC-CC de estos sujetos, en comparación con los que no desarrollaron diabetes según los tres registros (tabla 3). Cabe destacar que estas diferencias fueron igualmente marcadas cuando la población del estudio se restringió a sujetos con la glucosa alterada en ayunas en la línea base, excluyendo por tanto la posibilidad de que nuestros hallazgos sobre los factores establecidos de riesgo de diabetes y la P-copeptina en relación con la diabetes de nueva aparición solo fueran debidos a los sujetos que tenían niveles casi diabéticos de GSA en el examen inicial de la MDC-CC.

En conclusión, la P-copeptina predice la diabetes independientemente de un amplio rango de factores establecidos de riesgo de diabetes, incluyendo los niveles de glucosa e insulina en ayunas. Nuestros hallazgos sugieren que el sistema de la AVP interviene en el desarrollo de la diabetes y que puede tener implicaciones en la valoración del riesgo y en la nueva farmacoterapia antidiabética.

Tabla 1. Características de los sujetos con y sin diabetes en la línea base

	Sujetos no diabéticos (n = 4377)	Pacientes diabéticos (n = 365)	Valor P
Edad (años)	75,4 ± 5,9	59,5 ± 5,5	< 0,001
GSA (mmol/l)	4,9 ± 0,45	8,1 ± 3,0	< 0,001
Triglicéridos (mmol/l)*	1,12 (0,85 – 1,53)	1,64 (1,13 – 2,33)	< 0,001
PS sistólica (mm Hg)	140 ± 19	150 ± 20	< 0,001
PS diastólica (mm Hg)	87 ± 9,4	90 ± 9,5	< 0,001
IMC (kg/m^2)	25,5 ± 3,7	28,7 ± 4,5	< 0,001
Cintura (cm)	82,6 ± 12	94,4 ± 13	< 0,001
Relación cintura-cadera	0,84 ± 0,09	0,91 ± 0,09	< 0,001
HDL (mmol/l)	1,40 ± 0,37	1,23 ± 0,35	< 0,001
LDL (mmol/l)	4,2 ± 0,98	4,2 ± 1,0	0,22
Cistatina C (mg/l)	0,773 ± 0,143	0,809 ± 0,193	0,001
Copeptina (pmol/l)*	5,04 (3,12 – 7,94)	6,90 (4,32 – 10,7)	< 0,001
Insulina (mU/l)*	6,0 (4,0 – 9,0)	12 (7,0 – 18)	< 0,001

(Continuación)

Tabla 1. Características de los sujetos con y sin diabetes en la línea base

	Sujetos no diabéticos (n = 4377)	Pacientes diabéticos (n = 365)	Valor P
PCR (mg/l)	1,3 (0,6 – 2,6)	2,3 (1,3 – 4,5)	< 0,001
Hombres (%)	39,2	56,2	< 0,001
TAH (%)	14,7	37,3	< 0,001
Actualmente fumador (%)	26,5	24,4	0,41
Herencia de diabetes (%)	3,0	3,0	0,87
ECV previa (%)	2,0	3,8	0,02

Las variables continuas están indicadas como media ± DE, si no se especifica otra cosa; *mediana (rango intercuartil)
TAH, tratamiento anti-hipertensivo; IMC, índice de masa corporal; GSA, glucosa sanguínea en ayunas; ECV previa, enfermedad cardiovascular existente antes del examen inicial.

Tabla 2: Diabetes prevalente y resistencia a la insulina respecto a los cuartiles de P-copeptina en la línea base

Variable dependiente		IP (95% IC) copeptina Q2 frente a copeptina Q1	IP (95% IC) copeptina Q3 frente a copeptina Q1	IP (95% IC) copeptina Q4 frente a copeptina Q1	P de tendencia lineal
Diabetes*	bruto	1,44 (1,00 – 2,07)	1,92 (1,36 – 2,71)	2,83 (2,04 – 3,93)	< 0,001
	ajustado	1,19 (0,81 – 1,75)‡	1,39 (0,96 – 2,01)‡	1,45 (1,00 – 2,11)‡	0,04
Hiperinsulinemia †	bruto	1,30 (1,06 – 1,60)	1,53 (1,25 – 1,87)	2,34 (1,93 – 2,85)	< 0,001
	ajustado	1,19 (0,94 – 1,51)§	1,26 (0,99 – 1,60)§	1,61 (1,26 – 2,06)§	< 0,001

* Análisis de la prevalencia de diabetes (n = 365) en toda la cohorte (n = 4742)
† Análisis de la hiperinsulinemia (cuartil más alto de la concentración de insulina plasmática en ayunas entre sujetos no diabéticos) en los sujetos no diabéticos (n = 4377)
‡ Ajustado por edad, sexo, HDL, triglicéridos, presión sanguínea, tratamiento antihipertensivo, índice de masa corporal, cintura, relación cintura/cadera, cistatina C, PCR y enfermedad cardiovascular previa (modelo 1)
§ Ajustado por el modelo 1 y GSA.

