

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 135**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014 PCT/IB2014/059278**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014 E 14715412 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2972385**

54 Título: **Sistema y método para determinar el riesgo de diabetes sobre la base de análisis de marcador bioquímico**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201313836256**

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

**16.10.2018**

73 Titular/es:

**WALLAC OY (100.0%)  
P.O. Box 10  
20101 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**HURSKAINEN, PERTTI;  
KORPIMÄKI, TEEMU;  
KOURU, HEIKKI y  
SAIRANEN, MIKKO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 686 135 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

Sistema y método para determinar el riesgo de diabetes sobre la base de análisis de marcador bioquímico

**Antecedentes**

5 La diabetes mellitus gestacional (DMG) aqueja aproximadamente al 5-12 % de los embarazos. Si no se trata, las repercusiones de la DMG pueden ser graves para la madre y el hijo. Las madres con DMG son más susceptibles a preeclampsia durante el embarazo y a desarrollar diabetes tipo 2 tras el embarazo, y los hijos tienen un mayor riesgo de peso elevado al nacer, complicaciones en el parto, poco azúcar en sangre o ictericia al nacer, y mayor probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2 y obesidad. Si se diagnostica pronto, la DMG es susceptible de tratamiento; sin embargo, como la DMG puede ser asintomática hacia el exterior, a menudo no es detectada hasta que se realizan pruebas tradicionales tales como niveles de glucosa en sangre después de que ha empezado el segundo o tercer trimestre de embarazo. El documento WO2005/017192 describe el uso de citocinas para determinar si una persona embarazada tiene predisposición a diabetes mellitus gestacional. Existe la necesidad de pruebas, sistemas y métodos para predecir el riesgo de desarrollo de DMG durante el embarazo.

**Compendio**

15 La presente invención está relacionada con métodos, sistemas y un medio no transitorio legible por ordenador según las reivindicaciones. La presente descripción se dirige a métodos, aparatos, perfiles médicos y kits útiles para determinar el riesgo de que una persona embarazada desarrolle diabetes mellitus gestacional (DMG). Como se describe, este riesgo puede ser determinado sobre la base de las cantidades de uno o más de los marcadores bioquímicos de inhibidor del activador del plasminógeno 2 (PAI-2) y, opcionalmente, receptor de factor de necrosis tumoral soluble 1 (sTNFR1) presente en una muestra biológica tomada de la persona embarazada. Cuando se determina el riesgo de DMG según métodos descritos en esta memoria también se pueden usar marcadores bioquímicos, marcadores biofísicos, parámetros de historial maternal, parámetros demográficos maternos, y/o mediciones biofísicas maternas adicionales.

25 En esta memoria también se describen métodos, aparatos, perfiles médicos y kits útiles para determinar el riesgo de que una persona tenga o desarrolle diabetes Tipo 2. Como se describe, este riesgo puede ser determinado sobre la base de las cantidades de uno o más de los marcadores bioquímicos PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1 presentes en una muestra biológica tomada de la persona. Cuando se determina el riesgo de DMG según métodos descritos en esta memoria también se pueden usar marcadores bioquímicos, marcadores biofísicos, parámetros de historial del paciente, parámetros demográficos del paciente y/o mediciones biofísicas del paciente adicionales.

30 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un método según la reivindicación 1 para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada.

En algunas realizaciones, la persona embarazada no ha sido diagnosticada previamente como diabética. La diferencia puede incluir al menos uno de un valor umbral y una diferencia porcentual. La predicción se puede basar en parte en al menos un factor de historial maternal de la persona embarazada. El al menos un factor de historial maternal puede incluir uno de una edad gestacional, un peso, un IMC, un estado de historial familiar, una raza, y un estado de fumador.

35 En realizaciones preferidas, el uno o más biomarcadores medidos incluye PAI-2, y la etapa de identificación incluye identificar, mediante el procesador del dispositivo informático, si el nivel medido de PAI-2 difiere en al menos una cantidad umbral correspondiente respecto a un nivel de control predeterminado de PAI-2. El uno o más biomarcadores medidos puede incluir PAI-2, y la etapa de identificación puede incluir identificar, mediante el procesador del dispositivo informático, si una puntuación basada al menos en parte en el nivel medido de PAI-2 es indicativa del riesgo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

40 Se describe en donde el uno o más biomarcadores medidos incluye sTNFR1, y la etapa de identificación incluye identificar, mediante el procesador del dispositivo informático, si el nivel de sTNFR1 medido difiere en al menos una cantidad umbral correspondiente respecto a un nivel de control predeterminado de sTNFR1. El uno o más biomarcadores medidos puede incluir sTNFR1, y la etapa de identificación puede incluir identificar, mediante el procesador del dispositivo informático, si una puntuación basada al menos en parte en el nivel medido de sTNFR1 es indicativa del riesgo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

45 En algunas realizaciones, el uno o más biomarcadores medidos incluyen PAI-2 y sTNFR1, y la etapa de identificación incluye: identificar, mediante el procesador del dispositivo informático, al menos uno de (i) a (iii): (i) si el nivel medido de PAI-2 difiere en al menos una cantidad umbral correspondiente respecto a un nivel de control predeterminado de PAI-2, (ii) si el nivel de sTNFR1 medido difiere en al menos una cantidad umbral correspondiente respecto a un nivel de control predeterminado de sTNFR1, y (iii) si una puntuación basada en al menos el nivel medido de PAI-2 y el nivel de sTNFR1 es indicativa del riesgo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

50 En algunas realizaciones, determinar la predicción incluye calcular una puntuación de evaluación de riesgo. La puntuación de evaluación de riesgo puede incluir un valor de riesgo proporcional. La puntuación de evaluación de riesgo puede incluir una puntuación numérica de riesgo asignada en una escala.

En algunas realizaciones, un primer biomarcador del uno o más biomarcadores medidos es PAI-2, y la predicción es positiva basada al menos en parte en identificar que un nivel de PAI-2 refleja una disminución estadísticamente significativa en comparación con un nivel de control respectivo.

5 Se describe que el primer biomarcador del uno o más biomarcadores medidos puede ser sTNFR1, y la predicción puede ser positiva basada al menos en parte en identificar que un nivel de sTNFR1 refleja un aumento estadísticamente significativo en comparación con un nivel de control respectivo.

10 En algunas realizaciones, la persona embarazada está dentro de una fase de primer trimestre de embarazo en el momento de obtener la muestra de sangre. La fase de primer trimestre puede ir de cuarenta y dos días desde la concepción a noventa y siete días desde la concepción. La muestra de sangre puede incluir una de una muestra de plasma y una muestra de suero. Medir el uno o más marcadores bioquímicos puede incluir realizar un inmunoensayo. Medir el uno o más marcadores bioquímicos puede incluir aplicar análisis de espectrometría de masas. Medir el uno o más marcadores bioquímicos puede incluir determinar una concentración de cada marcador bioquímico respectivo. Medir el uno o más marcadores bioquímicos puede incluir determinar una cantidad de cada marcador bioquímico respectivo.

15 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un sistema para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada que incluye un kit de diagnosis in vitro que incluye instrumentos de prueba para probar si hay uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada, donde el uno o más marcadores bioquímicos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1. El sistema puede incluir un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, donde las  
20 instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provoca que el procesador recupere uno o más niveles de biomarcador, donde cada nivel de biomarcador del uno o más niveles de biomarcador corresponden a un marcador bioquímico probado para usar el kit de diagnosis in vitro, y donde el recuperado uno o más niveles de biomarcador incluyen un nivel de biomarcador para PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1. Las instrucciones, cuando son ejecutadas, puede provocar que el procesador calcule una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo  
25 de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG, donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente.

30 En algunas realizaciones, las instrucciones provocan que el procesador acceda, antes de calcular la puntuación de evaluación de riesgo, a al menos un factor de historial maternal de la persona embarazada. Acceder a al menos un factor de historial maternal de la persona embarazada puede incluir provocar la presentación de una interfaz gráfica de usuario en un dispositivo de exposición, donde la interfaz gráfica de usuario incluye uno o más campos de entrada para enviar información de factor de historial maternal en relación con la persona embarazada. Acceder a al menos un factor de historial maternal de la persona embarazada puede incluir importar, de un expediente médico electrónico, el al menos un factor de historial maternal.

35 En algunas realizaciones, las instrucciones provocan que el procesador provoque, tras calcular la puntuación de evaluación de riesgo, la presentación de la puntuación de evaluación de riesgo en un dispositivo de exposición. Provocar la presentación de la puntuación de evaluación de riesgo puede incluir provocar la presentación de información de evaluación de riesgo. Los instrumentos de prueba pueden incluir al menos un anticuerpo anti-PAI-2 y, opcionalmente, un anticuerpo anti-sTNFR1. Los instrumentos de prueba pueden incluir uno o más de un tampón de ensayo, una placa recubierta, un trazador, y calibradores.

40 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un método para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada, el método incluye medir uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada para determinar uno o más niveles de biomarcador, donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, y calcular, mediante el procesador, una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada  
45 de tener o estar desarrollando DMG, donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente.

50 En algunas realizaciones, medir el uno o más marcadores bioquímicos incluye aplicar análisis de espectrometría de masas. Medir el uno o más marcadores bioquímicos puede incluir realizar un inmunoensayo. Calcular la puntuación de evaluación de riesgo puede incluir normalizar la comparación del nivel de biomarcador y el nivel de control predeterminado correspondiente sobre la base de uno o más valores demográficos maternos. Normalizar la comparación puede incluir aplicar un análisis estadístico múltiple de medianas. Calcular la puntuación de evaluación de riesgo puede incluir normalizar la comparación del nivel de biomarcador y el nivel de control predeterminado correspondiente sobre la base de uno o más atributos biofísicos maternos.

55 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provocan que el procesador acceda a mediciones de uno o más marcadores bioquímicos, donde las mediciones fueron obtenidas probando niveles de marcador bioquímico en una muestra de sangre obtenida de una persona embarazada, y el uno o más marcadores bioquímicos medidos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, y calcular una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando

diabetes mellitus gestacional (DMG), donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente.

5 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un sistema para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada que incluye un kit de diagnóstico in vitro que incluye instrumentos de prueba para probar si hay uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada, donde el uno o más marcadores bioquímicos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, y un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provocan que el procesador recupere uno o más niveles de biomarcador, donde cada nivel de biomarcador del uno o más niveles de biomarcador corresponde a un marcador bioquímico probado para usar el kit de diagnóstico in vitro, y donde el recuperado uno o más niveles de biomarcador incluye un nivel de biomarcador para PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, e identificar, para cada uno del uno o más marcadores bioquímicos medidos, una diferencia entre el nivel de biomarcador medido y un nivel de control predeterminado correspondiente, y, en respuesta a la identificación, determinar una predicción correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

15 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provocan que el procesador acceda a mediciones de uno o más marcadores bioquímicos, donde las mediciones fueron obtenidas probando niveles de marcador bioquímico en una muestra de sangre obtenida de una persona embarazada, y el uno o más marcadores bioquímicos medidos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, identificar, para cada uno del uno o más marcadores bioquímicos medidos, una diferencia entre el nivel de biomarcador medido y un nivel de control predeterminado correspondiente, y, en respuesta, a la identificación, determinar una predicción correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

25 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un método para predecir el riesgo de diabetes Tipo 2 en una persona, el método incluye medir uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona para determinar uno o más niveles de biomarcador, donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, y calcular, mediante un procesador de un dispositivo informático, una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona de tener o estar desarrollando diabetes Tipo 2, donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente.

30 En un aspecto, la presente descripción está relacionada con un método para predecir el riesgo de diabetes Tipo 2 en una persona, el método incluye medir uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona para determinar uno o más niveles de biomarcador, donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos incluye PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1, identificar, mediante un procesador de un dispositivo informático, para cada uno del uno o más marcadores bioquímicos medidos, una diferencia entre el nivel de biomarcador medido y un nivel de control predeterminado correspondiente, y, en respuesta, a la identificación, determinar, mediante el procesador, una predicción correspondiente a un riesgo relativo de la persona de tener o estar desarrollando diabetes Tipo 2.

