

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 512**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13708803 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2823316**

54 Título: **Método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer la diabetes mellitus y/o el síndrome metabólico o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto**

30 Prioridad:

08.03.2012 EP 12158680
08.03.2012 US 201261608350 P
20.04.2012 EP 12165062

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 15a
16761 Henningsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS y
MELANDER, OLLE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 684 512 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer la diabetes mellitus y/o el síndrome metabólico o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto.

5 El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer la diabetes mellitus y/o el síndrome metabólico o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético, que comprende las etapas siguientes:

- 10
- determinar el nivel de proneurotensina 1-117 que consiste en la SEC ID nº 5 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 con un inmunoensayo o determinar el nivel de proneurotensina 1-117 en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, en el que dichos péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 seleccionados de entre el grupo que comprende la SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 6, y
- 15
- correlacionar dicho nivel de proneurotensina 1-117 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 con el riesgo de dicho sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo incrementado de adquirir diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o en el que un nivel elevado se correlaciona con el diagnóstico de síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético.

20 La expresión "nivel elevado" se refiere a un nivel superior a un nivel umbral determinado.

25 La neurotensina es un neuropéptido de 13 aminoácidos derivado del precursor proneurotensina y liberado estequiométricamente junto con el péptido estable de 117 aminoácidos proneurotensina (P-NT) y la hormona madura se une a tres receptores diferentes, receptores 1 y 2 de neurotensina (Ntsr1 y Ntsr2), que son receptores acoplados a proteína G y receptor 3 de neurotensina (Ntsr3), que es un receptor no acoplado a proteína G también conocido como sortilina-1 (SORT1).

30 La neurotensina es liberada periféricamente a partir del intestino delgado, así como centralmente a partir del hipotálamo. La secreción periférica de la neurotensina resulta estimulada por la ingesta de alimento, especialmente de grasas, y es conocido que regula la motilidad gastrointestinal y la secreción pancreática y biliar. Cabe destacar que la neurotensina participa en el control del apetito como hormona anoréctica, ya que reduce agudamente la ingesta de alimento tras la inyección tanto central (intracerebroventricular) como periférica (intraperitoneal) en ratas, un efecto que aparentemente se encuentra mediado principalmente por el receptor de la neurotensina-1 (Ntsr1). En sujetos humanos obesos, en comparación con sujetos humanos de peso normal, la concentración plasmática postprandial de neurotensina se redujo tras una comida grasosa líquida (Widen et al., Reg peptides; Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal, 1992), lo que sugiere que la regulación de la secreción de neurotensina se encuentra alterada en la obesidad. Sin embargo, ningún estudio de grandes dimensiones ha investigado si y cómo la neurotensina se relaciona con medidas de obesidad. Cabe destacar que P-NT se incrementa significativamente después de la derivación gástrica (en Y de Roux), una operación que se ha demostrado que conduce a normoglucemia en la mayoría de pacientes obesos de diabetes de tipo II, pero no se conoce si la neurotensina participa en el desarrollo de la diabetes mellitus en general. Además, se ha relacionado el sistema de la neurotensina con el desarrollo de enfermedad coronaria arterial e infarto de miocardio, ya que la variación del gen de Ntsr3 (SORT1) es uno de los genes comunes de susceptibilidad a enfermedad arterial coronaria más fuertes que se conoce en el ser humano.

50 El nexo desde un punto de vista mecánico entre la obesidad y el cáncer en gran medida se desconoce; sin embargo, una de las teorías dominantes es que el exceso de depósitos de grasa conduce a una mayor aromatización periférica de los andrógenos y, de esta manera, a niveles circulantes elevados de estrógenos. Además, una de las características identificativas de la obesidad, la hiperinsulinemia, se ha demostrado que inhibe la producción hepática de globulina ligante de hormona sexual (GLHS), incrementando de esta manera los niveles biodisponibles de tanto estrógenos como andrógenos, sugiriendo modos en que la obesidad podría incrementar el riesgo de formas comunes de manifestaciones controladas por hormona sexual de cáncer, tales como el cáncer de mama y el cáncer de próstata. Cabe destacar que tanto la neurotensina como la expresión de Ntsr1 son comunes en los tumores malignos de cáncer de mama ductal y el bloqueo farmacológico experimental o el silenciamiento de ARN de NTSR1 reduce el crecimiento tumoral en ratones.

60 El nivel de expresión de receptor 1 de neurotensina (NTSR1) en células de cáncer de mama se ha utilizado para determinar el pronóstico de un sujeto que sufre de cáncer de mama (documento nº US 2011/0305633). Además, los mismos autores indican que hasta hoy no se ha descrito ninguna correlación clara entre neurotensina circulante y el estadio de los tumores de páncreas, próstata o tiroides medular, probablemente debido a la rápida eliminación por el hígado. Cabe destacar que se ha encontrado en una serie de 51 pacientes con cáncer de mama ductal invasivo que el 91% de todos los tumores eran positivos para receptor 1 de neurotensina (NTSR1) pero sólo el 31% de todos los tumores eran positivos para neurotensina en dicho tejido (Souaze et al., Cancer Research 66(12):6243-6249, 2006).

Existen pruebas de que la neurotensina y los receptores de neurotensina participan en el crecimiento del cáncer, en particular en el cáncer de pulmón, el cáncer pancreático y el cáncer de colon (Carraway et al., Peptides 27:2445-2460, 2006). Se ha informado de que los niveles de NT en sueros de pacientes con cáncer pancreático se encontraban significativamente incrementados (Picheon et al., Anticancer Research 19:1445-50, 1999).