Tabla 3. Características en la línea base de los sujetos que contrajeron o no diabetes durante el seguimiento

Sujetos sin diabetes en la línea base (n = 4377)			
	No alterados (n = 4203)	Diabetes incidente (n = 174)	P
Edad (años)	57,3 ± 5,9	57,9 ± 5,7	0,26
Hombres (%)	38,9	45,4	0,09
Glucosa (mmol/l)	4,9 ± 0,44	5,4 ± 0,44	< 0,001
Triglicéridos (mmol/l)	1,11 (0,84 – 1,51)	1,46 (1,05 – 1,96)	< 0,001
PS sistólica (mm Hg)	140 ± 19	146 ± 19	< 0,001
PS diastólica (mm Hg)	86 ± 9,3	90 ± 10	< 0,001
TAH (%)	14,2	27,6	< 0,001
IMC (kg/m^2)	25,4 ± 3,6	28,2 ± 4,7	< 0,001
Cintura (cm)	82,2 ± 12	91,5 ± 14	< 0,001
Relación cintura-cadera	0,84 ± 0,09	0,89 ± 0,10	< 0,001
HDL (mmol/l)	1,41 ± 0,37	1,25 ± 0,33	< 0,001
LDL (mmol/l)	4,2 ± 0,98	4,3 ± 1,0	0,06
Cistatina C (mg/l)	0,77 ± 0,14	0,82 ± 0,21	< 0,001

Copeptina (pmol/l)	4,98 (3,09 – 7,84)	6,35 (4,05 – 9,88)	< 0,001
Insulina (mU/l)	6,0 (4,0 – 9,0)	9,0 (6,0 – 13)	< 0,001
PCR (mg/l)	1,2 (0,6 – 2,6))	2,1 (0,9 – 4,1)	< 0,001
Actualmente fumador (%)	26,4	29,5	0,37
Herencia de diabetes (%)	2,8	6,9	0,002
ECV previa (%)	2,0	2,3	0,80
Sujetos sin glucosa alterada en ayunas en la línea base (n = 3702)			
	No alterados (n = 3623)	Diabetes incidente (n = 79)	P
Edad (años)	57,2 ± 5,9	58,1 ± 5,4	0,20
Hombres (%)	36,5	38,0	0,79
Glucosa (mmol/l)	4,7 ± 0,34	5,0 ± 0,28	< 0,001
Triglicéridos (mmol/l)	1,34 (0,82 – 1,47)	1,34 (1,06 – 1,92)	< 0,001
PS sistólica (mm Hg)	139 ± 19	146 ± 19	0,001
PS diastólica (mm Hg)	86 ± 9,2	89 ± 9,5	0,004
TAH (%)	13,4	24,1	0,006
IMC (kg/m^2)	25,2 ± 3,6	27,5 ± 4,9	< 0,001

(Continuación)

Tabla 3. Características en la línea base de los sujetos que contrajeron o no diabetes durante el seguimiento

Sujetos sin glucosa alterada en ayunas en la línea base (n = 3702)			
	No alterados (n = 3623)	Diabetes incidente (n = 79)	P
Cintura (cm)	81,3 ± 12	88,7 ± 14	< 0,001
Relación cintura-cadera	0,84 ± 0,09	0,87 ± 0,09	< 0,001
HDL (mmol/l)	1,43 ± 0,37	1,27 ± 0,32	< 0,001
LDL (mmol/l)	4,2 ± 0,98	4,1 ± 0,93	0,99
Cistatina C (mg/l)	0,77 ± 0,14	0,83 ± 0,27	< 0,001
Copeptina (pmol/l)	4,90 (3,03 – 7,65)	6,74 (4,44 – 10,9)	0,001
Insulina (mU/l)	6,0 (4,0 – 8,0)	8,0 (6,0 – 11)	< 0,001
PCR (mg/l)	1,2 (0,6 – 2,4)	2,4 (1,0 – 4,1)	< 0,001
Actualmente fumador (%)	25,4	30,4	0,31
Herencia de diabetes (%)	3,0	7,6	0,02
ECV previa (%)	1,9	2,5	0,67

Las variables continuas están indicadas como media ± DE, si no se especifica otra cosa; *mediana (rango intercuartil)
TAH, tratamiento anti-hipertensivo; IMC, índice de masa corporal; GSA, glucosa sanguínea en ayunas; ECV previa, enfermedad cardiovascular existente antes del examen inicial.

Tabla 4: Diabetes de nueva aparición respecto a los cuartiles de P-copeptina en la línea base

Variable dependiente		IP (95% IC) copeptina Q2 frente a copeptina Q1	IP (95% IC) copeptina Q3 frente a copeptina Q1	IP (95% IC) copeptina Q4 frente a copeptina Q1	P de tendencia lineal
Incidencia de diabetes entre no DM*	bruto	1,28 (0,76 – 2,15)	1,94 (1,19 – 3,14)	2,64 (1,66 – 4,19)	< 0,001
	ajustado ‡	1,37 (0,78 – 2,39)	1,79 (1,06 – 3,05)	2,09 (1,23 – 3,56)	0,004
Incidencia de diabetes entre no GAA †	bruto	1,85 (0,81 – 4,20)	2,12 (0,95 – 4,73)	4,56 (2,18 – 9,52)	< 0,001
	ajustado ‡	1,80 (0,78 – 4,16)	1,92 (0,84 – 4,38)	3,48 (1,58 – 7,65)	0,001

* Sujetos que desarrollaron diabetes durante el seguimiento (n = 174) entre los sujetos sin diabetes en la línea base (n = 4377)
† Sujetos que desarrollaron diabetes durante el seguimiento (n = 79) entre los sujetos sin la glucosa alterada en ayunas en la línea base (n = 3702)
‡ Ajustado por edad, sexo, HDL, triglicéridos, presión sanguínea, tratamiento antihipertensivo, índice de masa corporal, cintura, relación cintura/cadera, cistatina C, PCR y enfermedad cardiovascular previa, fumador, herencia de diabetes, LDL, GSA e insulina en ayunas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> B.R.A.H.M.S AG

<120> copeptina diabetes

<130> B60407PCT

<150> EP 08168096.9
<151> 2008-10-31

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Pro Asp Thr Met Leu Pro Ala Cys Phe Leu Gly Leu Leu Ala Phe
1               5                  10                  15

Ser Ser Ala Cys Tyr Phe Gln Asn Cys Pro Arg Gly Gly Lys Arg Ala
            20                  25                  30

Met Ser Asp Leu Glu Leu Arg Gln Cys Leu Pro Cys Gly Pro Gly Gly
        35                  40                  45