### Breve descripción de las figuras

40 Los objetos, aspectos, rasgos y ventajas anteriores y otros de la presente descripción se harán más evidentes y se entenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 es un trazado de caja de múltiplo de la mediana (MoM) de PAI-2 en dos grupos de resultado de embarazo: control y diabetes mellitus gestacional;

la figura 2 es una Curva de Rendimiento Diagnóstico (ROC, *Receiver Operation Characteristic*) para la predicción de diabetes mellitus gestacional usando el marcador bioquímico PAI-2;

45 la figura 3 es una Curva de Rendimiento Diagnóstico (ROC, *Receiver Operation Characteristic*) para la predicción de diabetes mellitus gestacional usando el marcador bioquímico sTNFR1;

las figuras 4A a 4D son Curvas de Rendimiento Diagnóstico (ROC) que manifiestan diversas combinaciones del marcador bioquímico PAI-2, el marcador bioquímico sTNFR1, y evaluación basada en demografía de uno o los dos marcadores bioquímicos PAI-2 y sTNFR1 en la predicción de diabetes mellitus gestacional;

50 la figura 5 es un diagrama de flujo de un ejemplo de método para determinar una predicción correspondiente a un riesgo relativo de una persona embarazada de tener o estar desarrollando diabetes mellitus gestacional; y

la figura 6 es un diagrama de bloques de un dispositivo informático y un dispositivo informático móvil.

55 Los rasgos y ventajas de la presente descripción se harán más evidentes a partir de la descripción detallada presentada más adelante cuando se tome conjuntamente con los dibujos, en los que caracteres de referencia semejantes identifican elementos correspondientes por todo. En los dibujos, números de referencia semejante

generalmente indican elementos idénticos, funcionalmente similares y/o estructuralmente similares.

### Descripción detallada

5 En algunas implementaciones, la presente descripción se puede dirigir a métodos, aparatos, perfiles médicos y kits útiles para determinar el riesgo de que una persona embarazada desarrolle diabetes mellitus gestacional (DMG). Como se describe, este riesgo puede ser determinado sobre la base de las cantidades de uno o más de los marcadores bioquímicos inhibidor del activador del plasminógeno 2 (PAI-2) y receptor de factor de necrosis tumoral soluble 1 (sTNFR1) presente en una muestra biológica tomada de la persona embarazada. Cuando se determina el riesgo de DMG según métodos descritos en esta memoria también se pueden usar marcadores bioquímicos, marcadores biofísicos, parámetros de historial maternal, parámetros demográficos maternos, y/o mediciones biofísicas maternas adicionales.

15 En esta memoria también se describen métodos, aparatos, perfiles médicos y kits útiles para determinar el riesgo de que una persona tenga o desarrolle diabetes Tipo 2. Como se describe, este riesgo puede ser determinado sobre la base de las cantidades de uno o más de los marcadores bioquímicos PAI-2 y sTNFR1 presentes en una muestra biológica tomada de la persona. Cuando se determina el riesgo de DMG según métodos descritos en esta memoria también se pueden usar marcadores bioquímicos, marcadores biofísicos, parámetros de historial del paciente, parámetros demográficos del paciente y/o mediciones biofísicas del paciente adicionales.

20 Como se describe en los Ejemplos 1 y 2, se realizó análisis estadístico de una población clínica, revelando cada uno de marcadores bioquímicos PAI-2 y sTNFR1 que eran notablemente eficaces para determinar el riesgo de DMG con detección y tasas de falsos positivos clínicamente aceptables. Como se emplea en esta memoria la "% de detección" es la proporción expresada en porcentaje de personas afectadas (por ejemplo, positivo en DMG) con un resultado positivo. El "% de falso positivo" es la proporción expresada en porcentaje de personas no afectadas con un resultado positivo. La potencia predictiva de un marcador o combinación del mismo se expresa comúnmente desde el punto de vista de la tasa de detección para una tasa dada de falsos positivos.

25 Para mejorar la evaluación de riesgo, en algunas implementaciones, se pueden considerar varios factores relacionados con riesgo en combinación con la evaluación de niveles de marcador bioquímico de una persona. Por ejemplo, un algoritmo para predecir el riesgo de tener o estar desarrollando DMG puede implicar uno o más de marcadores bioquímicos adicionales, parámetros de historial de paciente, parámetros demográficos de paciente, y/o mediciones biofísicas de paciente. Parámetros de historial de paciente, en algunos ejemplos, pueden incluir paridad, historial de fumador, condiciones médicas pasadas, e historial familiar de diabetes gestacional y/o Tipo 2. Parámetros demográficos de paciente, en algunos ejemplos, pueden incluir edad, etnia, medicaciones actuales, y vegetarianismo. Mediciones biofísicas de paciente, en algunos ejemplos, pueden incluir peso, índice de masa corporal (IMC), presión arterial, ritmo cardíaco, niveles de colesterol, niveles de triglicéridos, condiciones médicas (p. ej., síndrome metabólico, resistencia a la insulina, aterosclerosis, enfermedad renal, enfermedad cardíaca, acantosis pigmentaria, síndrome de ovario poliquístico), y edad gestacional.

35 La selección de uno o ambos marcadores bioquímicos PAI-2 y sTNFR1 para usar en un entorno clínico u otro laboratorio puede depender de una variedad de consideraciones prácticas, incluidas los equipos médicos disponibles y reactivos a pruebas con marcador bioquímico en el entorno particular.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "diabetes mellitus gestacional" se refiere a una condición en una persona embarazada caracterizada por intolerancia a glucosa y/o reducida actividad de la insulina.

40 En casos donde se determina que una persona embarazada tiene mayor riesgo de desarrollar DMG usando un método como se describe en la presente memoria, la persona puede recibir de un prestador de asistencia sanitaria terapia o consejos sobre el estilo de vida. Por ejemplo, un prestador de asistencia sanitaria puede prescribir medicación que incluye uno o más de meglitinida (p. ej., repaglinida, nateglinida), a sulfonilurea (p. ej., glipizida, glimepirida, gliburida) a inhibidor de dipeptidyl peptidasa-4 (p. ej., saxagliptin, sitagliptin, linagliptin), una biguanida (p. ej., metformina), a tiazolidinediona (p. ej., rosiglitazona, pioglitazona), un inhibidor de alfa-glucosidasa (p. ej., acarbosa, miglitol), un imitador de polipéptido amiloide de islotes (p. ej., pramlintida), un imitador de incretina (p. ej., exenatida, liraglutida), y una insulina. Adicionalmente, o como alternativa, un prestador de asistencia sanitaria puede recomendar un cambio en la dieta o mayor nivel de ejercicio.

50 Los Ejemplos 1 y 2 describen que el riesgo de DMG puede ser determinado usando marcadores bioquímicos particulares, usando muestras de sangre que fueron recogidas dentro del primer trimestre de embarazo (p. ej., hasta 14 semanas de gestación). Así, para uso en los métodos para detectar DMG, se puede recoger una muestra entre aproximadamente 9 y 37 semanas de gestación, inclusive, incluido entre aproximadamente 9 y 14 semanas, inclusive, y más generalmente, antes de aproximadamente 14 semanas, dentro del primer trimestre tras aproximadamente 9 semanas, dentro del segundo trimestre y dentro de tercer trimestre. Aunque pruebas tempranas a menudo son una política beneficiosa desde una perspectiva de salud pública, se entiende que la recogida de muestras a veces puede verse afectada por consideraciones prácticas tales como una mujer que se retrasa en una visita a su prestador de asistencia sanitaria hasta semanas relativamente tardías de gestación.

En ciertas circunstancias, se pueden recoger muestras biológicas en más de una ocasión de una persona embarazada,

por ejemplo, cuando su puntuación de evaluación de riesgo requiere monitorización para desarrollo de DMG debido a un riesgo a priori, presentación de síntomas y/u otros factores. Los métodos para determinar el riesgo de DMG descritos en esta memoria también se pueden usar para monitorizar una persona embarazada que está sometido a una terapia o tratamiento para una condición prediabética. Si se desea, se pueden realizar pruebas de marcadores bioquímicos en un entorno doméstico, tal como usando formatos de prueba bioquímica de varilla de inmersión para uso doméstico y un dispositivo informático personal para interpretar los resultados. Los métodos para determinar el riesgo de DMG en una persona embarazada implican determinar la cantidad de PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1.

Los métodos para determinar el riesgo de DMG en una persona embarazada implican usar una muestra biológica de la persona embarazada. La muestra biológica puede ser cualquier fluido corporal o muestra de tejido que contenga los marcadores bioquímicos seleccionados. Los Ejemplos 1 y 2 describen el uso de sangre maternal en forma de plasma. La elección de muestra biológica a menudo puede depender de los formatos de ensayo disponibles en un laboratorio clínico particular para probar cantidades de marcadores. Por ejemplo, algunos formatos de ensayo carecen de sensibilidad necesaria para estudiar sangre completa, de manera que un laboratorio clínico opta por probar un fracción de sangre, tal como suero, o usando sangre desecada. Muestras biológicas ejemplares útiles para los métodos descritos en esta memoria incluyen sangre, productos de sangre purificada (tales como suero, plasma, etc.), orina, fluido amniótico, una biopsia de villus coriónico, una biopsia placentaria y fluido cervicovaginal. Las cantidades de marcadores bioquímicos presentes en una muestra biológica se pueden determinar usando cualquier formato de ensayo adecuado para medir proteínas en muestras biológicas. Un formato de ensayo común para esta finalidad es el inmunoensayo, incluidos, por ejemplo, inmunoensayos enzimáticos (EIA) tales como técnica de inmunoensayo multiplicado de enzimas (EMIT), ensayo inmunoabsorbente vinculado a enzima (ELISA), ELISA de captura de anticuerpo IgM (MAC ELISA), e inmunoensayo enzimático de micropartícula (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA); inmunoensayo fluorescente de lantánido mejorado por disociación (DELFI) y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Cantidades de marcadores bioquímicos presentes en una muestra biológica también pueden ser medidas por espectroscopia de masas, por ejemplo, por espectroscopia de masas cuantitativa relativa o absoluta usando proteínas etiquetadas o no etiquetadas.

Para determinar si la cantidad de marcadores bioquímicos es mayor o menor que lo normal, se determina la cantidad normal de marcador bioquímico presente en una muestra biológica maternal de una población pertinente. La población pertinente puede ser definida sobre la base de características que pueden afectar cantidades normales (no afectadas) de los marcadores. Para determinar el riesgo de DMG, la población pertinente puede ser establecida sobre la base de bajo riesgo para DMG. Una vez se conocen las cantidades normales de marcador, se pueden comparar las cantidades determinadas de marcador y determinar la significancia de la diferencia usando métodos estadísticos estándar. Cuando hay una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad determinada de marcador y la cantidad normal, hay un riesgo significativo de que la persona a prueba desarrolle DMG.

El riesgo de que una persona embarazada desarrolle DMG puede ser determinado a partir de cantidades de marcador bioquímico usando análisis estadístico basándose en datos clínicos recogidos en un estudio de población de pacientes. Los Ejemplos 1 y 2 muestran resultados de dichos estudios. Hay múltiples métodos estadísticos para combinar parámetros que caracterizan a la persona embarazada, tales como cantidades de marcadores bioquímicos, para obtener una estimación de riesgo. Para este propósito comúnmente se usa el método de probabilidad (Palomaki y Haddow, 1987) y el método de función discriminante lineal (Norgarrd-Pedersen et al. Clin. 37, 35-43 (1990)). El principio básico del método de probabilidad es que las distribuciones de población para un parámetro (tal como la cantidad de un marcador bioquímico) se conocen para los grupos 'no afectados' y 'afectados'. Así, para cualquier parámetro dado (tal como cantidad de marcador), se puede calcular la probabilidad de membresía de los grupos 'no afectados' y 'afectados'. La probabilidad se calcula como la altura Gaussiana para el parámetro sobre la base de la media de población y desviación típica. La 'ratio de probabilidad' es la ratio de las alturas calculadas usando parámetros de población 'no afectada' y 'afectada', y es una expresión del aumento de riesgo de tener un trastorno, con respecto a un riesgo anterior.

A continuación sigue una visión general para determinar el riesgo según los métodos descritos en esta memoria. En la práctica de filtración de anomalías cromosómicas actuales, valores de marcador bioquímico se refieren a valores suavizados de mediana para producir valores ajustados de múltiplos de la mediana (MoM) para estandarizar factores tales como ensayo, gestación, peso maternal, estado de fumador y similares. Esto se hace, por ejemplo, porque las cantidades de marcadores bioquímicos en el cuerpo de la persona cambian con la gestación, a fin de calcular riesgos, el valor de marcador bioquímico se ajusta que no verse afectado por la edad gestacional. El valor de un MoM para una muestra es la ratio del valor de marcador bioquímico al valor de mediana de población en la misma edad gestacional (u otro parámetro). Las alturas Gaussianas para resultados de marcador bioquímico son determinadas para los parámetros de población 'no afectada' y 'afectada'. Se determinan la ratio de la altura en la curva 'no afectada' y la altura en la curva 'afectada'. Las probabilidades anteriores son multiplicadas por esta ratio.