Cabe destacar que dicho grupo encontró que los niveles de NT caían con la progresión de la enfermedad tanto en cáncer de próstata como en cáncer pancreático. En contraste con lo anterior, Meggiato et al., Tumori 82:592-5, 1996 encontraron que los niveles plasmáticos de NT eran normales en el cáncer pancreático pero elevados en el caso de un diagnóstico de pancreatitis.

La utilización de copeptina para la predicción de diabetes ha sido informada por Enhörning et al., Circulation 121:2102-2108, 2010.

Un objetivo de la presente invención era investigar el poder pronóstico y diagnóstico de NT en la predicción del riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o de diagnosticar síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético. Para resolver esta cuestión, los presentes inventores midieron fragmentos estables de proneurotensina en plasma en ayunas en dicho estudio de cohorte prospectiva sueco ('Malmö Diet and Cancer Study) y relacionaron el nivel de línea base de dicho biomarcador con la incidencia de diabetes durante 15 años de seguimiento.

Ernst A. et al. (Peptides 27:1787-1793, 2006) dan a conocer que puede identificarse la proneurotensina 1-117 en la circulación humana. Carraway R. y Leeman S.E. dan a conocer un radioinmunoensayo para la neurotensina (J. Biol. Chem. 251(22):7035-7044). Hirsch Fernstrom M. et al. dan a conocer niveles de neurotensina inmunorreactivos en el páncreas de ratas y ratones diabéticos (Metabolismo 30(9):853-855). La patente n° US 5.430.047 da a conocer antagonistas de neurotensina. Watanabe S. et al. comentan "Metabolic Syndrome and gastrointestinal diseases" (J. Gastroenterol. 42:267-274, 2007). Wolosin J.D. y Edelman S.V. comentan "Diabetes and the Gastrointestinal tract", Clinical Diabetes 18(4):148-151, 2000. El documento EP 0 289 287 A2 se refiere a péptidos amiloides.

El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para diagnosticar síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético, comprendiendo las etapas siguientes:

- determinar el nivel de proneurotensina 1-117 que consiste en la SEC ID n° 5 o proneurotensina 1-117 que comprende péptidos con un inmunoensayo o determinar el nivel de proneurotensina 1-117 en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, en el que dichos péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 se seleccionan de entre el grupo que comprende la SEC ID n° 1, SEC ID n° 2 y SEC ID n° 6, y
- correlacionar dicho nivel de proneurotensina-117 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 con el riesgo de dicho sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo incrementado de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o en el que un nivel elevado se correlaciona con el diagnóstico de síndrome metabólico en un sujeto en el que dicho sujeto es no diabético.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo humano o no humano vivo. Preferentemente en la presente memoria el sujeto es un sujeto humano. En una forma de realización específica de la invención, dicho sujeto es un sujeto femenino. En una forma de realización específica de la invención, dicho sujeto es un sujeto sin glucosa en ayunas alterada (IFG, no prediabético).

En una forma de realización de la invención, el nivel de proneurotensina 1-117 que consiste en la SEC ID n° 5 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 en un líquido corporal es el nivel en ayunas de dicha proneurotensina 1-117 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117, en el que dichos péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 se seleccionan de entre el grupo que comprende la SEC ID n° 1, SEC ID n° 2 y SEC ID n° 6. El nivel en ayunas se refiere a la falta de ingesta de alimento 12 h antes de la extracción de sangre.

El nivel de proneurotensina 1-117 que consiste en la SEC ID n° 5 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino que es predictivo de riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico es liberado a partir del intestino delgado, en el que dichos péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 se seleccionan de entre el grupo que comprende la SEC ID n° 1, SEC ID n° 2 y SEC ID n° 6. La liberación de neurotensina a partir del intestino delgado resulta estimulada por la ingesta de alimento, especialmente por grasas, y es conocido que regula la motilidad gastrointestinal y la secreción pancreática y biliar. La proneurotensina 1-117 o los péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se ha definido anteriormente se utilizan como marcador sustitutivo de la neurotensina liberada ya que la neurotensina y la proneurotensina 1-117 o los péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han

definido anteriormente se liberan en cantidades equimolares a partir de la proneurotensina.

5 Es un resultado inesperado de la presente invención que la secreción periférica de neurotensina/proneurotensina 1-117 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente es indicativa de la susceptibilidad de un sujeto femenino de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico. De esta manera, las medidas dietéticas tales como la reducción de la ingesta de grasas pueden reducir dicho riesgo en dicho sujeto.

10 La correlación entre el nivel de proneurotensina 1-117 o péptidos que comprenden PNT 1-117 tal como se ha definido anteriormente en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto y el riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico es continua, es decir, a nivel más elevado, más elevado el riesgo.

En aras de la practicidad, el experto en la materia puede utilizar uno o más umbrales.

15 De esta manera, la expresión "nivel elevado" puede referirse a un nivel superior a un nivel umbral.

Un líquido corporal puede seleccionarse de entre el grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y saliva.

20 Los presentes datos sugieren una fuerte correlación entre el nivel de proneurotensina 1-117 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente, con la diabetes, en particular en sujetos sin diabetes prevalente.

25 Los presentes datos también sugieren una correlación fuerte entre el nivel de proneurotensina 1-117 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente, y la diabetes, en sujetos hipertensos, que es un grupo de alto riesgo común de enfermedad cardiovascular y/o diabetes.