Lys Gly Arg Cys Phe Gly Pro Ser Ile Cys Cys Ala Asp Glu Leu Gly
    50                  55                  60

Cys Phe Val Gly Thr Ala Glu Ala Leu Arg Cys Gln Glu Glu Asn Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Pro Ser Pro Cys Gln Ser Gly Gln Lys Ala Cys Gly Ser Gly Gly
                85                  90                  95

Arg Cys Ala Ala Phe Gly Val Cys Cys Asn Asp Glu Ser Cys Val Thr
            100                 105                 110

Glu Pro Glu Cys Arg Glu Gly Phe His Arg Arg Ala Arg Ala Ser Asp
        115                 120                 125

Arg Ser Asn Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu
    130                 135                 140

Arg Leu Val Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln
145                 150                 155                 160

Pro Asp Ala Tyr
```

<210> 2
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Ala Ser Asp Arg Ser Asn Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala
1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Arg Leu Val Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu
            20                  25                  30

Pro Ala Gln Pro Asp Ala Tyr
        35
```

<210> 3
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Tyr Phe Gln Asn Cys Pro Arg Gly Gly Lys Arg Ala Met Ser Asp
1 5 10 15

Leu Glu Leu Arg Gln Cys Leu Pro Cys Gly Pro Gly Gly Lys Gly Arg
20 25 30

Cys Phe Gly Pro Ser Ile Cys Cys Ala Asp Glu Leu Gly Cys Phe Val
35 40 45

Gly Thr Ala Glu Ala Leu Arg Cys Gln Glu Glu Asn Tyr Leu Pro Ser
50 55 60

Pro Cys Gln Ser Gly Gln Lys Ala Cys Gly Ser Gly Gly Arg Cys Ala
65 70 75 80

Ala Phe Gly Val Cys Cys Asn Asp Glu Ser Cys Val Thr Glu Pro Glu
85 90 95

Cys Arg Glu Gly Phe His Arg Arg Ala Arg Ala Ser Asp Arg Ser Asn
100 105 110

Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu Arg Leu Val
115 120 125

Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln Pro Asp Ala
130 135 140

Tyr
145

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir el riesgo de que un sujeto desarrolle diabetes mellitus de tipo II o para identificar un sujeto que tenga mayor riesgo de contraer diabetes mellitus de tipo II, el cual comprende las siguientes etapas:

a. preparar una muestra tomada de dicho sujeto,
b. determinar el nivel de copeptina en dicha muestra,
c. utilizar dicho nivel de copeptina para predecir la probabilidad de que el sujeto desarrolle diabetes mellitus de tipo II, o para inferir de él un riesgo de que el sujeto desarrolle diabetes mellitus de tipo II, y compararlo con la mediana del nivel de copeptina en un conjunto de muestras predeterminadas de una población de sujetos aparentemente sanos.

2. Método según la reivindicación 1, en el cual dicho sujeto está aparentemente sano.

3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el cual dicho sujeto no es diabético por tener un nivel de glucosa sanguínea en ayunas menor que 6,1 mmol/l pero mayor que 5,4 mmol/l.

4. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el cual dicho sujeto tiene un nivel de glucosa sanguínea en ayunas menor que 5,4 mmol/l.

5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la predicción del riesgo que tiene el sujeto de desarrollar diabetes mellitus de tipo II se mejora determinando adicionalmente y utilizando el nivel de al menos un parámetro de laboratorio u otro marcador elegido del grupo formado por glucosa sanguínea o plasmática en ayunas, triglicéridos, colesterol HDL o subfracciones del mismo, colesterol LDL o subfracciones del mismo, cistatina C, insulina, PCR, péptidos natriuréticos de tipo A y B, así como sus precursores y fragmentos de ellos, incluyendo ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, GDF15, ST2, procalcitonina y fragmentos de ella, pro-adrenomedulina y fragmentos de ella, incluyendo ADM, PAMP, MR-proADM, CT-proADM, pro-endotelina-1 y fragmentos de ella, incluyendo CT-proET-1, NT-proET-1, endotelina-1 grande y endotelina-1.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el cual se determina adicionalmente al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo formado por edad, género, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensivo (TAH), índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, relación cintura-cadera, fumador habitual, herencia de diabetes y enfermedad cardiovascular (ECV) previa.

7. Método según la reivindicación 1 para predecir el riesgo de un sujeto de desarrollar diabetes mellitus de tipo II, o para identificar un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo II, que consiste en utilizar el nivel de copeptina, solo o combinado con otros parámetros clínicos o de laboratorio útiles para el pronóstico, mediante un método a escoger entre las siguientes alternativas:

- comparación con la mediana del nivel de copeptina en un conjunto de muestras predeterminadas de una población de sujetos aparentemente sanos,
- comparación con un cuantil del nivel de copeptina en un conjunto de muestras predeterminadas de una población de sujetos aparentemente sanos,
- cálculo basado en el análisis de riesgo proporcional de Cox o en cálculos de índice de riesgos tales como el INR (índice neto de reclasificación) o el IDI (índice de discriminación integrado).

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la muestra se selecciona del grupo constituido por muestras de sangre, de suero, de plasma, de fluido cerebroespinal, de saliva y de orina o un extracto de cualquiera de dichas muestras.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el nivel de copeptina se determina por medio de un ensayo diagnóstico, preferiblemente un inmunoensayo.

10. Uso de un inmunoensayo para un método según las reivindicaciones 1 a 8, en el cual se emplea al menos un anticuerpo anti-copeptina o un fragmento o variante recombinante del mismo para determinar el nivel de copeptina o de variantes moleculares de ella en una muestra.

11. Uso de un inmunoensayo según la reivindicación 9, el cual es un ensayo de tipo sándwich donde se emplea un segundo anticuerpo para determinar el nivel de copeptina.