Conceptualmente, calcular el riesgo usando dos o más marcadores bioquímicos requiere primero que sean definidas las ratios de probabilidad individuales para cada uno de los marcadores (primero corregido para uno o más factores tales como uno o más marcadores biofísicos, parámetros de historial maternal, parámetros demográficos maternos, y/o mediciones biofísicas maternos) y entonces ser combinados juntos (p. ej., multiplicado). En algunas implementaciones, en el cálculo se introduce un factor adicional para tener en cuenta la magnitud de superposición

de información (correlación) de los dos o más marcadores bioquímicos individuales. Por ejemplo, se pueden usar valores-r para expresar la correlación entre parámetros, tales como nuestro ejemplo de dos marcadores bioquímicos individuales.

5 Cambiando a las figuras 4A a 4D, un serie de Curvas de Rendimiento Diagnóstico (ROC) manifiestan beneficios sinérgicos que pueden ser obtenidos, en comparación, por ejemplo, con los resultados trazados en relación a la curva ROC 200 de la figura 2 y la curva ROC 300 de la figura 3, mediante el uso de diversas combinaciones del marcador bioquímico PAI-2, el marcador bioquímico sTNFR1, y evaluación basada en demografía de uno o ambos marcadores bioquímicos PAI-2 y sTNFR1 en la predicción de diabetes mellitus gestacional. Como se ilustra en la Tabla 1, más adelante, el área bajo la curva ROC 200 (p. ej., PAI-2 solo) es 0,65, y el área bajo la curva ROC 300 (p. ej., sTNFR1) es 0,62. Un área bajo la curva para una curva ROC (no ilustrada) de demografía sola (p. ej., edad gestacional, peso de paciente, y estado de fumador) es 0,78.

15 En comparación, cambiando a la figura 4A, una curva ROC 400 manifiesta prestaciones de la combinación de análisis de un marcador bioquímico sTNFR1 más análisis estadístico de maternal información demográfica que incluye edad gestacional, peso de paciente, y estado de fumador (p. ej., sí o no). El área bajo la curva ROC 400 es 0,81. Cambiando a la figura 4B, una curva ROC 420 manifiesta prestaciones de la combinación de análisis de un marcador bioquímico PAI-2 más análisis estadístico de maternal información demográfica que incluye edad gestacional, peso de paciente, y estado de fumador (p. ej., sí o no). El área bajo la curva ROC 420 es 0,78. Cambiando a la figura 4C, una curva ROC 440 manifiesta prestaciones de la combinación de análisis tanto de un marcador bioquímico sTNFR1 como de un marcador bioquímico PAI-2. El área bajo la curva de la curva ROC 440 es 0,69. Finalmente, cambiando a la figura 4D, una curva ROC 460 manifiesta prestaciones de la combinación de análisis tanto de un marcador bioquímico sTNFR1 como de un marcador bioquímico PAI-2 más análisis estadístico de información demográfica maternal que incluye edad gestacional, peso de paciente, y estado de fumador (p. ej., sí o no). El área bajo la curva de la curva ROC 460 es 0,81.

Prueba	Área
PAI-2	0,65
sTNFR1	0,62
Demografía	0,78
sTNFR1 + Demografía	0,81
PAI-2 + Demografía	0,78
sTNFR1 + PAI-2	0,69
sTNFR1 + PAI-2 + Demografía	0,81

25 Como se describe en el Ejemplo 1, se realizó análisis estadístico de datos clínicos, incluidas cantidades de marcador bioquímico PAI-2, para determinar el riesgo de una persona embarazada a desarrollar DMG. Según el Ejemplo 1, para el marcador bioquímico PAI-2, se calcula un MoM. Los MoM se ajustaron entonces sobre la base de parámetros, incluidos edad gestacional, peso de paciente, y estado de fumador de cada muestra.

30 Cambiando a la figura 5, un diagrama de flujo ilustra un ejemplo de método 500 para usar mediciones de nivel de biomarcador para determinar una predicción de riesgo para DMG en una persona embarazada. El método 500, por ejemplo, se puede proporcionar como algoritmo de software para uso con pruebas de marcador bioquímico de DMG (p. ej., empaquetado y/o envasado con un kit de prueba de diagnóstico de DMG).

35 En algunas implementaciones, el método 500 empieza con obtención de mediciones, a partir de una muestra biológica, de uno o más niveles de biomarcador correspondientes a uno o más marcadores bioquímicos (502). Los marcadores bioquímicos incluyen al menos uno de PAI-2 y sTNFR1. Las mediciones pueden ser obtenidas en relación a los métodos descritos anteriormente para medir niveles de uno o ambos PAI-2 y sTNFR1 en una muestra de sangre, tal como una muestra de plasma o una muestra de suero. La muestra de sangre, por ejemplo, puede ser recogida durante un primer trimestre de embarazo. En algunas implementaciones, un clínico u otro médico profesional introduce las mediciones en un diálogo de interfaz gráfica de usuario de una aplicación de software para identificar un riesgo de una persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG. El diálogo de interfaz gráfica de usuario, por ejemplo, puede incluir uno o más menús desplegables, cuadros de entrada de datos, botones de radio, cuadros de verificación, y similares para introducir mediciones relacionadas con el uno o más niveles de biomarcador así como, en algunas realizaciones, información en relación con la persona embarazada.

45 En algunas implementaciones, para cada uno del uno o más niveles de biomarcador, se identifica (504) una diferencia entre el nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente. La diferencia, en algunos ejemplos,

puede incluir una diferencia umbral o una diferencia porcentual entre la medición valor y el valor de control. El nivel de control predeterminado, en algunas implementaciones, depende al menos en parte de datos de perfil obtenidos en relación al persona embarazada, tales como uno o más valores demográficos y/o uno o más valores biofísicos. En un ejemplo particular, el nivel de control predeterminado se identifica sobre la base al menos en parte en uno o más de una edad, un peso (IMC), una etnia, y un estado de fumador de la persona embarazada. El nivel de control predeterminado, en otro ejemplo, se identifica basado al menos en parte en una edad gestacional del feto de la persona embarazada.

En algunas implementaciones, se accede (506) a uno o más valores demográficos asociados con la persona embarazada. En algunos ejemplos, los valores demográficos pueden incluir uno o más de edad, etnia, medicaciones en ese momento, y vegetarianismo. Los valores demográficos, en algunas implementaciones, pueden incluir adicionalmente parámetros de historial de paciente tales como, en algunos ejemplos, historial de fumador, condiciones médicas pasadas, e historial familiar de diabetes gestacional y/o Tipo 2. A los valores demográficos se accede, en algunas implementaciones, a través de una interfaz de diálogo. Por ejemplo, se puede presentar una interfaz gráfica de usuario a un médico o clínico para que introduzca uno o más valores demográficos relacionados con la persona embarazada. En algunas implementaciones, a los valores demográficos se accede por medio de un sistema de expediente médico. Por ejemplo, los valores demográficos se pueden importar al software desde un sistema informático aparte (p. ej. instalación médica).

En algunas implementaciones, se accede (508) a uno o más valores biofísicos asociados con la persona embarazada. Mediciones biofísicas de paciente, en algunos ejemplos, pueden incluir peso, índice de masa corporal (IMC), condiciones médicas, y edad gestacional. A los valores biofísicos de paciente se accede, en algunas implementaciones, a través de una interfaz de diálogo. Por ejemplo, se puede presentar una interfaz gráfica de usuario a un médico o clínico para que introduzca uno o más valores biofísicos relacionados con la persona embarazada. En algunas implementaciones, se accede a los valores biofísicos de paciente por medio de un sistema de expediente médico. Por ejemplo, los valores biofísicos de paciente se pueden importar al software desde un sistema informático aparte (p. ej. instalación médica).

En algunas implementaciones, se determina (510) una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG. La puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en el nivel(es) de biomarcador (p. ej., los niveles reales y/o una diferencia entre los niveles y niveles de control predeterminados). En algunas implementaciones, la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en factores adicionales, tales como los valores demográficos y/o los valores biofísicos. La puntuación de evaluación de riesgo, en algunas implementaciones, incluye un valor numérico correspondiente a un riesgo proporcional de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG. En algunas implementaciones, la puntuación de evaluación de riesgo incluye un ranking en una escala (p. ej., 1 a 10, 1 a 100, etc.) de un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG. La puntuación de evaluación de riesgo, en algunas implementaciones, incluye una probabilidad porcentual de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

En algunas implementaciones, la puntuación de evaluación de riesgo se presenta en la pantalla de un dispositivo informático de usuario (512). La puntuación de evaluación de riesgo, en algunas implementaciones, se presenta en una pantalla de un dispositivo informático que ejecuta la aplicación de software para determinar el riesgo de DMG en una persona embarazada. En algunas implementaciones, la puntuación de evaluación de riesgo se presenta como lectura en una parte de pantalla de un dispositivo informático específico (p. ej., un dispositivo de análisis de kit de prueba). La puntuación de evaluación de riesgo puede ser presentada como valor numérico, gráfica de barras, gráfica de tarta, u otra ilustración que expresa un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

Aunque se ha descrito en relación a una persona embarazada, el método 500 puede ser usado para identificar un riesgo asociado con una persona de tener o estar desarrollando diabetes Tipo 2. En algunas implementaciones, en el método 500 se incluyen más o menos etapas, o una o más de las etapas del método 500 pueden ser realizadas en un orden diferente. Por ejemplo, en algunas implementaciones, no se accede a valores demográficos (506) y/o valores biofísicos (508). En algunas implementaciones, en lugar de identificar una diferencia entre el nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente (504), el nivel(es) de biomarcador obtenido en la etapa 502 se combinan con uno o ambos valor(es) demográfico(s) y valor(es) biofísico(s) para determinar una puntuación de evaluación de riesgo (510). En otras implementaciones, se usa una diferencia entre el nivel de biomarcador y el nivel de control predeterminado correspondiente (504) para determinar una predicción (no ilustrada) de riesgo de tener o estar desarrollando DMG, sin generar una puntuación de riesgo en relación a los valores adicionales de perfil enumerados en las etapas 506 y 508. En lugar de presentar la puntuación de evaluación de riesgo en una pantalla de un dispositivo informático, en algunas implementaciones, como resultado del análisis se puede proporcionar un gráfico (p. ej., "+" para positivo, "-" para negativo, etc.), una codificación por colores (p. ej., rojo para positivo, amarillo para indeterminado, verde para negativo, etc.), o una indicación verbal (p. ej., emitida por medio de un dispositivo de altavoz en comunicación con un procesador). Son posibles otras modificaciones del método 500.

Se entiende que los valores numéricos pueden ser diferentes para diferentes poblaciones a estudio, aunque las mostradas más adelante proporcionan un punto de partida aceptable para cálculos de riesgo. Por ejemplo, se ha observado que para un centro clínico particular que lleva a cabo análisis de riesgo de paciente, los valores numéricos

en un algoritmo de riesgo pueden ir a la deriva con el tiempo, conforme la población en la región de servicio varía con el tiempo.

La presente descripción también proporciona paquetes comerciales, o kits, para determinar el riesgo de que una persona embarazada desarrolle DMG. Tales kits pueden incluir uno o más reactivos para detectar la cantidad de al menos un marcador bioquímico en una muestra biológica de una persona embarazada, en donde el al menos un marcador bioquímico es PAI-2 y, opcionalmente, sTNFR1 así como, en algunas implementaciones, uno o más de una placa recubierta, un trazador, calibradores, instrucciones para llevar a cabo la prueba, y software para analizar resultados de medición de nivel de biomarcador en relación a una persona embarazada particular.

**Ejemplo 1: Estudio de caso de control usando marcador bioquímico de inhibidor del activador del plasminógeno 2 (PAI-2) para determinar el riesgo de diabetes mellitus gestacional en una persona embarazada**

Este ejemplo muestra el uso del marcador bioquímico PAI-2 para determinar el riesgo de DMG en una persona embarazada.

Se realizó un estudio de caso de control retrospectivo usando sobrante de muestras de plasma materno de primer trimestre. El conjunto de datos incluía 449 muestras de control y 30 casos de resultado de DMG. De estas muestras se midió el marcador bioquímico PAI-2 usando un kit de inmunoensayo en sándwich.