30 Fragmentos de proneurotensina o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente que pueden determinarse en un líquido corporal pueden ser, por ejemplo,

SEC ID nº 1 (proneurotensina 1-147)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

35 SEC ID nº 2 (proneurotensina 1-125 (neuromedina N grande))

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVI KR KIPYIL

SEC ID nº 3 (neuromedina N)

40 KIPYIL

SEC ID nº 4 (neurotensina)

45 pyroQLYENKPRRP YIL

SEC ID nº 5 (proneurotensina 1-117)

50 SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVI

SEC ID nº 6 (proneurotensina 1-132)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
 ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
 EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY EN

5 SEC ID nº 7 (proneurotensina 1-125)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
 ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
 EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYIL

SEC ID nº 8 (proneurotensina 120-140)

10 KIPYILKRQL YENKPRRPYI L

SEC ID nº 9 (proneurotensina 120-147)

15 KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

SEC ID nº 10 (proneurotensina 128-147)

20 QLYENKPRRP YILKRDSYYY

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determinó el nivel de proneurotensina 1-117.

25 En una forma de realización específica, se midió con un inmunoensayo el nivel de proneurotensina 1-117 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente. Más específicamente, se utilizó un inmunoensayo tal como se describe en Ernst et al., Peptides 27:1787-1793, 2006.

30 Un inmunoensayo que puede resultar útil para determinar el nivel de proneurotensina 1-117 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente puede comprender las etapas descritas de manera generica en el Ejemplo 2. Todos los umbrales y valores deben considerarse a la luz del ensayo y la calibración utilizados según el Ejemplo 2. El experto en la materia podría conocer que el valor absoluto de un umbral podría verse influido por la calibración utilizada. Lo anterior significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria deben entenderse en el contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (Ejemplo 2). Un calibrador de P-NT humano se encuentra disponible de ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania. Alternativamente, el ensayo puede calibrarse con P-NT 1-117 sintético o recombinante of fragmentos del mismo (ver también Ernst et al., 2006).

40 El umbral para determinar el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para diagnosticar síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético según los métodos de la presente invención es superior a 78 pmoles/l de PNT, preferentemente 100 pmoles/l, más preferentemente 150 pmoles/l. En una forma de realización específica, dicho umbral es aproximadamente 100 pmoles/l. Estos umbrales se relacionan con el método de calibración anteriormente mencionado. Un valor de pro-NT superior a dicho umbral significa que el sujeto presenta un riesgo incrementado de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico.

45 La definición de diabetes es la siguiente: historia de diagnóstico médico o encontrarse bajo medicación antidiabética o presentar un nivel de glucosa en sangre completa en ayunas $\geq 6,1$ mmoles/l (observar que es $\approx 7,0$ mmoles/l en el plasma) en el examen basal.

50 Prediabetes, glucosa en ayunas alterada (IFG): IFG=glucosa plasmática en ayunas de entre 6,1 y 6,9 mmoles/l.

La definición de presión sanguínea normotensa/elevada (PSE) es la siguiente:

55 PSE: PS sistólica ≥ 140 mmHg o PS diastólica ≥ 90 mmHg o encontrarse bajo medicación antihipertensiva. Los sujetos con presión sanguínea normal (PS) eran todos los demás sujetos, es decir, sujetos con PS sistólica < 140 mmHg o PS diastólica < 90 mmHg o no encontrarse bajo medicación antihipertensiva.

En una forma de realización específica del método según la invención, dicho sujeto no es diabético, con glucosa sanguínea en ayunas inferior a 6,1 mmoles/l aunque superior a 5,4 mmoles/l.

En una forma de realización específica del método según la invención, dicho sujeto es un sujeto no diabético con glucosa sanguínea en ayunas igual o inferior a 5,4 mmoles/l.

- 5 En una forma de realización específica del método según la invención, se determina dicho riesgo del sujeto de desarrollar diabetes mellitus de tipo II.

10 En una forma de realización específica del método según la invención, la predicción del riesgo del sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o el diagnóstico de síndrome metabólico se mejora determinando adicionalmente y utilizando el nivel de por lo menos un parámetro de laboratorio o marcador adicional seleccionado de entre el grupo que comprende glucosa sanguínea o plasmática en ayunas, triglicéridos, colesterol-HDL o subfracciones del mismo, colesterol-LDL o subfracciones del mismo, cistatina C, insulina, proteína C-reactiva (PCR), vasopresina o precursores o fragmentos de la misma y PNC o precursores o fragmentos de la misma.

15 En una forma de realización específica del método según la invención, se determina adicionalmente por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende edad, género, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensor (TAH), índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, proporción cintura-cadera, fumador actual, diabetes, antecedentes familiares y enfermedad cardiovascular (CVD) anterior.

20 Una forma de realización adicional de la invención es un método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para diagnosticar síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de proneurotensina 1-117 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 solos o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos pronósticamente útiles se utiliza para la predicción del riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para el diagnóstico de síndrome metabólico mediante un método que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:

- 25
- 30 - comparación con la mediana del nivel de proneurotensina 117 que consiste en la SEC ID nº 5 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos, en el que dichos péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 se seleccionan de entre el grupo que comprende la SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 6,
 - 35 - comparación con un cuantil del nivel de proneurotensina 1-117 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos,
 - 40 - cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante la utilización de cálculos de índice de riesgo, tales como el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrada).

45 En una forma de realización de la invención, la muestra se selecciona de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, un amuestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras anteriormente mencionadas. En una forma de realización específica del método según la invención, el nivel de proneurotensina 1-117 o de péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 tal como se han definido anteriormente se determina mediante un ensayo diagnóstico, preferentemente mediante un inmunoensayo.

50 En una forma de realización específica del método según la invención, el método se lleva a cabo más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de adquirir diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o con el fin de monitorizar el curso del tratamiento del síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético.

55 En una forma de realización específica del método según la invención, dicha monitorización se lleva a cabo con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.