12. Uso de una sonda de captura dirigida contra la copeptina, en un método según la reivindicación 1, con el fin de predecir el riesgo que tiene un sujeto aparentemente sano de desarrollar diabetes mellitus de tipo II.

Fig. 1

SEQ ID NO:1 (Secuencia de aminoácidos de la pre-pro-AVP):

```
1      MPDTMLPACF LGLLAFSSAC YFQNCPRGGK RAMSDLELRQ CLPCGPGGKG
51     RCFGPSICCA DELGCFVGTA EALRCQEENY LPSPCQSGQK ACGSGGRCAA
101    FGVCCNDESC VTEPECREGF HRRARASDRS NATQLDGPAG ALLLRLVQLA
151    GAPEPFEPAQ PDAY
```

Fig. 2

SEQ ID NO:2 (Secuencia de aminoácidos de la CT-pro-AVP (copeptina)):

```
1      ASDRSNATQL DGPAGALLLR LVQLAGAPEP FEPAQPDAY
```

Fig. 3

SEQ ID NO:3 (Secuencia de aminoácidos de la pro-AVP):

```
1      CYFQNCPRGG KRAMSDLELR QCLPCGPGGK GRCFGPSICC ADELGCFVGT
51     AEALRCQEEN YLPSPCQSGQ KACGSGGRCA AFGVCCNDES CVTEPECREG
101    FHRRARASDR SNATQLDGPA GALLLRLVQL AGAPEPFEPA QPDAY
```