Para el análisis descrito en esta memoria, los resultados de medición se convirtieron a múltiplos de la mediana (MoM) teniendo en cuenta edad gestacional, peso materno y estado de fumador de la persona embarazada asociado con cada muestra de plasma.

Como se ilustra en la figura 1, un trazado de caja 100 de múltiplo de la mediana (MoM) de PAI-2 en un grupo de resultado de embarazo de control y un grupo de resultado de embarazo de diabetes mellitus gestacional ilustra que la cantidad de PAI-2 en muestras biológicas de personas embarazadas es menor cuando la persona tiene un resultado DMG en embarazo. El estudio de caso identificó una disminución en el nivel de PAI-2 de la población de resultado DMG de aproximadamente -0,59 (múltiplos de desviaciones típicas de población de control en log10MoMs) en relación a la población de control. Una prueba de suma de rangos de Wilcoxon hecha con los resultados del estudio mostró que PAI-2 tenía una diferencia estadísticamente significativa en los resultados de la casos en comparación con la controles (p = 0,01). Se calculó una distancia de Mahalanobis entre el grupo de resultado de embarazo de control y el grupo de resultado de embarazo de diabetes mellitus gestacional como 0,7.

Un análisis de Curva de Rendimiento Diagnóstico (ROC) de los resultados del estudio de caso, ilustrado en relación a una curva 200 de la figura 2, manifiesta las prestaciones de predicción de diabetes mellitus gestacional usando el marcador bioquímico PAI-2. La Tabla 2 ilustra datos obtenidos de la curva 200. Como se presenta más adelante en relación a la Tabla 2, el área bajo la curva ROC era de 0,65 (Intervalo de confianza (CI) de 95 %, p= 0,0017).

Prueba	Área	95 % CI	SE	Z	p	ROC de datos de plasma DMG = DMG en insulina
PAI-2	0,65	0,55 a 0,76	0,053	2,94	0,0017	Tienen valores menores

Así, este ejemplo muestra que en filtración para DMG, había significativas contribuciones independientes de PAI-2 de sangre materno. Se estimó que filtración por PAI-2 solo, por ejemplo, identifica aproximadamente un 35 % de personas que desarrolla DMG con una tasa de falsos positivos de aproximadamente del 20 %. En otro ejemplo, se estimó que filtración por PAI-2 solo, por ejemplo, identifica aproximadamente un 55 % de personas que desarrolla DMG con una tasa de falsos positivos de aproximadamente el 30 %.

**Ejemplo 2 no según la presente invención: Estudio de caso de control usando marcador bioquímico de receptor del TNF soluble 1 (sTNFR1) para determinar el riesgo de diabetes mellitus gestacional en una persona embarazada**

Este ejemplo muestra el uso del marcador bioquímico sTNFR1 para determinar el riesgo de DMG en una persona embarazada.

Se realizó un segundo estudio de caso de control retrospectivo usando el sobrante de muestras de plasma materno de primer trimestre como se describe en relación al estudio de caso de control del Ejemplo 1, anterior. De estas muestras se midió el marcador bioquímico sTNFR1 usando un kit de inmunoensayo en sándwich.

Para el análisis descrito en esta memoria, los resultados de medición se convirtieron a múltiplos de la mediana (MoM) teniendo en cuenta edad gestacional, peso materno y estado de fumador de la persona embarazada asociado con cada muestra de plasma.

El cálculo del múltiplo de la mediana (MoM) de sTNFR1 en un grupo de resultado de embarazo de control y un grupo de resultado de embarazo de diabetes mellitus gestacional determinó que la cantidad de sTNFR1 en las muestras biológicas de personas embarazadas es mayor cuando la persona tiene un resultado DMG en embarazo. El estudio

de caso identificó un aumento en el nivel de sTNFR1 de la población de resultado DMG de aproximadamente 0,58 (múltiplos de desviaciones típicas de población de control en log10MoMs) en relación a la población de control. Una prueba de suma de rangos de Wilcoxon hecha con los resultados del estudio mostró que sTNFR1 tenía una diferencia estadísticamente significativa en los resultados de la casos en comparación con la controles. Se calculó una distancia de Mahalanobis entre el grupo de resultado de embarazo de control y el grupo de resultado de embarazo de diabetes mellitus gestacional como 0,57.

Un análisis de Curva de Rendimiento Diagnóstico (ROC) de los resultados del estudio de caso, ilustrado en relación a una curva 300 de la figura 3, manifiesta las prestaciones de predicción de diabetes mellitus gestacional usando el marcador bioquímico sTNFR1. La Tabla 3 ilustra datos obtenidos de la curva 300. Como se presenta más adelante en relación a la Tabla 3, el área bajo la curva ROC era de 0,61 (Intervalo de confianza (CI) de 95 %, p= 0,0213).

Prueba	Área	95 % CI	SE	Z	p	ROC de datos de plasma DMG = DMG en insulina
sTNFR1	0,61	0,50 a 0,73	0,057	2,03	0,00213	Tienen valores mayores

Así, este ejemplo muestra que en filtración para DMG, había significativas contribuciones independientes de sTNFR1 de sangre materna. Se estimó que filtración por sTNFR1 solo, por ejemplo, identifica aproximadamente un 35 % de personas que desarrolla DMG con una tasa de falsos positivos de aproximadamente el 20 %. En otro ejemplo, se estimó que filtración por sTNFR1 solo, por ejemplo, identifica aproximadamente un 50 % de personas que desarrolla DMG con una tasa de falsos positivos de aproximadamente el 30 %.

La figura 6 muestra un ejemplo de un dispositivo informático 600 y un dispositivo informático móvil 650 que se pueden usar para implementar las técnicas descritas en esta descripción. El dispositivo informático 600 está pensado para representar diversas formas de ordenadores digitales, tales como ordenadores portátiles, ordenadores de escritorio, estaciones de trabajo, ayudantes digitales personales, servidores, servidores ultradelgados, ordenadores centrales, y otros ordenadores apropiados. El dispositivo informático móvil 650 está pensado para representar diversas formas de dispositivos móviles, tales como ayudantes digitales personales, teléfonos móviles, teléfonos inteligentes y otros dispositivos informáticos similares. Se entiende que los componentes mostrados aquí, sus conexiones y relaciones, y sus funciones, son ejemplos únicamente, y no se entienden como limitativos.

El dispositivo informático 600 incluye un procesador 602, una memoria 604, un dispositivo de almacenamiento 606, una interfaz de alta velocidad 608 que conecta a la memoria 604 y múltiples puertos de expansión de alta velocidad 610, y una interfaz de baja velocidad 612 que conecta a un puerto de expansión de baja velocidad 614 y el dispositivo de almacenamiento 606. Cada uno del procesador 602, la memoria 604, el dispositivo de almacenamiento 606, la interfaz de alta velocidad 608, los puertos de expansión de alta velocidad 610, y la interfaz de baja velocidad 612, se interconectan usando diversos buses, y pueden ser montados en una placa base común o de otras maneras según sea apropiado. El procesador 602 puede procesar instrucciones para ejecución dentro del dispositivo informático 600, incluidas instrucciones almacenadas en la memoria 604 o en el dispositivo de almacenamiento 606 para exponer información gráfica para una GUI en un dispositivo externo de entrada/salida, tal como una pantalla 616 acoplada a la interfaz de alta velocidad 608. En otras implementaciones, se pueden usar múltiples procesadores y/o múltiples buses, según sea apropiado, junto con múltiples memorias y tipos de memoria. También, se pueden conectar múltiples dispositivos informáticos, con cada dispositivo proporcionando partes de las operaciones necesarias (p. ej., como banco de servidores, un grupo de servidores ultradelgados, o un sistema multiprocesador).

La memoria 604 almacena información dentro del dispositivo informático 600. En algunas implementaciones, la memoria 604 es una unidad o unidades de memoria volátil. En algunas implementaciones, la memoria 604 es una unidad o unidades de memoria no volátil. La memoria 604 también puede ser otra forma de medio legible por ordenador, tal como un disco magnético u óptico.

El dispositivo de almacenamiento 606 puede proporcionar almacenamiento masivo para el dispositivo informático 600. En algunas implementaciones, el dispositivo de almacenamiento 606 puede ser o contener un medio legible por ordenador, tal como un dispositivo de disco flexible, un dispositivo de disco duro, un dispositivo de disco óptico, o un dispositivo de cinta, una memoria flash u otro dispositivo similar de memoria en sólido estado, o una distribución de dispositivos, incluidos dispositivos en una red de área de almacenamiento u otras configuraciones. Se pueden almacenar instrucciones en un soporte de información. Las instrucciones, cuando son ejecutadas por uno o más dispositivos de procesamiento (por ejemplo, procesador 602), realizan uno o más métodos, tales como los descritos anteriormente. Las instrucciones también pueden ser almacenadas por uno o más dispositivos de almacenamiento tales como medios legibles por ordenador o máquina (por ejemplo, la memoria 604, el dispositivo de almacenamiento 606, o memoria en el procesador 602).

La interfaz de alta velocidad 608 gestiona operaciones intensivas en ancho de banda para el dispositivo informático 600, mientras que la interfaz de baja velocidad 612 gestiona operaciones menos intensivas en ancho de banda. Tal asignación de funciones es un ejemplo únicamente. En algunas implementaciones, la interfaz de alta velocidad 608 se acopla a la memoria 604, la pantalla 616 (p. ej., a través de un procesador o acelerador de gráficos), y a los puertos de expansión de alta velocidad 610, que pueden aceptar diversas tarjetas de expansión (no se muestran). En la

implementación, la interfaz de baja velocidad 612 se acopla al dispositivo de almacenamiento 606 y el puerto de expansión de baja velocidad 614. El puerto de expansión de baja velocidad 614, que puede incluir diversos puertos de comunicación (p. ej., USB, Bluetooth®, Ethernet, Ethernet inalámbrico) puede ser acoplado a uno o más dispositivos de entrada/salida, tales como un teclado, un dispositivo señalador, un escáner, o un dispositivo de red tal como un conmutador o rúter, p. ej., a través de un adaptador de red.

El dispositivo informático 600 puede ser implementado en varias formas diferentes, como se muestra en la figura. Por ejemplo, puede ser implementado como servidor estándar 620, o múltiples veces en un grupo de tales servidores. Adicionalmente, puede ser implementado en un ordenador personal tal como un ordenador portátil 622. También puede ser implementado como parte de un sistema de servidores en bastidores 624. Como alternativa, componentes del dispositivo informático 600 pueden ser combinados con otros componentes en un dispositivo móvil (no se muestra), tal como un dispositivo informático móvil 650. Cada uno de tales dispositivos puede contener uno o más del dispositivo informático 600 y el dispositivo informático móvil 650, y un sistema entero puede estar constituido por múltiples dispositivos informáticos que se comunican entre sí.

El dispositivo informático móvil 650 incluye un procesador 652, una memoria 664, un dispositivo de entrada/salida tal como una pantalla 654, una interfaz de comunicación 666, y un transceptor 668, entre otros componentes. El dispositivo informático móvil 650 también puede ser provisto de un dispositivo de almacenamiento, tal como una micro-unidad u otro dispositivo, para proporcionar almacenamiento adicional. Cada uno del procesador 652, la memoria 664, la pantalla 654, la interfaz de comunicación 666, y el transceptor 668, se interconectan usando diversos buses, y varios de los componentes se pueden montar en una placa base común o de otras maneras según sea apropiado.

El procesador 652 puede ejecutar instrucciones dentro del dispositivo informático móvil 650, incluidas instrucciones almacenadas en la memoria 664. El procesador 652 puede ser implementado como chipset de chips que incluyen procesadores separados y múltiples analógicos y digitales. El procesador 652 puede permitir, por ejemplo, coordinación de los otros componentes del dispositivo informático móvil 650, tales como control de las interfaces de usuario, aplicaciones ejecutadas por el dispositivo informático móvil 650, y comunicación inalámbrica por el dispositivo informático móvil 650.

El procesador 652 puede comunicarse con un usuario a través de una interfaz de control 658 y una interfaz de pantalla 656 acoplada a la pantalla 654. La pantalla 654 puede ser, por ejemplo, una pantalla TFT (pantalla de cristal líquido de transistor en película delgada) exponer o una pantalla OLED (diodo orgánico emisor de luz), u otra tecnología apropiada de pantalla. La interfaz de pantalla 656 puede incluir circuitería apropiada para controlar la pantalla 654 para presentar información gráfica y otra a un usuario. La interfaz de control 658 puede recibir órdenes de un usuario y convertirlas para envío al procesador 652. Adicionalmente, una interfaz externa 662 puede proporcionar comunicación con el procesador 652, para permitir comunicación de área cercana del dispositivo informático móvil 650 con otros dispositivos. La interfaz externa 662 puede permitir, por ejemplo, comunicación cableada en algunas implementaciones, o comunicación inalámbrica en otras implementaciones, y también se pueden usar múltiples interfaces.