En una forma de realización específica del método según la invención, el método se utiliza con el fin de estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

60 Se da a conocer además un dispositivo de punto de atención para llevar a cabo el método según la invención.

Se da a conocer además un ensayo y/o kit para llevar a cabo el método según la invención.

65 Se da a conocer además un ligante de la neurotensina o de un receptor de neurotensina, para la utilización en la prevención o terapia de la diabetes mellitus y/o síndrome metabólico en un sujeto.

En una forma de realización de la exposición, el ligante reduce la bioactividad de la neurotensina hasta el 70% o menos.

5 El ligante de neurotensina se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos, por ejemplo IgG, una inmunoglobulina de longitud completa o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio F variable de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno), incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas de epítipo, por ejemplo, Fab-V5Sx2, Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3, Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo formado mediante multimerización con ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo mediante dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multiespecíficos multimerizados, anticuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo de una clase diferente que G, anticuerpos de dominio único, por ejemplo nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélido o de pez.

15 El ligante de un receptor de neurotensina se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos, por ejemplo IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio F variable de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno), incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas de epítipo, por ejemplo Fab-V5Sx2, Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3, Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo formado mediante multimerización con ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo mediante dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multiespecíficos multimerizados, anticuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo de una clase diferente que G, anticuerpos de dominio único, por ejemplo nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélido o pez, o un antagonista de péptido, por ejemplo [D-Trp11]-neurotensina, [Tyr(Me)11]-neurotensina (por ejemplo descrito por Quiron et al.) o un antagonista no peptídico, por ejemplo levocabastina, SR-48692 (selectivo para NTS1), SR-142948 (no selectivo), SR-142948A, CP 96345, [3H]SR-48692, SR 48692, SR-48527 and SR-49711, o un andamiaje DE ligante, por ejemplo andamiajes no Ig basados en tetranectina (por ejemplo descritos en el documento US 2010/0028995), andamiajes de fibronectina (por ejemplo descritos en la patente EP 1266 025); andamiajes basados en lipocalina (por ejemplo descritos en el documento WO 2011/154420); andamiajes de ubiquitina (por ejemplo descritos en el documento WO 2011/073214), andamiajes de transferencia (por ejemplo descritos en el documento US 2004/0023334), andamiajes de proteína A (por ejemplo descritos en la patente EP 2231860), andamiajes basados en repetición anquirina (por ejemplo descritos en el documento WO 2010/060748), andamiajes de microproteína, preferentemente microproteínas que forman un nudo de cistinas (por ejemplo descritos en la patente EP 2314308), andamiajes basados en dominio SH3 de Fyn (por ejemplo descritos en el documento WO 2011/023685) andamiajes basados en dominio EGFR-A (por ejemplo descritos en el documento WO 2005/040229) y andamiajes basados en dominio de Kunitz (por ejemplo descritos en la patente EP 1941867).

Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo de anticuerpos

Péptidos/conjugados para la inmunización:

50 Se sintetizaron péptidos para la inmunización (JPT Technologies, Berlin, Alemania) con un residuo N-terminal adicional de cisteína para la conjugación de los péptidos con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA mediante la utilización de Sulfo-SMCC (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el manual de Perbio.

55 Péptido anticuerpo marcado (AM) (P-NT 1-19):

H-CSDSEEEEMKALEADFLTNMH-NH₂

Péptido anticuerpo en fase sólida (AFS) (P-NT 44-62):

60 H-CNLNSPAEETGEVHEEELVA-NH₂

Los anticuerpos se generaron siguiendo el método siguiente:

65 se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres

días antes de llevar a cabo el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disueltos en 100 µl de solución salina, administrada en forma de una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

5 Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras el lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Los clones híbridos se seleccionaron mediante el cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% con complemento HAT]. Tras dos semanas, se sustituyó el medio HAT por medio HT durante tres pases seguido del retorno al medio de cultivo celular normal.

10 Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a cribado primario para anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas antes de la fusión. Los microcultivos con resultado positivo en el ensayo se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Tras someter a ensayo nuevamente, los cultivos seleccionados se clonaron y se clonaron nuevamente utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

15 (Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81:223-228, 1985; Ziegler B. et al., "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detected on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28:11-15, 1996).

20 Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron anticuerpos mediante métodos estándares de producción de anticuerpos (Marx et al., Monoclonal Antibody Production, ATLA 25:121, 1997) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. Las impurezas de anticuerpos eran >95% según el análisis de electroforesis en SDS-gel.

25 **Ejemplo 2**

Inmunoensayo para la cuantificación de proneurotensina humana

30 La tecnología utilizada era un inmunoensayo de luminiscencia en tubo recubierto en sándwich, basado en el marcaje con éster de acridinio.

El compuesto marcado (trazador): 100 µg (100 µl) de anticuerpo marcado (AM) (1 mg/ml en PBS, pH 7,4) se mezcló con 10 µl de éster de NHS de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (patente nº EP 0353971) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. El AM marcado se purificó mediante HPLC de filtración en gel en un Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). El AM purificado se diluyó en (fosfato de potasio 300 mmoles/l, NaCl 100 mmoles/l, Na-EDTA 10 mmoles/l, albúmina de suero bovino 5 g/l, pH 7,0). La concentración final era de aprox. 800.000 unidades relativas de luz (RLU) de compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia de éster de acridinio mediante la utilización de un AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

45 Fase sólida: se recubrieron (18 h a temperatura ambiente) tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) con SPA (1,5 µg de SPA/0,3 ml de NaCl 100 mmoles/l, Tris/HCl 50 mmoles/l, pH 7,8). Tras el bloqueo con albúmina de suero bovino al 5%, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4, y se secaron al vacío.