Fig. 4

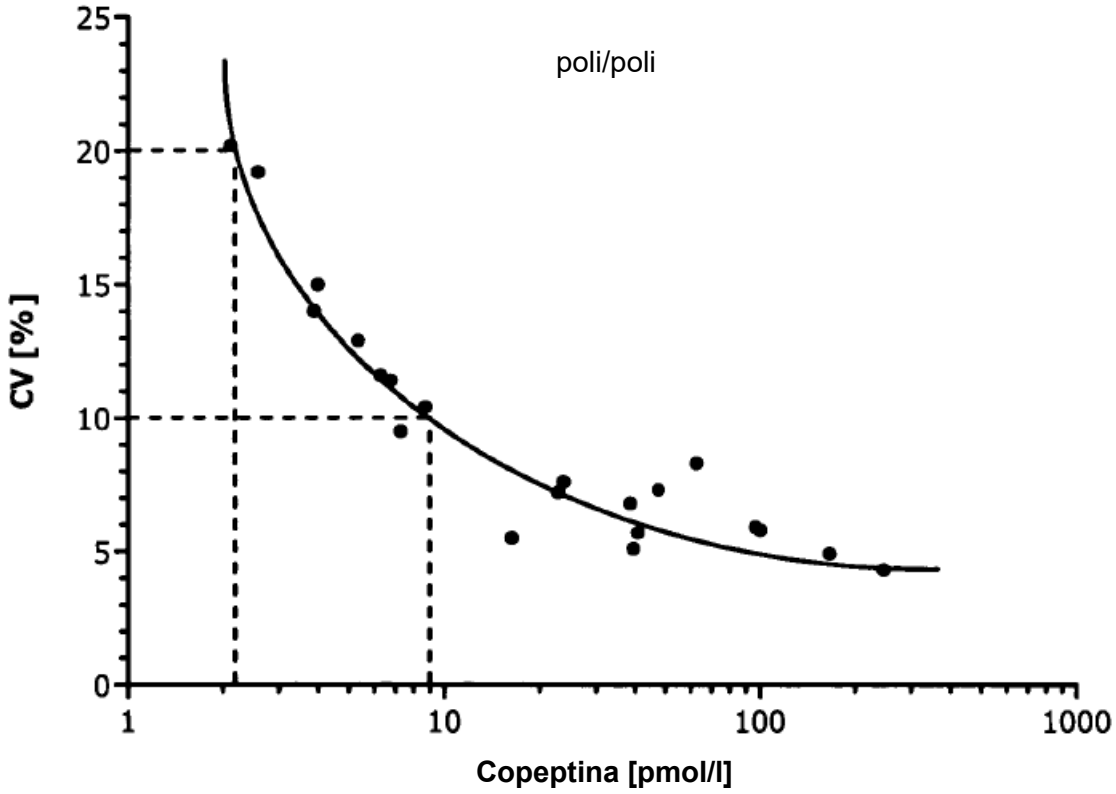


Fig. 5

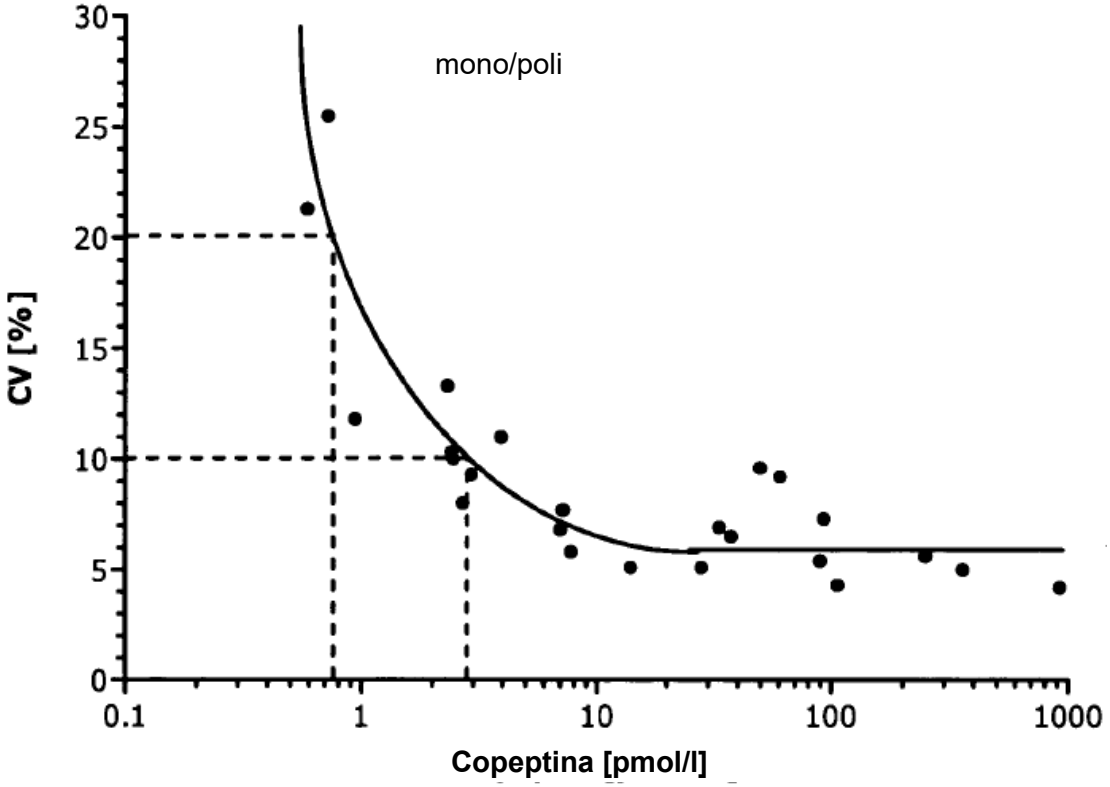


Fig. 6

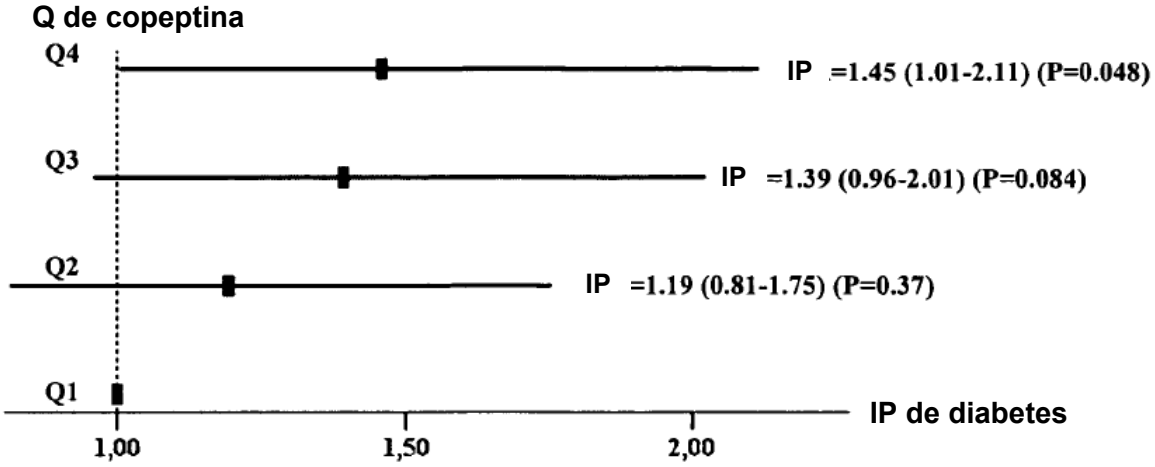

Q de copeptina
Q4
IP =1.45 (1.01-2.11) (P=0.048)
Q3
IP =1.39 (0.96-2.01) (P=0.084)
Q2
IP =1.19 (0.81-1.75) (P=0.37)
Q1
IP de diabetes
1,00
1,50
2,00

Fig. 7

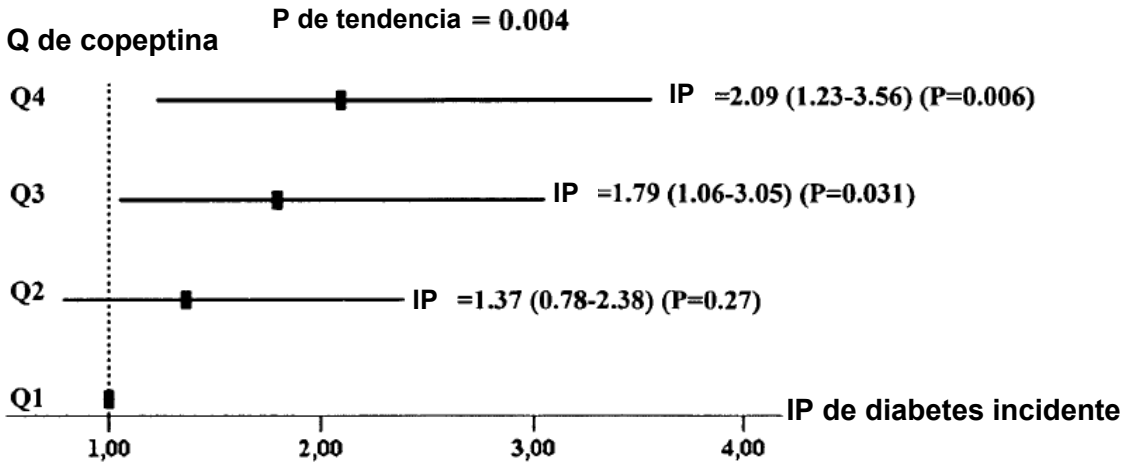

P de tendencia = 0.004
Q de copeptina
Q4
IP =2.09 (1.23-3.56) (P=0.006)
Q3
IP =1.79 (1.06-3.05) (P=0.031)
Q2
IP =1.37 (0.78-2.38) (P=0.27)
Q1
IP de diabetes incidente
1,00
2,00
3,00
4,00