La memoria 664 almacena información dentro del dispositivo informático móvil 650. La memoria 664 se puede implementar como uno o más de un medio o medios legibles por ordenador, una unidad o unidades de memoria volátil, o una unidad o unidades de memoria no volátil. También se puede proporcionar una memoria de expansión 674 y conectar al dispositivo informático móvil 650 a través de una interfaz de expansión 672, que puede incluir, por ejemplo, una interfaz de tarjeta SIMM (único módulo de memoria en línea). La memoria de expansión 674 puede proporcionar espacio de almacenamiento extra para el dispositivo informático móvil 650, o también puede almacenar aplicaciones u otra información para el dispositivo informático móvil 650. Específicamente, la memoria de expansión 674 puede incluir instrucciones para llevar a cabo o suplementar los procesos descritos anteriormente, y también puede incluir información segura. Así, por ejemplo, la memoria de expansión 674 se puede proporcionar como módulo de seguridad para el dispositivo informático móvil 650, y puede ser programada con instrucciones que permiten uso seguro del dispositivo informático móvil 650. Adicionalmente, se pueden proporcionar aplicaciones seguras por medio de las tarjetas SIMM, junto con información adicional, tales como colocar información de identificación en la tarjeta SIMM de una manera no hackeable.

La memoria puede incluir, por ejemplo, memoria flash y/o memoria NVRAM (memoria no volátil de acceso aleatorio), como se trata más adelante. En algunas implementaciones, se almacenan instrucciones en un soporte de información. Las instrucciones, cuando son ejecutadas por uno o más dispositivos de procesamiento (por ejemplo, procesador 652), realizan uno o más métodos, tales como los descritos anteriormente. Las instrucciones también pueden ser almacenadas por uno o más dispositivos de almacenamiento, tales como uno o más medios legibles por ordenador o máquina (por ejemplo, la memoria 664, la memoria de expansión 674, o memoria en el procesador 652). En algunas implementaciones, las instrucciones pueden ser recibidas en una señal propagada, por ejemplo, por el transceptor 668 o la interfaz externa 662.

El dispositivo informático móvil 650 puede comunicarse inalámbricamente a través de la interfaz de comunicación 666, que puede incluir circuitería de procesamiento de señal digital donde sea necesario. La interfaz de comunicación 666 puede permitir comunicaciones bajo diversos modos o protocolos, tales como llamadas de voz GSM (Sistema Global para comunicaciones por Móvil), SMS (servicio de mensajes cortos), EMS (servicio de mensajes mejorados), o

- mensajes MMS (servicio de mensajes multimedia), CDMA (acceso múltiple por división de código), TDMA (acceso múltiple por división de tiempo), PDC (celular digital personal), WCDMA (acceso múltiple por división de código de banda ancha), CDMA2000, o GPRS (Servicio general de radio por paquetes), entre otros. Tal comunicación puede ocurrir, por ejemplo, a través del transceptor 668 usando una radiofrecuencia. Adicionalmente, puede ocurrir comunicación de corto alcance, tal como usando Bluetooth®, Wi-Fi™, u otro transceptor (no se muestra). Adicionalmente, un módulo receptor GPS (sistema de posicionamiento global) 670 puede proporcionar datos inalámbricos adicionales relacionados con navegación y ubicación al dispositivo informático móvil 650, que pueden ser usados según sea apropiado por aplicaciones ejecutadas en el dispositivo informático móvil 650.
- El dispositivo informático móvil 650 también puede comunicarse audiblemente usando un códec de audio 660, que puede recibir información hablada de un usuario y convertirla en información digital utilizable. La códec de audio 660 puede generar de manera semejante sonido audible para un usuario, tal como a través de un altavoz, p. ej., en un terminal del dispositivo informático móvil 650. Tal sonido puede incluir sonido de llamadas telefónicas de voz, puede incluir sonido grabado (p. ej., mensajes de voz, archivos de música, etc.) y también puede incluir sonido generado por aplicaciones que funcionan en el dispositivo informático móvil 650.
- El dispositivo informático móvil 650 puede ser implementado en varias formas diferentes, como se muestra en la figura. Por ejemplo, puede ser implementado como teléfono móvil 680. También puede ser implementado como parte de un teléfono inteligente 682, asistente digital personal u otro dispositivo móvil similar.
- Diversas implementaciones de los sistemas y técnicas descritos aquí pueden ser realizadas en circuitería electrónica digital, circuitería integrada, ASIC diseñados especialmente (circuitos integrados específicos de aplicación), hardware informático, firmware, software, y/o combinaciones de los mismos. Estas diversas implementaciones pueden incluir implementación en uno o más programas de ordenador que son ejecutables y/o interpretables en un sistema programable que incluye al menos un procesador programable, que puede ser de finalidad especial o general, acoplado para recibir y transmitir datos e instrucciones a un sistema de almacenamiento, al menos un dispositivo de entrada, y al menos un dispositivo de salida.
- Estos programas de ordenador (también conocidos como programas, software, aplicaciones de software o código) incluyen instrucciones de máquina para un procesador programable, y pueden ser implementados en un lenguaje de programación de alto nivel procedural y/u orientado a objetos, y/o en lenguaje de ensamblaje/máquina. Como se emplea en esta memoria, los términos medio legible máquina y medio legible por ordenador se refieren a cualquier producto de programa, aparato y/o dispositivos informáticos (p. ej., discos magnético, discos ópticos, memoria, dispositivos lógicos programables (PLD)) usados para proporcionar instrucciones de máquina y/o datos a un procesador programable, que incluyen un medio legible por máquina que recibe instrucciones de máquina como señal legible por máquina. La expresión señal legible por máquina se refiere a cualquier señal usada para proporcionar instrucciones de máquina y/o datos a un procesador programable.
- Para permitir interacción con un usuario, los sistemas y técnicas descritos aquí se pueden implementar en un ordenador que tiene un dispositivo de exposición (p. ej., un CRT (tubo de rayos catódicos) o monitor LCD (pantalla de cristal líquido)) para exponer información al usuario y un teclado y un dispositivo señalador (p. ej., un ratón o una bola de desplazamiento) por el que el usuario puede proporcionar aporte al ordenador. También se pueden usar otras clases de dispositivos para permitir interacción con un usuario; por ejemplo, retroinformación proporcionada al usuario puede ser de cualquier forma de retroinformación sensorial (p. ej., retroinformación visual, retroinformación auditoria, o retroinformación táctil); y entrada desde el usuario puede ser recibida en cualquier forma, incluida entrada acústica, lenguaje, o táctil.
- Los sistemas y técnicas descritos aquí pueden ser implementados en un sistema informático que incluye un componente de interfaz (p. ej., como servidor de datos), o que incluye un componente middleware (p. ej., un servidor de aplicaciones), o que incluye un componente extremo delantero (p. ej., un ordenador de cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador Web a través del que un usuario puede interactuar con una implementación de los sistemas y técnicas descritos aquí), o cualquier combinación de tales componentes de interfaz, middleware, o de motor. Los componentes del sistema se pueden interconectar por cualquier forma o medio de comunicación digital de datos (p. ej., una red de comunicación). Ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local (LAN), una red de área amplia (WAN), e internet.
- El sistema informático puede incluir clientes y servidores. Un cliente y servidor están generalmente a distancia entre sí y típicamente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de programas de ordenador que se ejecutan en los ordenadores respectivos y que tiene una relación cliente-servidor entre sí.
- En vista de la estructura, se proporcionan funciones y aparatos de los sistemas y métodos descritos aquí, en algunas implementaciones, sistemas, métodos y aparatos para identificar riesgo de una persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada, el método comprende:
  - 5 medir uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada para determinar uno o más niveles de biomarcador, en donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos comprende PAI-2;
 

identificar, mediante un procesador de un dispositivo informático, para cada uno del uno o más marcadores bioquímicos medidos, una diferencia entre el nivel de biomarcador medido y un nivel de control predeterminado correspondiente; y
  - 10 en respuesta a la identificación, determinar, mediante el procesador, una predicción correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG;
 

en donde la predicción es positiva basada al menos en parte en identificar que un nivel de PAI-2 que refleja una disminución estadísticamente significativa en comparación con un nivel de control respectivo.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde la persona embarazada no ha sido diagnosticado previamente como diabético, y/o la persona embarazada está dentro de una fase de primer trimestre del embarazo en el momento de obtener la muestra de sangre; en cuyo caso, opcionalmente en donde la fase de primer trimestre va de cuarenta y dos días desde la concepción a noventa y siete días desde la concepción.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la diferencia comprende al menos uno de un valor umbral y una diferencia porcentual.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la predicción se basa en parte en al menos un factor de historial maternal de la persona embarazada; en cuyo caso, opcionalmente en donde el al menos un factor de historial maternal comprende uno de una edad gestacional, un peso, un IMC, un estado de historial familiar, una raza, y un estado de fumador.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de identificación comprende identificar, mediante el procesador del dispositivo informático:
  - I) si el nivel medido de PAI-2 difiere en al menos una cantidad umbral correspondiente respecto a un nivel de control predeterminado de PAI-2; y/o
  - II) si una puntuación basada al menos en parte en el nivel medido de PAI-2 es indicativa del riesgo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uno o más biomarcadores medidos comprende además sTNFR1, y la etapa de identificación comprende identificar, mediante el procesador del dispositivo informático, si:
  - I) el nivel de sTNFR1 medido difiere en al menos una cantidad umbral correspondiente respecto a un nivel de control predeterminado de sTNFR1; y/o
  - 35 II) una puntuación basada al menos en parte en el nivel de sTNFR1 medido es indicativa del riesgo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG; y/o
  - III) una puntuación basada en al menos el nivel medido de PAI-2 y el nivel de sTNFR1 es indicativa del riesgo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG, y/o

en donde medir el uno o más marcadores bioquímicos comprende:
- 40
  - I) determinar un concentración de cada marcador bioquímico respectivo; y/o
  - II) determinar una cantidad de cada marcador bioquímico respectivo.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde determinar la predicción comprende calcular una puntuación de evaluación de riesgo; en cuyo caso, opcionalmente en donde la puntuación de evaluación de riesgo comprende ya sea:
  - 45 I) un valor de riesgo proporcional; o
  - II) una puntuación numérica de riesgo asignada en una escala.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra de sangre comprende uno de una muestra de plasma y una muestra de suero.

9. Un método para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada, el método comprende:
- medir uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada para determinar uno o más niveles de biomarcador, en donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos comprende PAI-2; y calcular, mediante un procesador, una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG, en donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente;
- 5 en donde la puntuación de evaluación de riesgo refleja un riesgo significativo de que la persona desarrollará DMG cuando haya una diferencia estadísticamente significativa entre el nivel de biomarcador determinado y un nivel de control predeterminado correspondiente.
- 10 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde medir el uno o más marcadores bioquímicos comprende:
- I) aplicar análisis de espectrometría de masas; y/o
- II) realizar un inmunoensayo.
- 15 11. El método según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde calcular la puntuación de evaluación de riesgo comprende normalizar la comparación del nivel de biomarcador y el nivel de control predeterminado correspondiente sobre la base de:
- (a) uno o más valores demográficos maternos; en cuyo caso, opcionalmente en donde normalizar la comparación comprende aplicar un análisis estadístico de múltiplo de medianas; y/o
- 20 (b) uno o más atributos biofísicos.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos comprende además sTNFR1, y la predicción es positiva basada al menos en parte en identificar que un nivel de sTNFR1 refleja un aumento estadísticamente significativo en comparación con un nivel de control respectivo.
- 25 13. Un sistema para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada que comprende:
- un kit de diagnóstico in vitro que comprende probar instrumentos para probar si hay uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada, en donde el uno o más marcadores bioquímicos comprende PAI-2; y
- 30 un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, en donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provoca que el procesador:
- recupere uno o más niveles de biomarcador, en donde cada nivel de biomarcador del uno o más niveles de biomarcador corresponde a un marcador bioquímico probado para usar el kit de diagnóstico in vitro, y en donde el recuperado uno o más niveles de biomarcador comprende un nivel de biomarcador para PAI-2, y
- 35 calcular una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG, en donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente.
14. El sistema según la reivindicación 13, en donde las instrucciones provocan que el procesador:
- 40 a) antes de calcular la puntuación de evaluación de riesgo, acceda a al menos un factor de historial materno de la persona embarazada; en cuyo caso, opcionalmente en donde acceder a al menos un factor de historial materno de la persona embarazada comprende:
- 45 I) i) provocar la presentación de una interfaz gráfica de usuario en un dispositivo de exposición, en donde la interfaz gráfica de usuario comprende uno o más campos de entrada para enviar información de factor de historial materno en relación con la persona embarazada; y/o
- II) ii) importar, de un expediente médico electrónico, el al menos un factor de historial materno; y/o
- b) tras calcular la puntuación de evaluación de riesgo, provocar la presentación de la puntuación de evaluación de riesgo en un dispositivo de exposición; en cuyo caso, opcionalmente en donde provocar la presentación de la puntuación de evaluación de riesgo comprende provocar la presentación de información de evaluación de riesgo.
- 50 15. El sistema según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde los instrumentos de prueba comprenden

al menos un anticuerpo anti-PAI-2, y/o opcionalmente comprenden uno o más de un tampón de ensayo, una placa recubierta, un trazador, y calibradores.