Calibración:

50 Se calibró el ensayo utilizando diluciones de suero humano que contenía P-NT. Se diluyó un pool de sueros humanos de elevada inmunorreactividad con P-NT (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Alemania) con suero de caballo (Biochrom AG, Alemania) (estándares de ensayo).

Se calibraron los estándares mediante la utilización del calibrador de P-NT humano (ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania). Alternativamente, el ensayo puede calibrarse con P-NT 1-117 sintético o recombinante o fragmentos del mismo (ver también Ernst et al., 2006).

Inmunoensayo de P-NT:

60 Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos con SPA, tras la adición de LA marcado (200 µl); los tubos se incubaron durante 16 a 22 h a una temperatura de entre 18°C y 25°C. Se eliminó el trazador no unido mediante el lavado 5 veces (cada vez 1 ml) con solución de lavado (PBS 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%).

El AM unido al tubo se midió mediante la utilización de LB 953.

65 La figura 1 muestra una curva típica de dosis/señal de P-NT.

Ejemplo 3

Estudio poblacional

5 Los presentes inventores midieron P-NT en plasma en ayunas procedente de 4.362 participantes de la población basado en el examen basal del estudio Malmö Diet and Cancer Study en 1991-1994 (edad de los varones 58 ± 6 años y 59% de mujeres). Se utilizaron modelos multivariantes de riesgos proporcionales de Cox ajustados (todos los factores tradicionales de riesgo cardiovascular, factores de riesgo de diabetes y en los análisis de cáncer, también los antecedentes familiares) para relacionar la P-NT basal (cociente de riesgos para cada incremento de la desviación estándar de P-NT transformado logarítmicamente) con el tiempo hasta el primer suceso de los criterios de valoración estudiados durante una mediana de tiempo de seguimiento superior a 12 años. Se obtuvieron los criterios de valoración del registro de altas del hospital nacional sueco, del registro sueco de infartos de miocardio, del registro de ictus en Malmö y del registro sueco de cáncer. La obtención de los criterios de valoración de dichos registros se validó y se encontró que era exacta.

15 Tabla 1

Características clínicas de la población total de estudio			
Estadísticas descriptivas			
	N	Media	Desviación est.
Edad en el cribado de MDCS	4.362	57,643	5,9797
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	4.362	141,91	19,158
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	4.362	87,02	9,501
Índice de masa corporal (peso/kgxkg)	4.362	25,7642	3,91173
Cintura (cm)	4.361	83,56	12,791
Glucosa (mmoles/l)	4.362	5,1826	1,33736
Triglicéridos (mmoles/l)	4.362	1,3142	0,63660
Lipoproteína de alta densidad (mmoles/l)	4.362	1,3908	0,37068
Lipoproteína de baja densidad (mmoles/l)	4.362	4,1632	0,98774
P-Insulina	4.280	7,889	7,6975
PNT [pmoles/l]	4.362	123,01743	76,746549
N válido (por lista)	4.279		

20 Tabla 2

Género					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Varones	1.803	41,3	41,3	41,3
	Mujeres	2.559	58,7	58,7	100,0
	Total	4.362	100,0	100,0	

Tabla 3

Q+Diary: tratamiento antihipertensor (C02,C03,C07,C08,C09) en la línea base según cuestionario o diario					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No	3.684	84,5	84,5	84,5
	Sí	678	15,5	15,5	100,0
	Total	4.362	100,0	100,0	

25 Tabla 4

DIAB MELL (fb >6,0 o Q DM pos)					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	no	3.993	91,5	91,5	91,5
	sí	369	8,5	8,5	100,0
	Total	4.362	100,0	100,0	

Tabla 5

Fumador_actual0					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0,00	3.212	73,6	73,6	73,6
	1,00	1.150	26,4	26,4	100,0
	Total	4.362	100,0	100,0	

Tabla 6

Características clínicas de las mujeres en el estudio			
Estadísticas descriptivas			
	N	Media	Desviación est.
Edad en el cribado de MDCS	2.559	57,554	5,9403
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	2.559	140,50	19,311
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	2.559	85,65	9,117
Índice de masa corporal (peso/kgxkg)	2.559	25,5196	4,19083
CINTURA (cm)	2.559	76,99	10,245
Glucosa (mmoles/l)	2.559	5,0418	1,21798
Triglicéridos (mmoles/l)	2.559	1,2245	0,58404
Lipoproteína de alta densidad (mmoles/l)	2.559	1,5123	0,36949
Lipoproteína de baja densidad (mmoles/l)	2.559	4,2016	1,04762
P-INSULINA	2.512	7,223	5,4223
PNT (pmoles/l)	2.559	125,60633	77,681673
N válido (por lista)	2.512		

5 Tabla 7

Q+Diary: tratamiento antihipertensor (C02,C03,C07,C08,C09) en la línea base según cuestionario o diario					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No	2.173	84,9	84,9	84,9
	Sí	386	15,1	15,1	100,0
	Total	2.559	100,0	100,0	

Tabla 8

DIAB MELL (fb >6,0 o Q DM pos)					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No	2.396	93,6	93,6	93,6
	Sí	163	6,4	6,4	100,0
	Total	2.559	100,0	100,0	

10

Tabla 9

Fumador_actual0					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0,00	1.906	74,5	74,5	74,5
	1,00	653	25,5	25,5	100,0
	Total	2.559	100,0	100,0	