Fig. 8

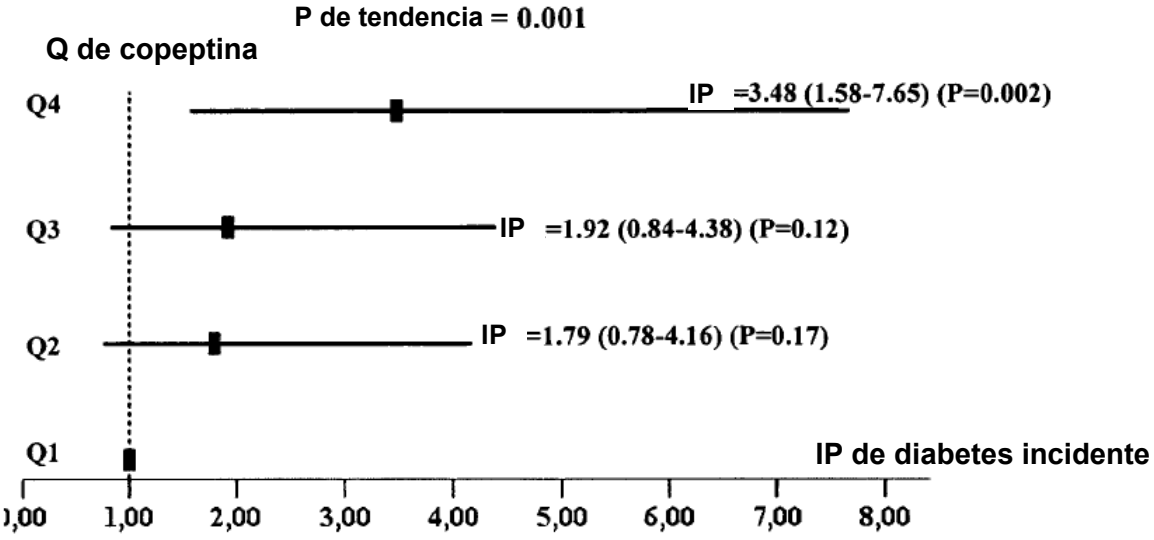

P de tendencia = 0.001
Q de copeptina
Q4
IP =3.48 (1.58-7.65) (P=0.002)
Q3
IP =1.92 (0.84-4.38) (P=0.12)
Q2
IP =1.79 (0.78-4.16) (P=0.17)
Q1
IP de diabetes incidente
,00
1,00
2,00
3,00
4,00
5,00
6,00
7,00
8,00

Fig. 9

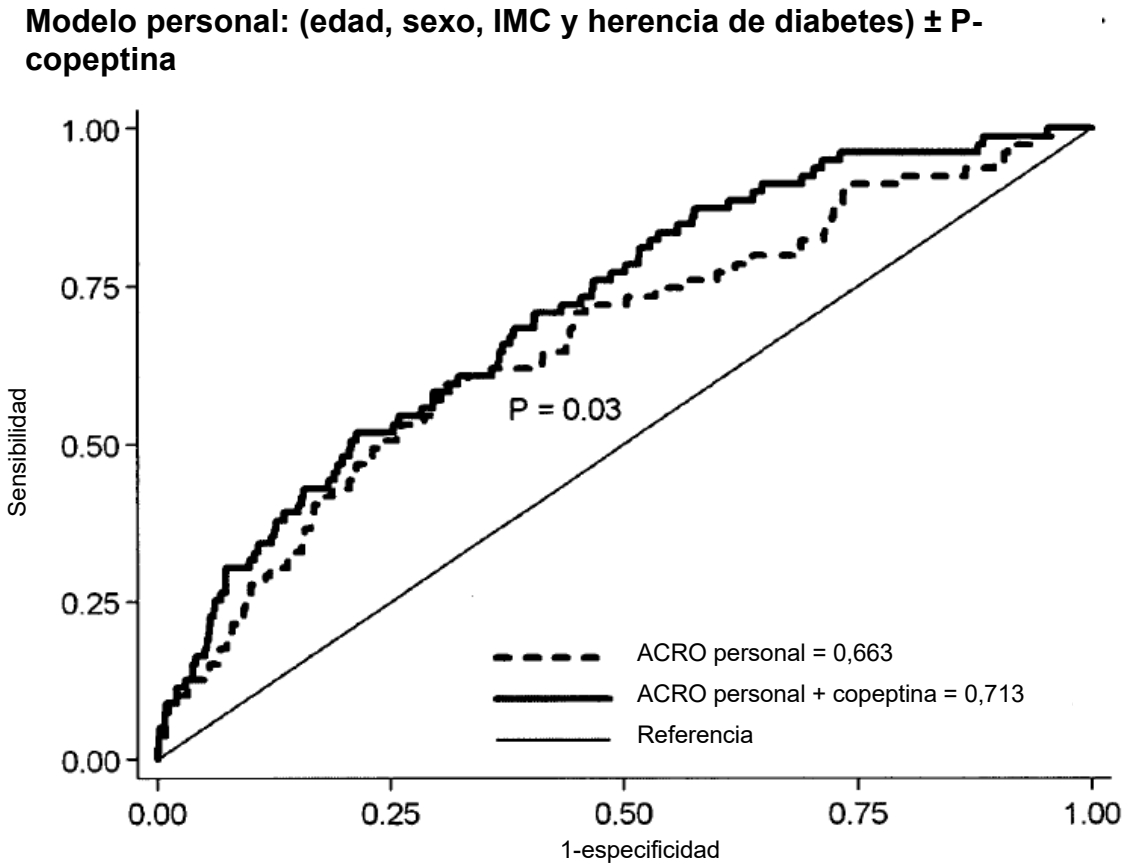

Modelo personal: (edad, sexo, IMC y herencia de diabetes) ± P-copeptina
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Sensibilidad
P = 0.03
ACRO personal = 0,663
ACRO personal + copeptina = 0,713
Referencia
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1-especificidad

