(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 772 930**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 16205552 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3199951**

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

(30) Prioridad:

31.10.2008 EP 08168096

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

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

DESCRIPCIÓN

Prohormona arginina vasopresina como biomarcador predictivo para la diabetes

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de los biomarcadores pronósticos y los ensayos de pronóstico. La solicitud se relaciona particularmente con la predicción de la diabetes.

Antecedentes de la invención

La arginina vasopresina (AVP), también conocida como hormona antidiurética (ADH), se produce en el hipotálamo y se libera de la glándula neuropituitaria en condiciones de alta osmolalidad plasmática, bajo volumen plasmático y presión arterial baja. AVP se une a tres receptores diferentes (V1aR, V1bR y V2R). El VlaR está ampliamente expresado (Nature 1993:356:523-526), mientras que V1bR y V2R se expresan más específicamente en la glándula pituitaria y los conductos colectores renales, respectivamente (Nature 1992:336-339 y FEBS Lett 1994:356:215-220). El efecto antidiurético de AVP está mediado por V2R y el bloqueo farmacológico de V2R tiene efectos favorables en el tratamiento de la hiponatremia y la insuficiencia cardíaca, mientras que los efectos protrombóticos y vasoconstrictores de AVP, que se usan clínicamente en hemorragias y trastornos hipotensores, están mediados principalmente por V1aR. Además, se ha sugerido que la acción de AVP está relacionada con la modulación de la liberación de ACTH (V1bR), la estimulación de la glucogenólisis hepática (V1aR) y la estimulación de la secreción de insulina y glucagón (V1aR) (Morel y otros, Nature 1992; 356(6369):523-6; de Keyzer y otros, FEBS letters 1994; 356(2-3):215-20; Ventura y otros, Journal of molecular endocrinology 1999; 22(3):251-60).

Estudios previos en humanos y modelos animales han indicado un papel del sistema de AVP en la homeostasis de la glucosa, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus. En pacientes con diabetes mellitus mal controlada y aumento de la osmolalidad, la AVP en plasma está marcadamente elevada (Lolait y otros, Nature 1992; 357(6376):336-9) y en sujetos sanos la infusión de AVP conduce a un aumento de los niveles de glucosa en sangre (Schrier y otros, N Engl J Med 2006; 355(20):2099-112). Los ratones que carecen de VlaR presentan intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y niveles elevados de AVP (Gheorghiade y otros, Jama 2007;297(12):1332-43; Federici y otros, Annals of medicine 2007;39(5):346-58) mientras que los ratones que carecen de V1bR tienen el fenotipo opuesto que consiste en niveles más bajos de glucosa plasmática en ayunas y mayor sensibilidad a la insulina, en comparación con los ratones normales (Dunser y otros, Circulation 2003; 107(18):2313-9).

El gen de vasopresina codifica una proteína precursora (pre-pro-AVP) que comprende una secuencia señal de 19 aminoácidos, arginina vasopresina y dos proteínas asociadas, neurofisina II y un glucopéptido, copeptina. La copeptina es un producto de escisión biológicamente inactivo del extremo C terminal del precursor de AVP y se produce en cantidades equimolares con AVP. Sin embargo, en contraste con AVP, la copeptina es estable, tiene una vida media larga, no está unida a las plaquetas y, por lo tanto, se encuentra en concentraciones en plasma considerablemente más altas que AVP, y se ha propuesto como un objetivo de diagnóstico alternativo para evaluar la liberación de vasopresina (Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. Peptides. Diciembre de 2005; 26(12):2500-4.).

La AVP se ha descrito como marcador de diagnóstico para la diabetes mellitus y se sabe que el nivel de AVP está relacionado con la diabetes mellitus como un estresor agudo o crónico mediante el uso de modelos animales de diabetes mellitus tipo I. (Sun Shin Yi y otros, Enhanced expressions of arginine vasopressing (Avp) in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nucleic of type 2 diabetic rats, Neurochem Res (2008) 33:833-841)

Resumen de la invención

Sorprendentemente, los inventores de la presente descubrieron que existe una relación entre los niveles relativamente aumentados de la prohormona arginina vasopresina (AVP) o sus fragmentos y la presencia de síndrome metabólico y el riesgo de desarrollar diabetes. En este contexto, la presente invención proporciona un ensayo de copeptina sensible y preciso como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La determinación (o medición o detección) del nivel de prohormona arginina vasopresina o sus fragmentos en la presente descripción se realiza mediante el uso de un ensayo de diagnóstico como se explica a continuación.

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

El fragmento de la prohormona arginina vasopresina (pro-AVP) no es la AVP madura.

En una realización particularmente preferida del método, se determina el nivel de copeptina.

Como se menciona en la presente memoria en el contexto de las prohormonas y otros péptidos, el término "fragmento" se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que pueden derivarse de proteínas o péptidos más grandes, que por lo tanto comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido más grande. Dichos fragmentos pueden derivarse de las proteínas o péptidos más grandes por saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos.

Los "fragmentos" de la prohormona arginina vasopresina (pro-AVP) se refieren preferiblemente a fragmentos de al menos 6 aminoácidos de longitud, con la máxima preferencia al menos 12 restos de aminoácidos de longitud. Tales fragmentos pueden detectarse preferiblemente con ensayos inmunológicos como se describe en la presente memoria.