15

Tabla 10

Características clínicas de los varones en el estudio			
Estadísticas descriptivas			
	N	Media	Desviación est.
Edad en el cribado de MDCS	1.803	57,769	6,0345
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	1.803	143,90	18,766
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	1.803	88,95	9,698
Índice de masa corporal (peso/kgxkg)	1.803	26,1113	3,44882
CINTURA (cm)	1.802	92,89	9,932
Glucosa (mmoles/l)	1.803	5,3825	1,46780
Triglicéridos (mmoles/l)	1.803	1,4416	0,68477
Lipoproteína de alta densidad (mmoles/l)	1.803	1,2183	0,29669
Lipoproteína de baja densidad (mmoles/l)	1.803	4,1087	0,89336
P-INSULINA	1.768	8,835	10,0090
PNT (pmoles/l)	1.803	119,34300	75,268054
N válido (por lista)	1.767		

Tabla 11

Q+Diary: tratamiento antihipertensor (C02,C03,C07,C08,C09) en la línea base según cuestionario o diario				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado

ES 2 684 512 T3

Válido	No	1.511	83,8	83,8	83,8
	Sí	292	16,2	16,2	100,0
	Total	1.803	100,0	100,0	

Tabla 12

DIAB MELL (fb >6,0 o pos Q DM)					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No	1.597	88,6	88,6	88,6
	Sí	206	11,4	11,4	100,0
	Total	1.803	100,0	100,0	

5 Tabla 13

Fumador_actual0					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0,00	1.306	72,4	72,4	72,4
	1,00	497	27,6	27,6	100,0
	Total	1.803	100,0	100,0	

Tabla 14

CUARTILES DE PNT EN TODOS: PNT (pmoles/l)				
Grupo percentil de PNT pmoles/l	N	Mediana	Mínimo	Máximo
1	1.091	60,22000	3,270	75,740
2	1.090	89,29000	75,790	104,600
3	1.092	122,67000	104,640	147,610
4	1.089	190,03000	147,660	1.154,520
Total	4.362	104,62000	3,270	1.154,520

10

Tabla 15

CUARTILES DE PNT EN MUJERES: PNT (pmoles/l)				
Grupo percentil de PNT pmoles/l	N	Mediana	Mínimo	Máximo
1	639	62,37000	5,100	78,580
2	639	92,07000	78,610	108,770
3	641	125,07000	108,960	150,000
4	640	194,38500	150,050	1.154,520
Total	2.559	108,96000	5,100	1.154,520

Las concentraciones en cada cuartil eran prácticamente idénticas en todos los análisis de subgrupo de mujeres mostrados.

Tabla 16

15

CUARTILES DE PNT EN VARONES: PNT (pmoles/l)				
Grupo percentil de PNT pmoles/l	N	Mediana	Mínimo	Máximo
1	450	58,02000	3,270	70,800
2	451	85,88000	70,970	98,820
3	451	118,18000	98,880	143,940
4	451	186,39000	144,180	1.057,360
Total	1.803	98,88000	3,270	1.057,360

Las concentraciones en cada cuartil eran prácticamente idénticas en todos los análisis de subgrupo de varones mostrados.

P-NT y predicción de diabetes mellitus

5 Entre los sujetos sin diabetes mellitus en la línea base, 142 desarrollaron diabetes mellitus de nueva aparición durante un tiempo de seguimiento medio de $12,7 \pm 2,2$ años. Tras el ajuste para los niveles basales de todos los factores de riesgo de diabetes (edad, género, tratamiento antihipertensor, presión sanguínea sistólica, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, tabaquismo, enfermedad cardiovascular anterior y concentraciones en ayunas de glucosa sanguínea, triglicéridos, insulina, HDL y LDL), cada incremento de desviación estándar (SD) de P-NT basal confirió un cociente de riesgos (intervalo de confianza al 95%) de 1,28 (1,09 a 1,50) (P=0,003) para el riesgo de diabetes de nueva aparición. En un subgrupo de sujetos sin prediabetes (glucosa en ayunas alterada, IFG), el cociente de riesgos para diabetes incidente por cada incremento de 1 SD de P-NT se incrementó adicionalmente: 1,48 (1,17 a 1,86) (P=0,001).

P-NT se encontraba asociada independientemente con diabetes de nueva aparición.

15 Tabla 17. POBLACIÓN TOTAL (VARONES Y MUJERES)

Variables en la ecuación								
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	IC al 95,0% para Exp(B)	
							Inferior	Superior
SEXO	0,748	0,296	6,404	1	0,011	2,112	1,184	3,770
EDAD	0,004	0,015	0,058	1	0,809	1,004	0,974	1,034
AHT_B	0,385	0,197	3,807	1	0,051	1,470	0,998	2,165
SBP_B	0,003	0,005	0,297	1	0,586	1,003	0,993	1,012
CINTURA_B	0,036	0,016	4,937	1	0,026	1,037	1,004	1,071
IMC_B	-0,010	0,041	0,053	1	0,817	0,991	0,914	1,074
GLUCOS_B	2,330	0,223	109,419	1	0,000	10,273	6,640	15,895
HDL_B	-0,625	0,310	4,063	1	0,044	0,535	0,292	0,983
LDL_B	-0,020	0,089	0,051	1	0,821	0,980	0,823	1,167
LNINS	0,023	0,185	0,016	1	0,900	1,024	0,712	1,471
Fumador actual0	0,311	0,190	2,692	1	0,101	1,365	0,941	1,981
pr_cv_2008	0,062	0,450	0,019	1	0,891	1,063	0,440	2,570
ZLN_PNT	0,239	0,081	8,705	1	0,003	1,270	1,083	1,488