Fig. 10

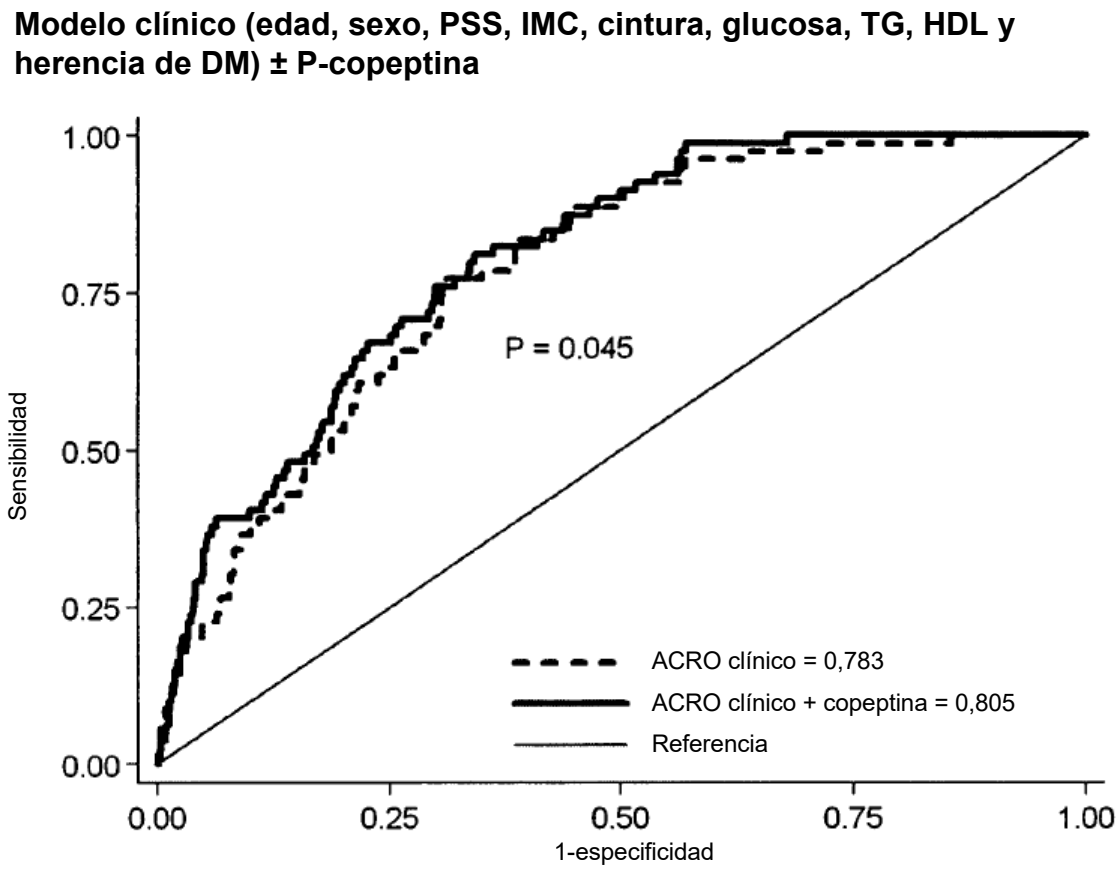

Modelo clínico (edad, sexo, PSS, IMC, cintura, glucosa, TG, HDL y herencia de DM) ± P-copeptina
Sensibilidad
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
P = 0.045
ACRO clínico = 0,783
ACRO clínico + copeptina = 0,805
Referencia
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1-especificidad