16. Un sistema para predecir el riesgo de diabetes mellitus gestacional (DMG) en una persona embarazada que comprende:

5 un kit de diagnosis in vitro que comprende probar instrumentos para probar si hay uno o más marcadores bioquímicos en una muestra de sangre obtenida de la persona embarazada, en donde el uno o más marcadores bioquímicos comprende PAI-2; y

un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, en donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provoca que el procesador:

10 recupere uno o más niveles de biomarcador, en donde cada nivel de biomarcador del uno o más niveles de biomarcador corresponde a un marcador bioquímico probado para usar el kit de diagnosis in vitro, y en donde el recuperado uno o más niveles de biomarcador comprende un nivel de biomarcador para PAI-2, y

15 identificar, para cada uno del uno o más marcadores bioquímicos medidos, una diferencia entre el nivel de biomarcador medido y un nivel de control predeterminado correspondiente; y

en respuesta a la identificación, determinar, una predicción correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

17. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el uno o más marcadores bioquímicos comprende además sTNFR1, y en donde el recuperado uno o más niveles de biomarcador comprende además un nivel de biomarcador para sTNFR1.

18. Un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, en donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provocan que el procesador:

acceda a mediciones de uno o más marcadores bioquímicos, en donde

25 las mediciones fueron obtenidas probando niveles de marcador bioquímico en una muestra de sangre obtenida de una persona embarazada, y

el uno o más marcadores bioquímicos medidos comprende PAI-2; y

calcular una puntuación de evaluación de riesgo correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando diabetes mellitus gestacional (DMG), en donde la puntuación de evaluación de riesgo se basa en parte en una comparación del nivel de biomarcador y un nivel de control predeterminado correspondiente.

30 19. Un medio no transitorio legible por ordenador que tiene instrucciones almacenadas en el mismo, en donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por un procesador, provocan que el procesador:

acceda a mediciones de uno o más marcadores bioquímicos, en donde

las mediciones fueron obtenidas probando niveles de marcador bioquímico en una muestra de sangre obtenida de una persona embarazada, y

35 el uno o más marcadores bioquímicos medidos comprende PAI-2;

identificar, para cada uno del uno o más marcadores bioquímicos medidos, una diferencia entre el nivel de biomarcador medido y un nivel de control predeterminado correspondiente; y

en respuesta a la identificación, determinar, una predicción correspondiente a un riesgo relativo de la persona embarazada de tener o estar desarrollando DMG.

40 20. El medio no transitorio legible por ordenador según las reivindicaciones 18 o 19, en donde el uno o más marcadores bioquímicos medidos comprende además sTNFR1.