Tabla 18

SÓLO MUJERES								
Variables en la ecuación ^b								
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	IC al 95,0% para Exp(B)	
							Inferior	Superior
SEXO				0a				
EDAD	0,007	0,022	0,102	1	0,750	1,007	0,965	1,051
AHT_B	0,208	0,276	0,568	1	0,451	1,232	0,717	2,117
SBP_B	-0,001	0,007	0,011	1	0,918	0,999	0,986	1,013
CINTURA_B	0,057	0,021	7,100	1	0,008	1,059	1,015	1,104
IMC_B	-0,062	0,055	1,269	1	0,260	0,940	0,845	1,047
GLUCOS_B	2,359	0,296	63,676	1	0,000	10,578	5,927	18,881
HDL_B	-0,318	0,378	0,707	1	0,400	0,728	0,347	1,526
LDL_B	-0,078	0,117	0,443	1	0,506	0,925	0,736	1,163
LNINS	-0,119	0,254	0,220	1	0,639	0,888	0,540	1,460
Fumador actual0	0,225	0,264	0,727	1	0,394	1,253	0,746	2,103
pr_cv_2008	-0,414	0,979	0,179	1	0,672	0,661	0,097	4,502
ZLN_PNT	0,315	0,114	7,703	1	0,006	1,371	1,097	1,713
SEXO				0a				
EDAD	0,007	0,022	0,102	1	0,750	1,007	0,965	1,051
AHT_B	0,208	0,276	0,568	1	0,451	1,232	0,717	2,117
SBP_B	-0,001	0,007	0,011	1	0,918	0,999	0,986	1,013
CINTURA_B	0,057	0,021	7,100	1	0,008	1,059	1,015	1,104
IMC_B	-0,062	0,055	1,269	1	0,260	0,940	0,845	1,047
GLUCOS_B	2,359	0,296	63,676	1	0,000	10,578	5,927	18,881

HDL_B	-0,318	0,378	0,707	1	0,400	0,728	0,347	1,526
LDL_B	-0,078	0,117	0,443	1	0,506	0,925	0,736	1,163
LNINS	-0,119	0,254	0,220	1	0,639	0,888	0,540	1,460
Fumador_actual0	0,225	0,264	0,727	1	0,394	1,253	0,746	2,103
pr_cv_2008	-0,414	0,979	0,179	1	0,672	0,661	0,097	4,502
ZLN_PNT	0,315	0,114	7,703	1	0,006	1,371	1,097	1,713

- a. Grados de libertad reducidos debido a covariables constantes o linealmente dependientes.
 b. Covariables constantes o linealmente dependientes SEXO=2.

5 De entre los sujetos sin glucosa en ayunas alterada y diabetes mellitus en la línea base, 68 sujetos desarrollaron diabetes de nueva aparición durante el seguimiento y después del ajuste total para factores de riesgo de diabetes, cada incremento de SD de P-NT se asoció a un cociente de riesgos de 1,48 (1,17 a 1,87) (P=0,001) para el riesgo de diabetes mellitus de nueva aparición en la población total, 1,47 (1,08 a 2,00) (P=0,014) en mujeres y 1,56 (1,08 a 2,27) (P=0,019) en varones. De todos los factores de riesgo de diabetes introducidos en el modelo de regresión multivariable de Cox, sólo los niveles de línea base de glucosa sanguínea en ayunas presentaban una relación estadística más fuerte con diabetes mellitus de nueva aparición que P-NT.

15 Figura 2: análisis de Kaplan-Meier de la predicción de diabetes

2a) Todos los sujetos sin diabetes utilizando la mediana de valor de corte (104,6 pmoles/l)

2b) Todos los sujetos sin diabetes y prediabetes (IFG), valor de corte (104,6 pmoles/l).

20 Análisis de subgrupos

Utilizando las mismas variables en la ecuación, los presentes inventores investigaron diferentes subgrupos para la predicción de diabetes; se excluyeron los sujetos con diabetes en la línea base.

25 Tabla 19

Subgrupo	Nº de sujetos	Nº de sucesos	Cociente de riesgos para 1SD PNT	Significancia (valor de p)
Todos	3704	142	27,8%	0,003
Todos sin glucosa en ayunas no alterada	3102	64	47,9	0,001
Mujeres sin glucosa en ayunas no alterada	1950	38	47%	0,014
Varones sin glucosa en ayunas no alterada (GAnA)	1152	26	56,5%	0,019
PSE mujeres	1318	53	52,5%	0,002
PSE mujeres sin GAnA	1119	25	58,4%	0,02
Mujeres normotensas	1014	46	40,1%	0,014
Mujeres normotensas sin GAnA	1014	12	125%	0,001

P-NT es significativamente predictivo de desarrollo de diabetes. El poder predictivo de P-NT era más fuerte en sujetos sin IFG (prediabetes).

30 Descripción de las figuras:

La figura 1 muestra una curva típica de dosis/señal de P-NT.

35 Figura 2: análisis de Kaplan-Meier de la predicción de diabetes.

2a) Todos los sujetos sin diabetes utilizando una mediana del valor de corte (104,6 pmoles/l).