Fig. 11

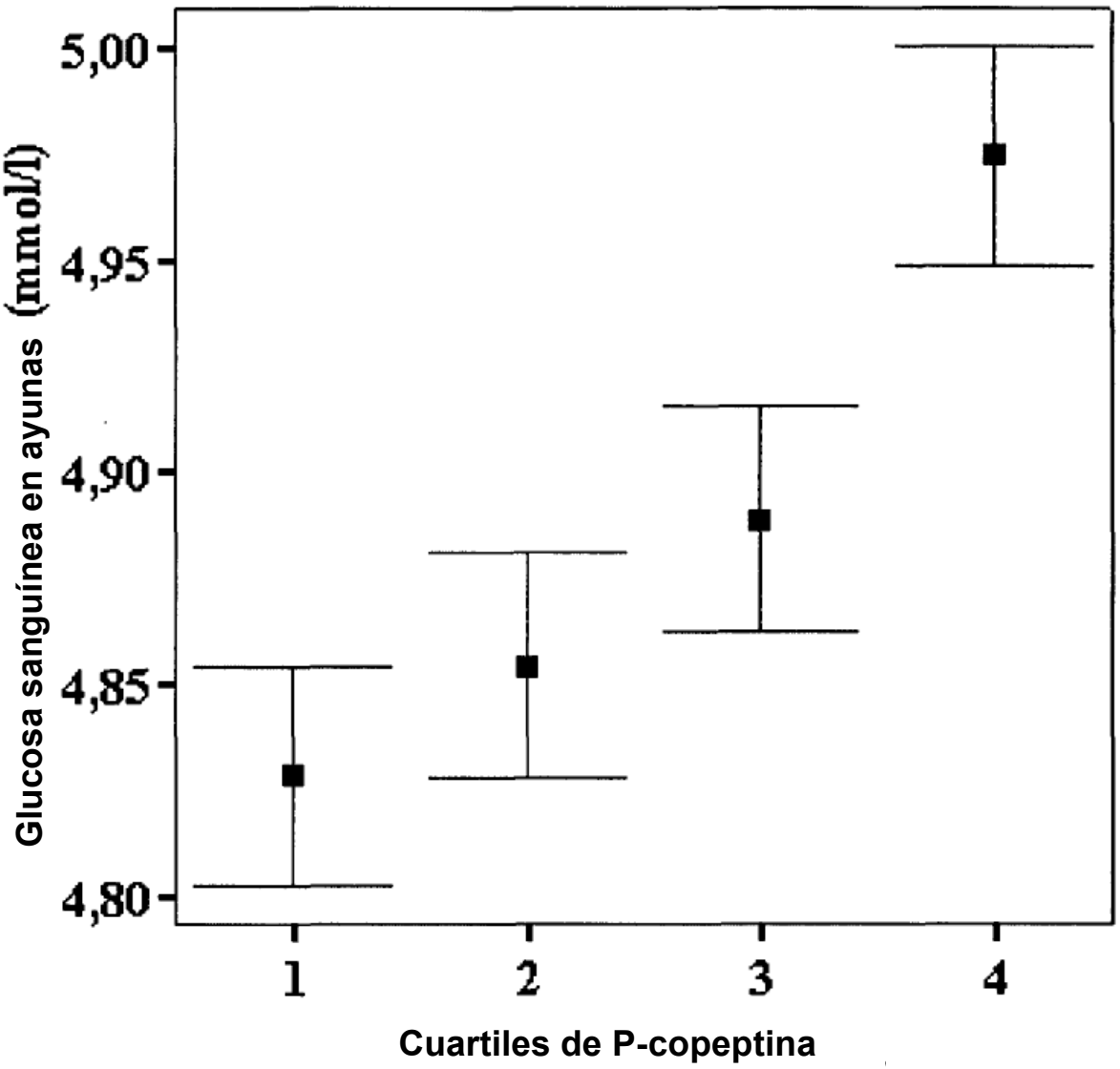
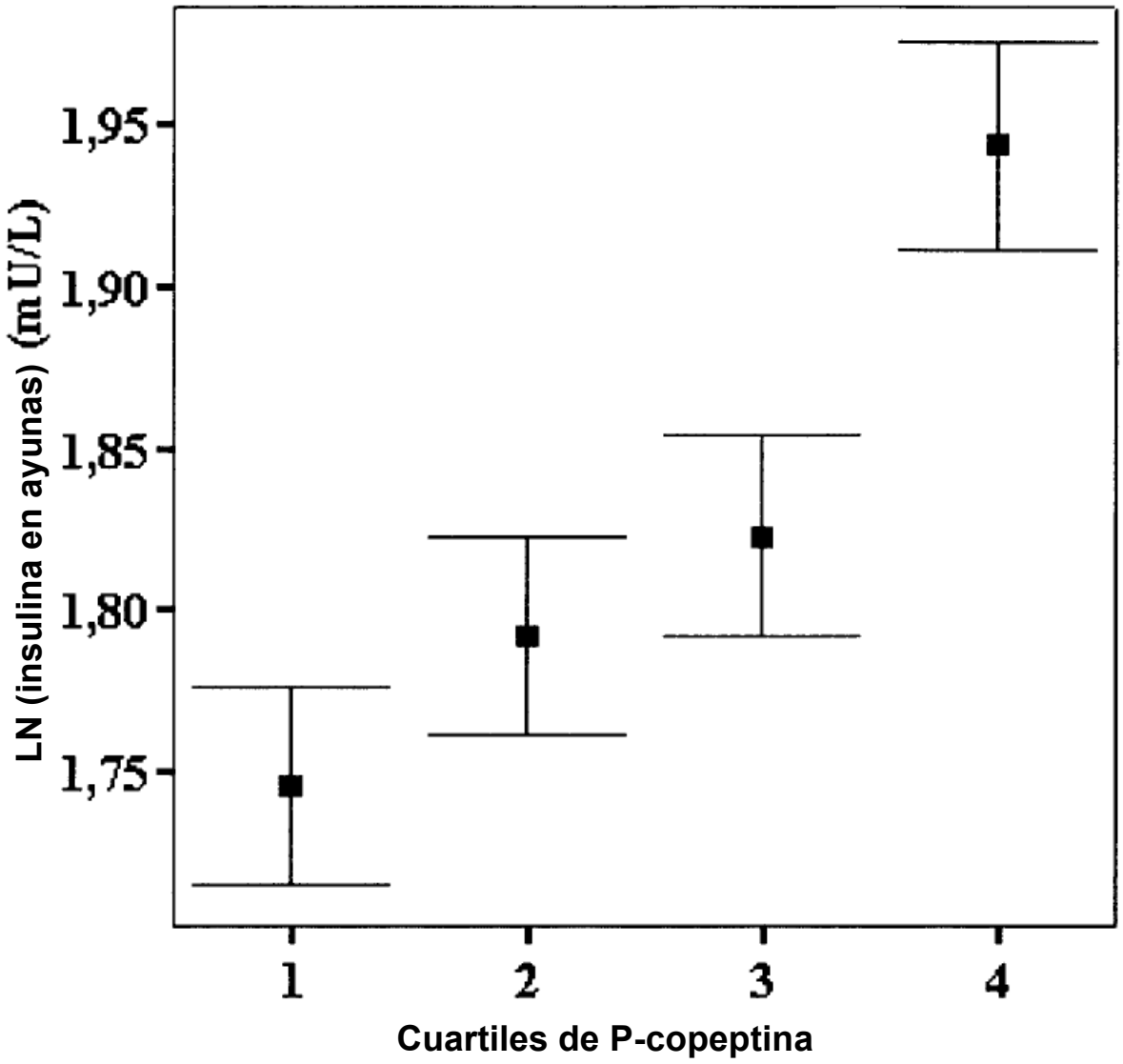

5,00
4,95
4,90
4,85
4,80
Glucosa sanguínea en ayunas (mmol/l)
1
2
3
4
Cuartiles de P-copeptina

Fig. 12


1,95
1,90
1,85
1,80
1,75
LN (insulina en ayunas) (mU/L)
1
2
3
4
Cuartiles de P-copeptina