100 ↘

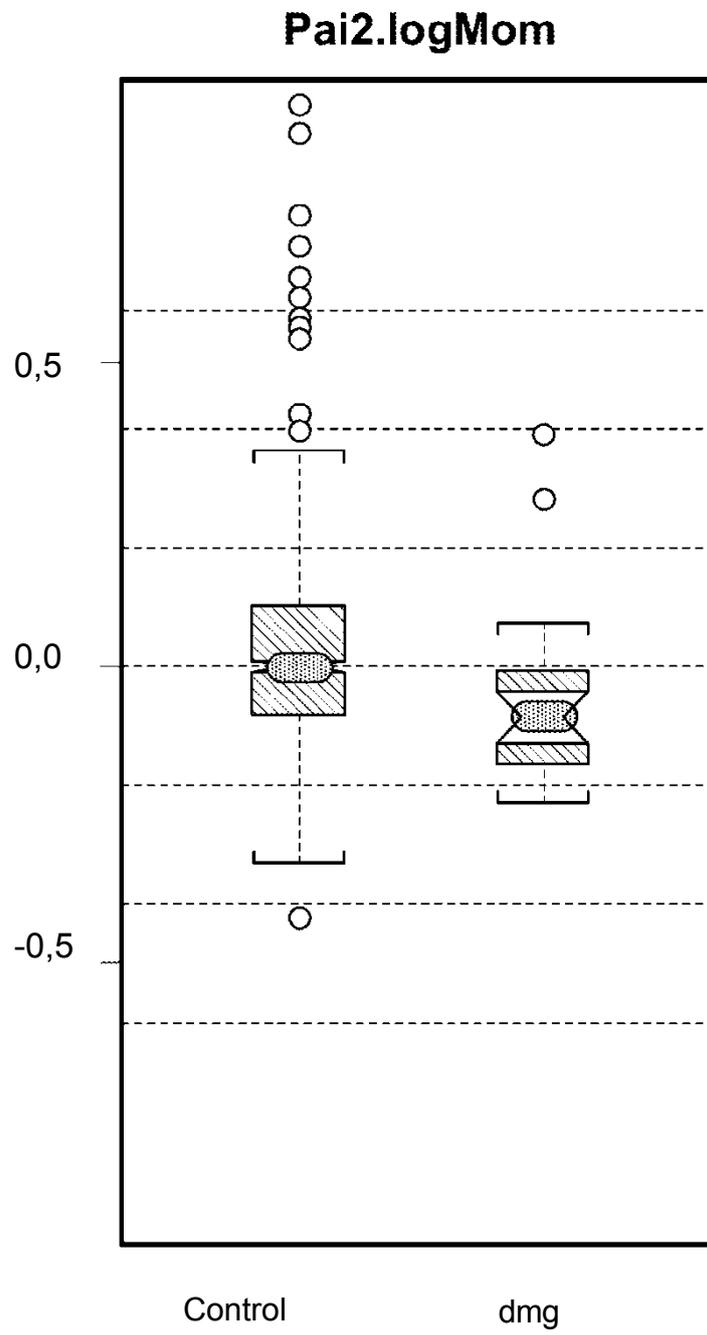


FIG. 1

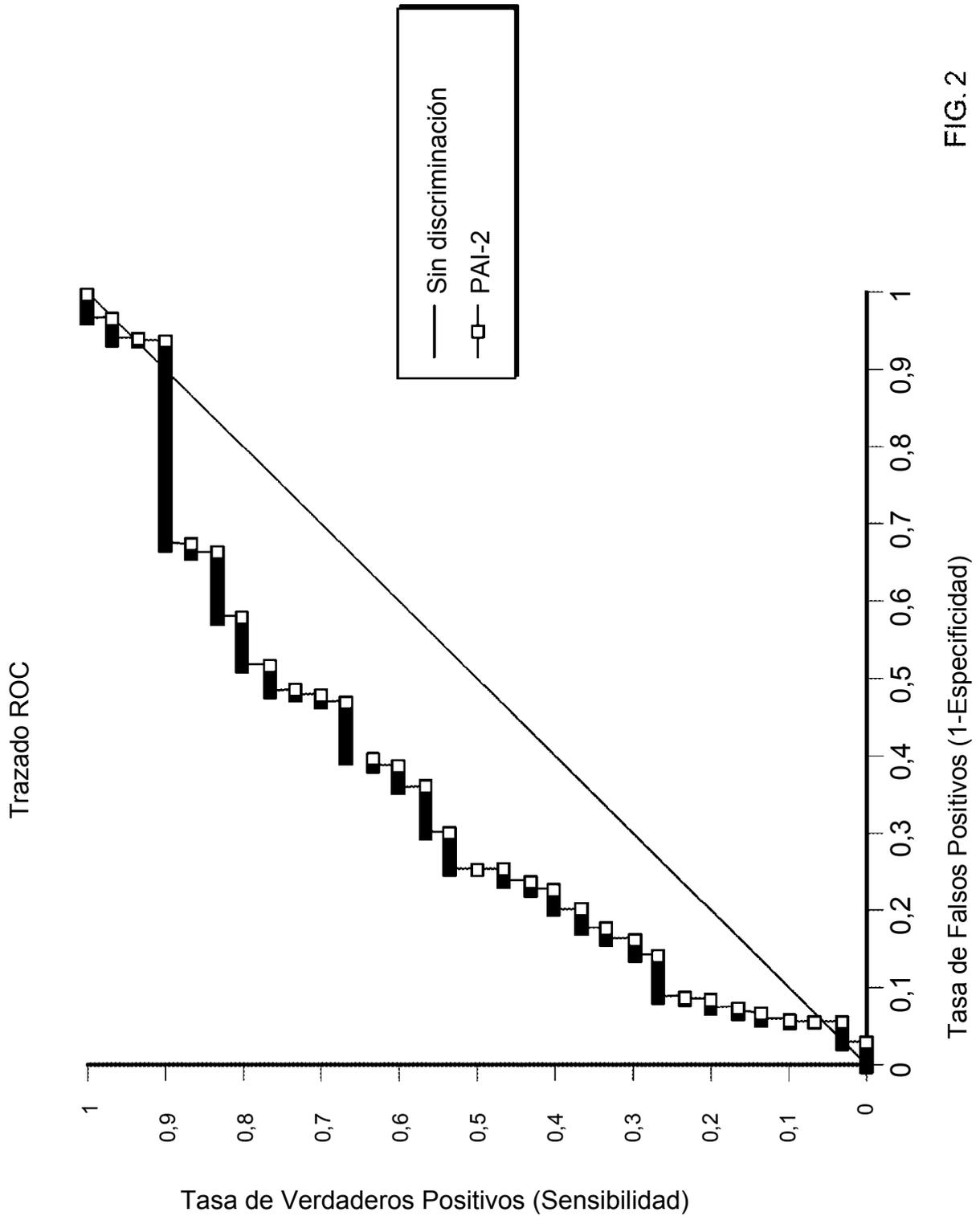


FIG. 2

300 ↷

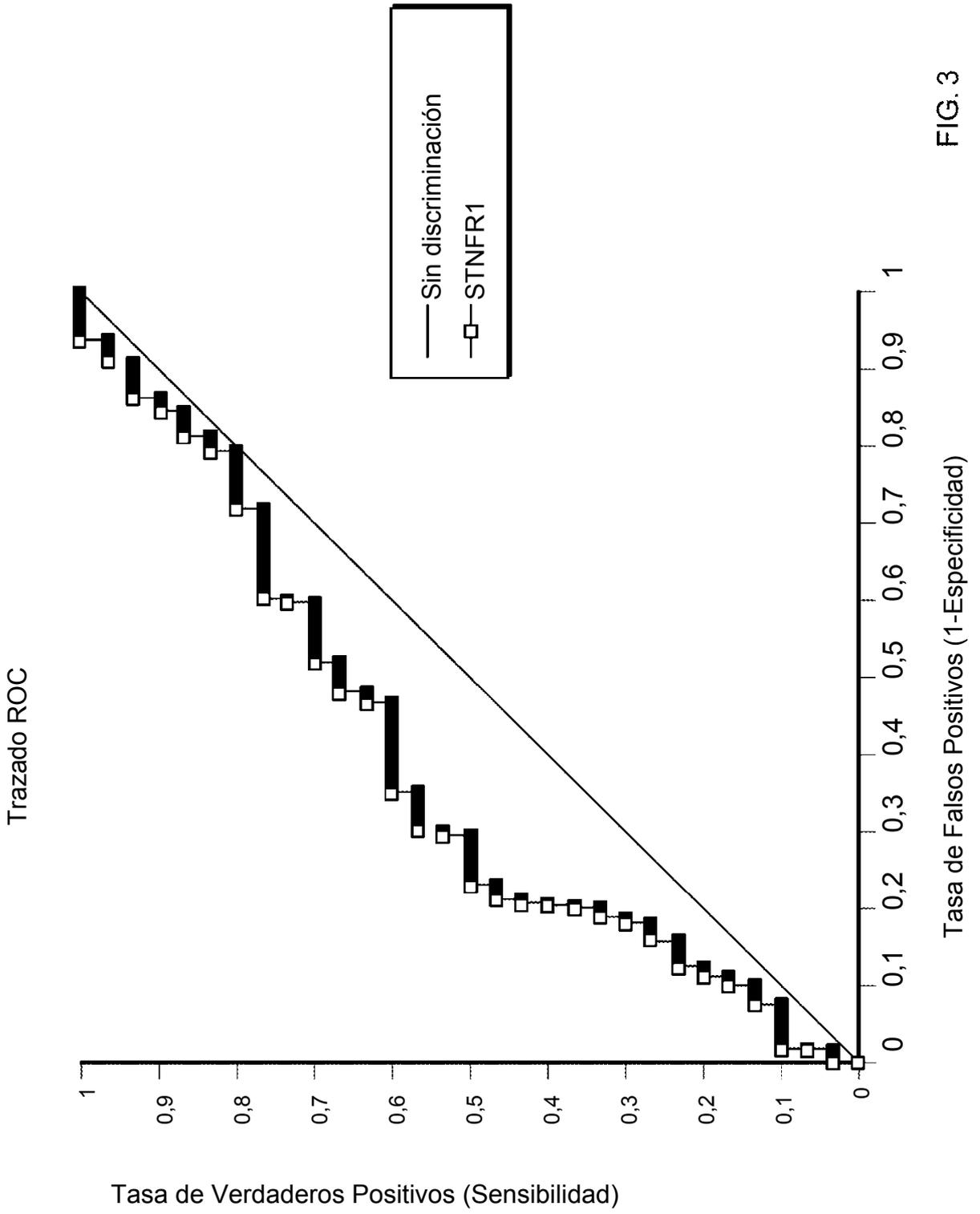


FIG. 3

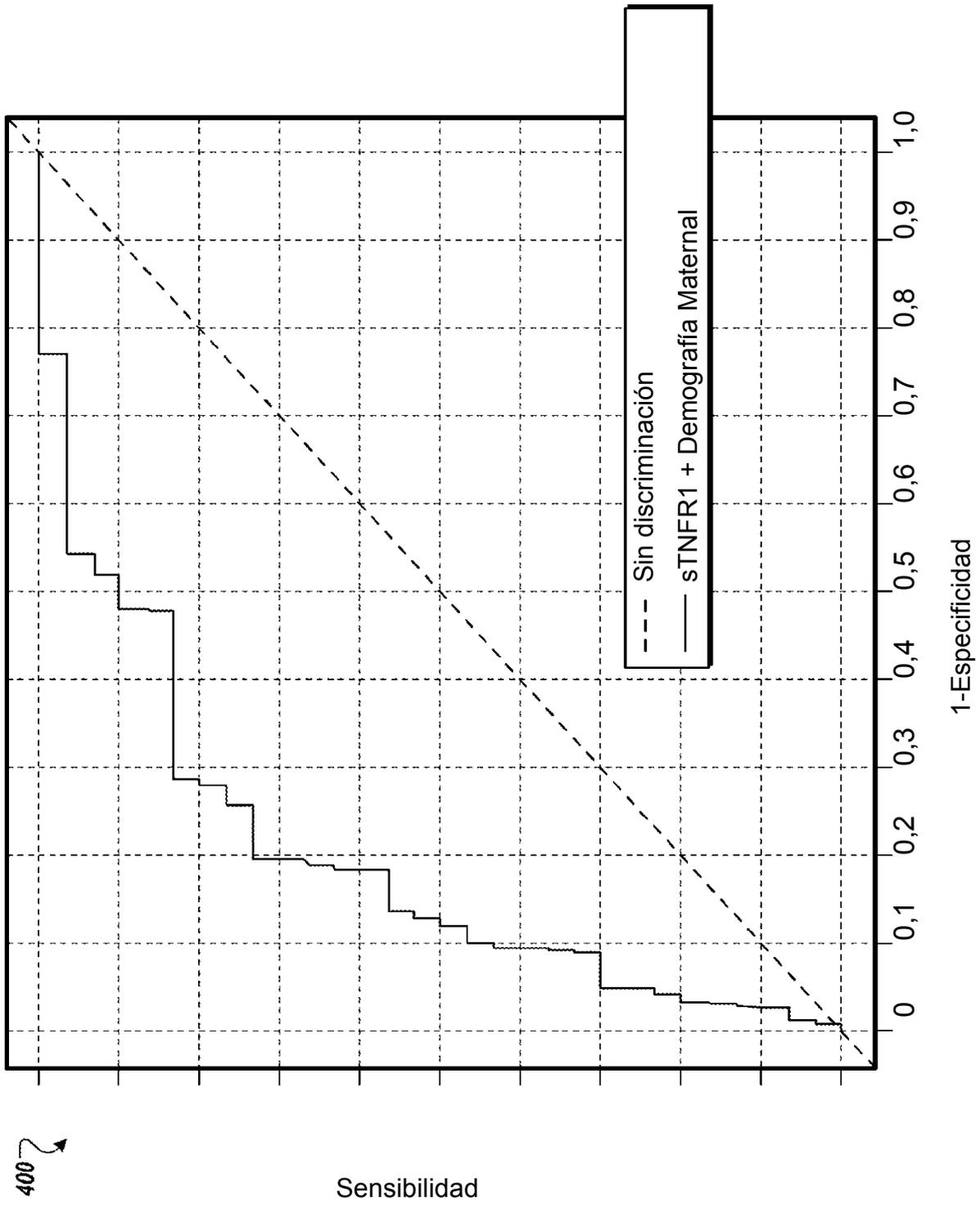


FIG. 4A

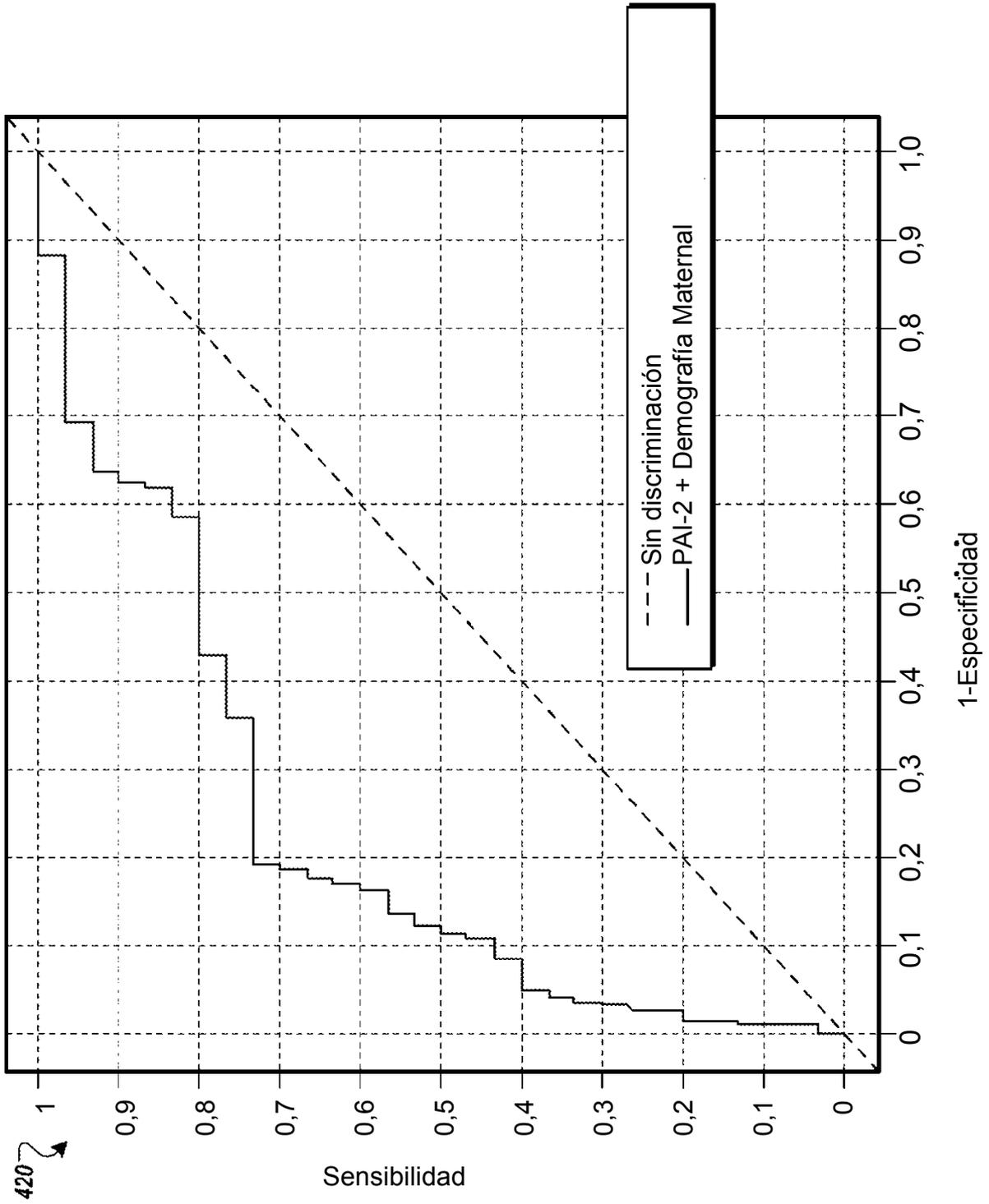