2b) Todos los sujetos sin diabetes y prediabetes (IFG), valor de corte (104,6 pmoles/l).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer la diabetes mellitus y/o el síndrome metabólico o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético, que comprende las etapas siguientes:
- 10 • determinar el nivel de proneurotensina 1-117 que consiste en SEC ID nº 5 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 con un inmunoensayo o determinar el nivel de proneurotensina 1-117 en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, en el que dichos péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 se seleccionan de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 6; y
 - 15 • correlacionar dicho nivel de proneurotensina 1-117 o péptidos que comprenden proneurotensina 1-117 con el riesgo de dicho sujeto de contraer la diabetes mellitus y/o el síndrome metabólico, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo aumentado de presentar diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, o en el que un nivel elevado correlaciona con el diagnóstico de síndrome metabólico en un sujeto, en el que dicho sujeto es no diabético.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un sujeto no prediabético (no IFG).
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que se determina el nivel en ayunas de la proneurotensina 1-117 o de los péptidos que comprenden la proneurotensina 1-117.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se determina el nivel de la proneurotensina 1-117.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto es un no diabético con glucosa sanguínea en ayunas inferior a 6,1 mmoles/l pero superior a 5,4 mmoles/l.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho sujeto es un sujeto con glucosa sanguínea en ayunas igual o inferior a 5,4 mmoles/l.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se determina el riesgo del sujeto de desarrollar diabetes mellitus de tipo II.
- 35 8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que se determina adicionalmente por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende edad, género, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensor (AHT), índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, proporción de cintura-cadera, fumador actual, herencia de diabetes y enfermedad cardiovascular (CVD) anterior.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra se selecciona de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente.
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho método se lleva a cabo más de una vez para monitorizar el riesgo de presentar diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para monitorizar el curso del tratamiento del síndrome metabólico en un sujeto en el que dicho sujeto es no diabético.
- 50 11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha monitorización se lleva a cabo para evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

Figura 1

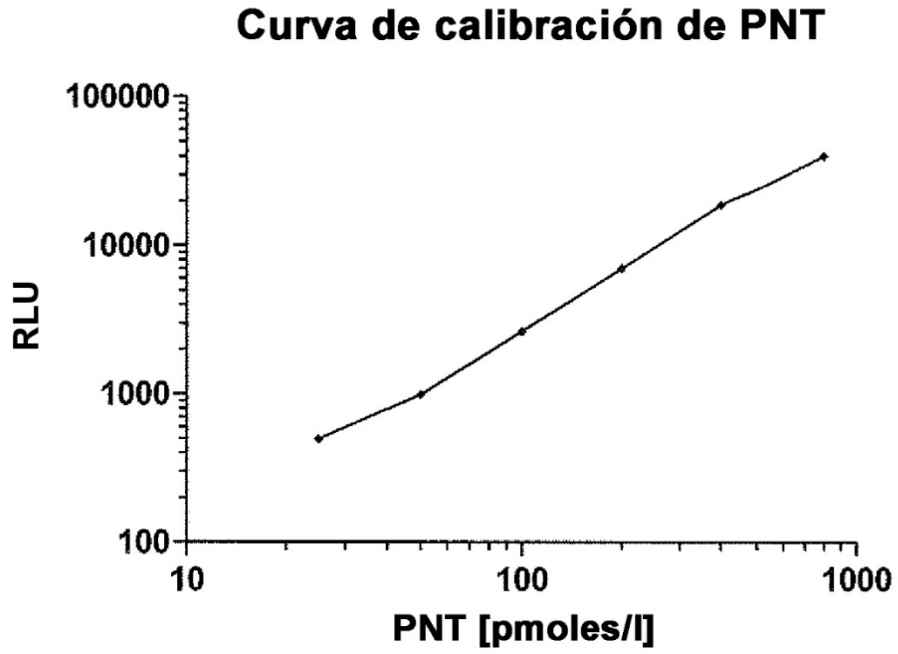


Figura 2a

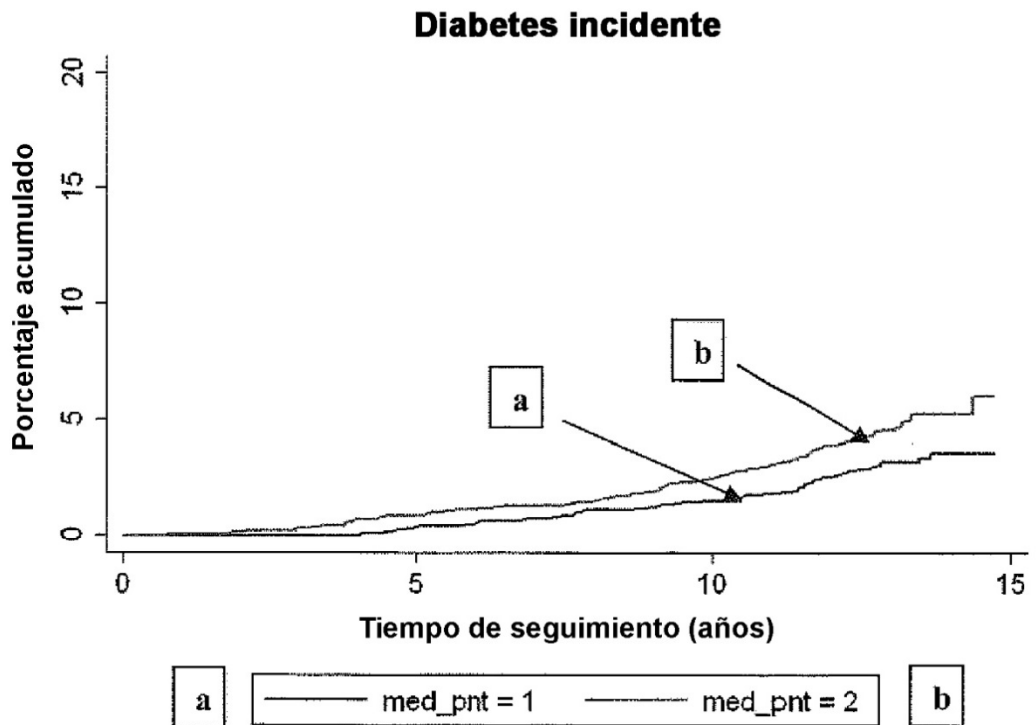


Figura 2b