FIG. 4B

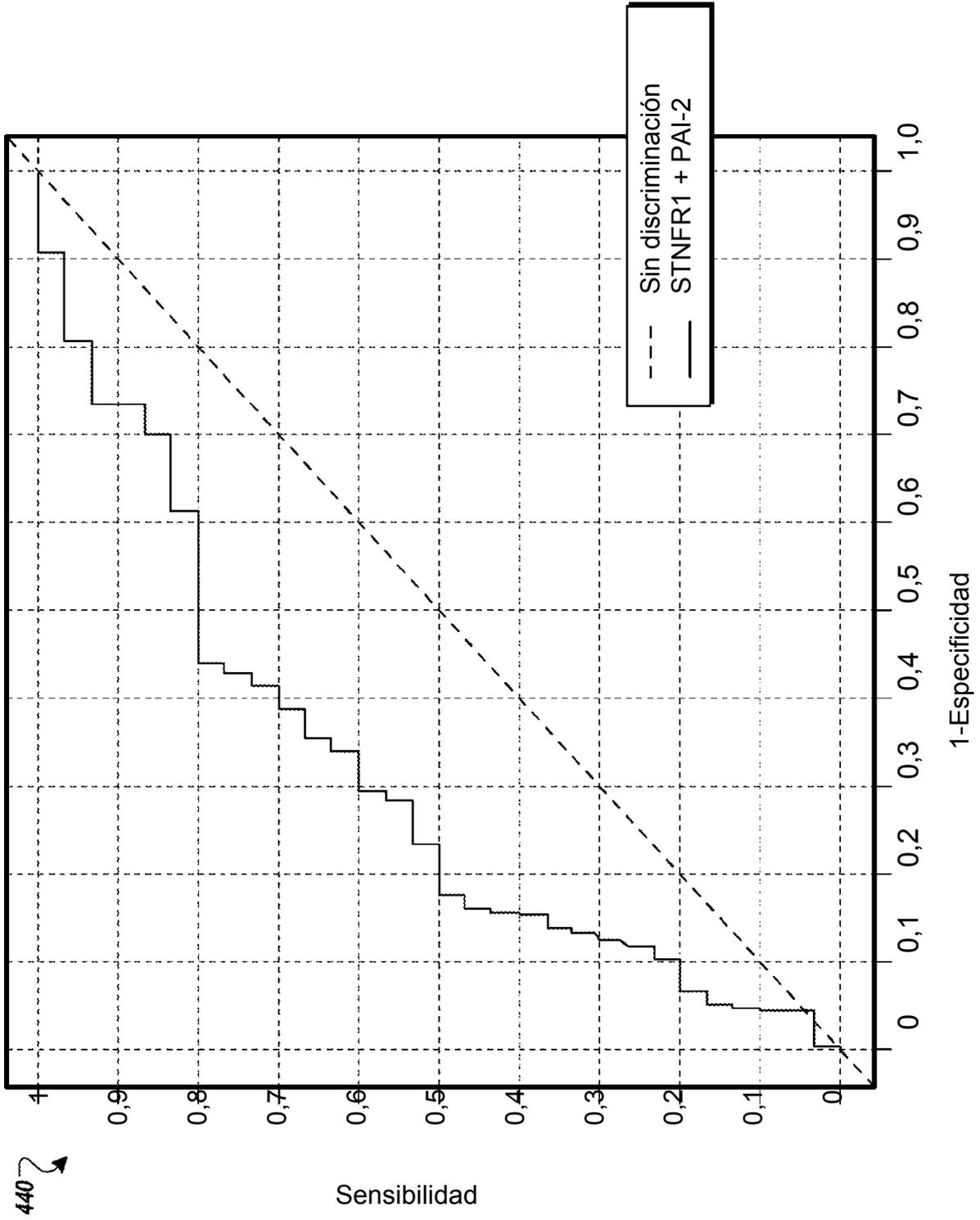


FIG. 4C

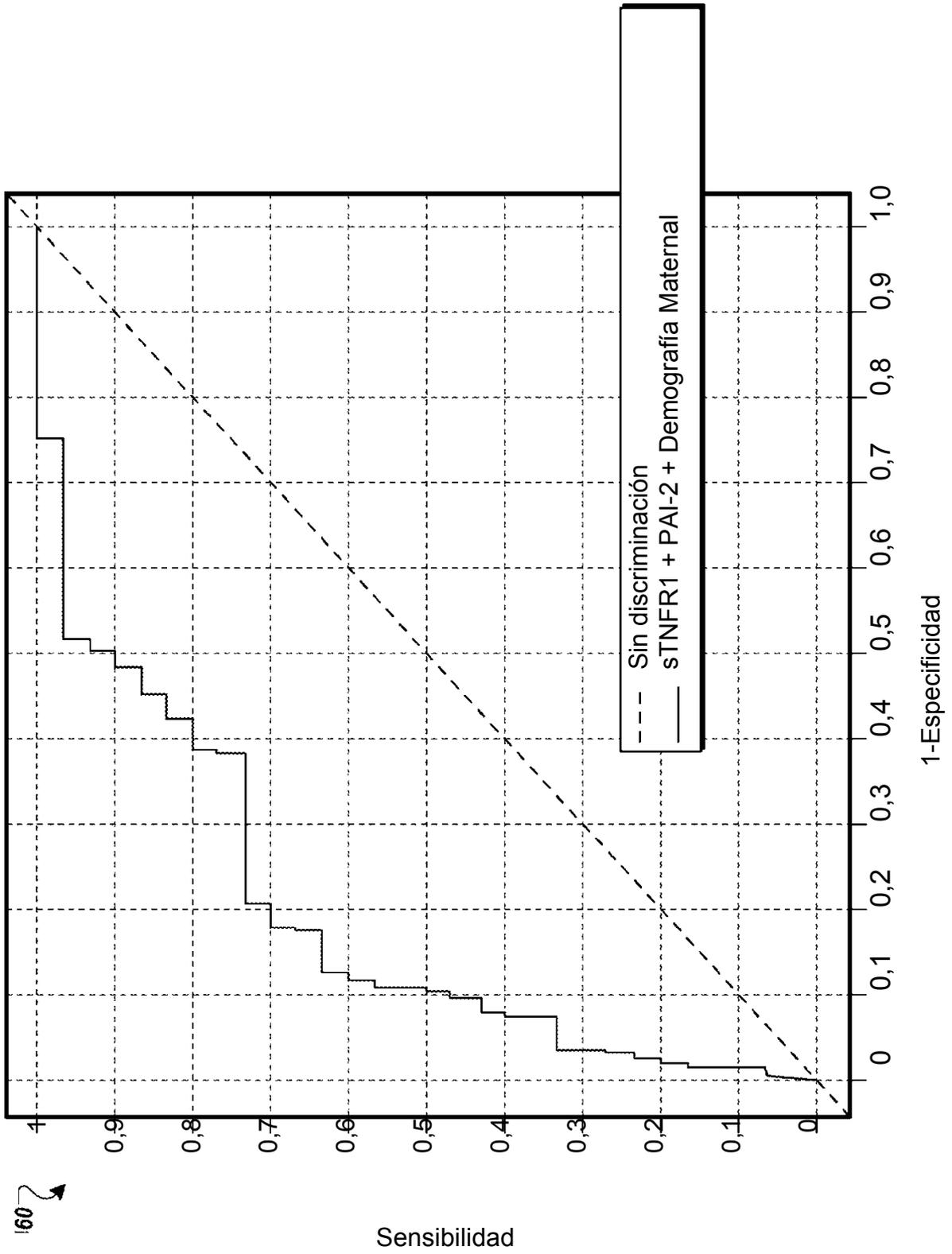


FIG. 4D

500 ↘

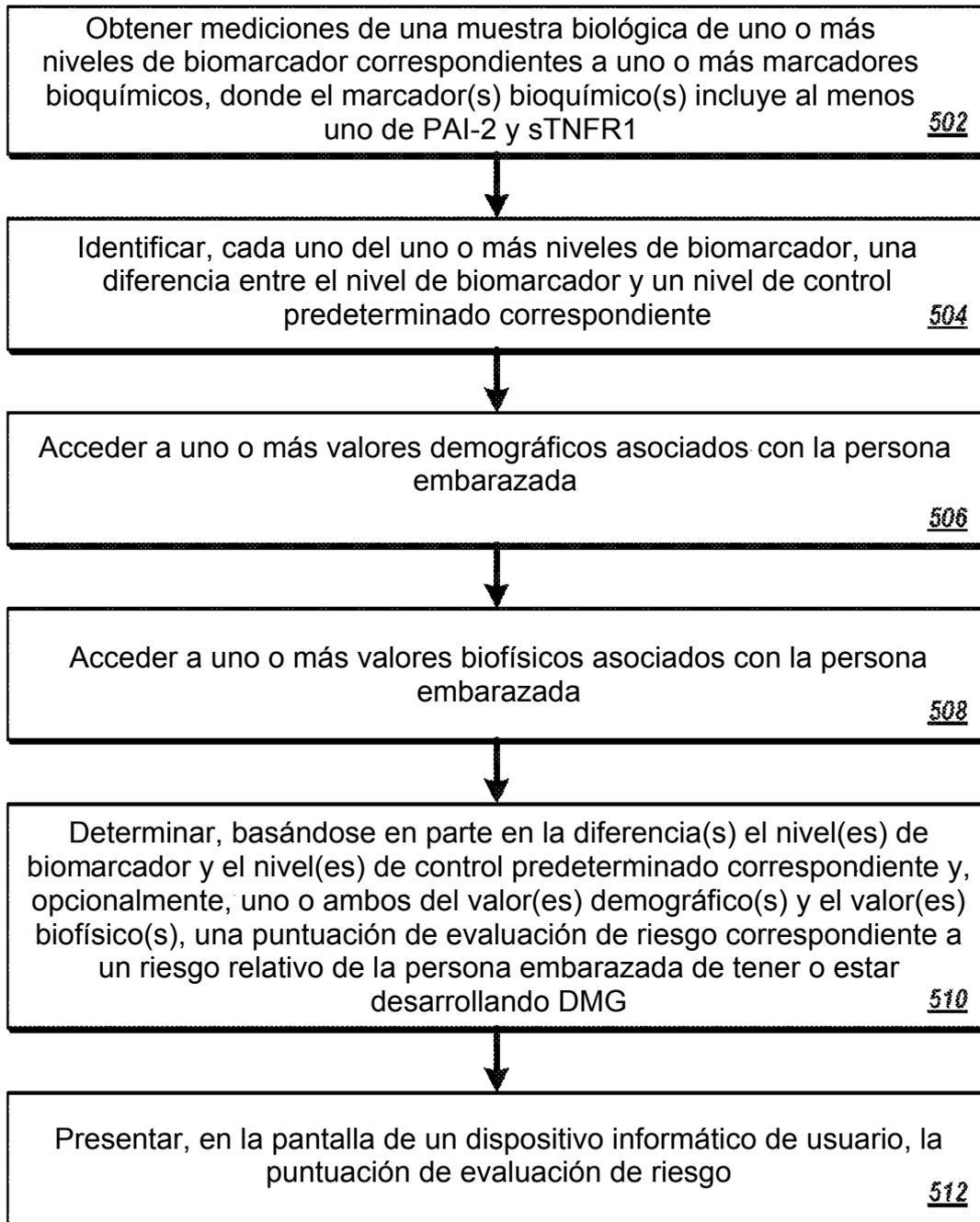


FIG. 5

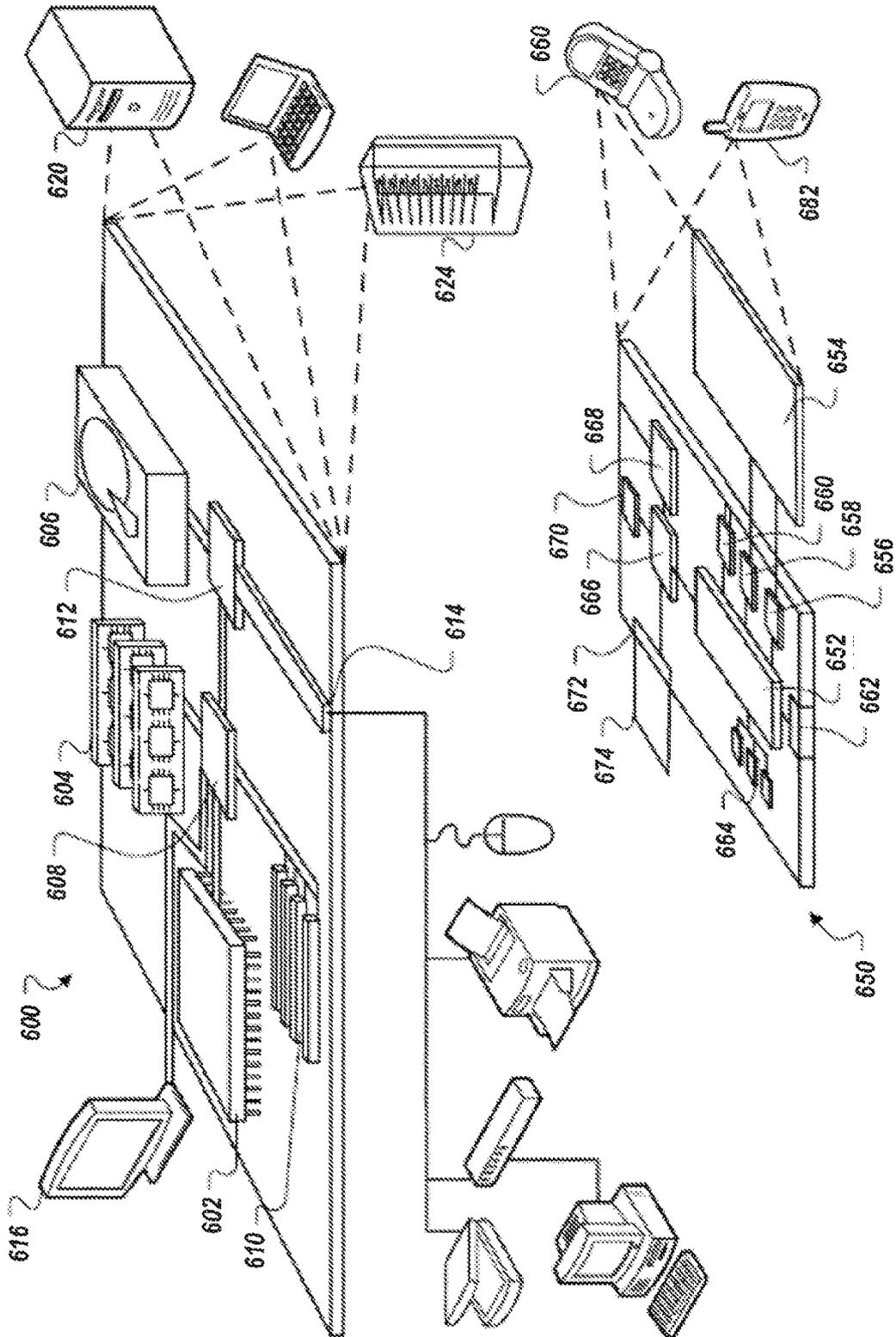


FIG. 6