En el contexto de la presente invención, el término "nivel" en expresiones tales como "nivel de una prohormona" y expresiones similares, se refiere a la cantidad de la entidad molecular mencionada en el contexto respectivo, o en el caso de enzimas también puede referirse a la actividad enzimática.

Los métodos de acuerdo con la presente invención son especialmente adecuados para la predicción del riesgo de desarrollar diabetes tipo II.

La predicción del riesgo del sujeto para contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o el diagnóstico del síndrome metabólico puede mejorarse en una realización al determinar y usar adicionalmente el nivel de al menos un parámetro de laboratorio o marcador adicional seleccionado del 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, CRP, péptidos natriuréticos de tipo A y B, así como sus precursores y fragmentos de los mismos, incluidos ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, GDF15, ST2, procalcitonina y sus fragmentos, pro-adrenomedulina y fragmentos de esta, incluidos ADM, PAMP, MR-proADM, CT-proADM, pro-endotelina 1 y fragmentos de estos que incluyen CT-proET-1, NT-proET-1, big-endotelina 1 y endotelina 1.

En realizaciones particulares de la invención, adicionalmente se determina al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende edad, sexo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, tratamiento antihipertensivo (TAH), índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, relación cintura-cadera, fumador actual, herencia de diabetes y enfermedad cardiovascular previa (ECV).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes es una enfermedad crónica, que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede usar eficazmente la insulina que produce. Esto conduce a un aumento de la concentración de glucosa en la sangre (hiperglucemia). La diabetes tipo 1 (anteriormente conocida como diabetes insulinodependiente o de inicio en la infancia) se caracteriza por la falta de producción de insulina. La diabetes tipo 2 (anteriormente llamada diabetes no dependiente de insulina o de inicio en adultos) es causada por el uso ineficaz de la insulina por parte del cuerpo. A menudo es un resultado del exceso de peso corporal y la inactividad física.

La diabetes mellitus tipo 2 o diabetes tipo 2 es un trastorno metabólico que se caracteriza principalmente por la resistencia a la insulina, la deficiencia relativa de insulina y la hiperglucemia. La definición de diabetes de la Organización Mundial de la Salud es para una única lectura de glucosa elevada con síntomas, de lo contrario valores elevados en dos ocasiones, ya sea: (i) glucosa en plasma en ayunas > 7,0 mmol/l (126 mg/dl) o (ii) con una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG), dos horas después de la dosis oral, una glucosa en plasma **>** 11,1 mmol/l (200 mg/dl). Un síntoma inicial común de diabetes tipo 2 es un ligero olor a fruta o vegetal en el aliento. Esto es causado por la cetosis inducida por la falta de respuesta a la insulina, lo que lleva a la falta de glucosa interna a las células. Comúnmente acompañan niveles altos de glucosa en sangre, que también son el resultado de una disminución de la sensibilidad a la insulina.

El síndrome metabólico es una combinación de trastornos médicos que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes. Afecta a una gran cantidad de personas, y la prevalencia aumenta con la edad. Algunos estudios estiman que la prevalencia en los EE. UU. es de hasta el 25 % de la población. El síndrome metabólico también se conoce como síndrome metabólico X, síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven y CHAOS (Australia). Es importante identificar tempranamente a las personas con síndrome metabólico, para que las intervenciones en el estilo de vida y el tratamiento puedan prevenir el desarrollo de diabetes y/o enfermedades cardiovasculares. La causa subyacente del síndrome metabólico continúa desafiando a los expertos. Tanto la resistencia a la insulina como la obesidad central se consideran factores importantes. La genética, la inactividad física, el envejecimiento, un estado proinflamatorio y los cambios hormonales también pueden tener un efecto causal, pero el papel de estos puede variar según el grupo étnico. Como consecuencia de la incertidumbre sobre la causa mecanicista del síndrome metabólico, ha existido mucha confusión sobre la definición del síndrome metabólico. La existencia de múltiples definiciones para el síndrome metabólico ha causado confusión y ha conducido a muchos estudios y trabajos de investigación que comparan los méritos de cada definición. De acuerdo con el Resumen Ejecutivo del Tercer Informe del Panel de Expertos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) sobre detección, evaluación y tratamiento del colesterol alto en sangre en adultos (Panel para el tratamiento en adultos III) (JAMA. 2001;285(19):2486-2497) el síndrome metabólico

se define como la presencia de tres o más de los siguientes componentes de la siguiente manera: (1) Circunferencia de la cintura ≥ 88 cm (35 pulgadas) en mujeres o ≥ 102 cm (40 pulgadas) en hombres, (2) PA ≥130/85 mmHg o tratamiento para la hipertensión, (3) triglicéridos en ayunas ≥ 150 mg/dL, (4) colesterol HDL ≤ 40 mg/dL en hombres o ≤ 50 mg/dL en mujeres y (5) glucosa sanguínea en ayunas ≥ 110 mg/dL o tratamiento para la diabetes. La Federación Internacional de Diabetes ha dado una definición más reciente con algunas modificaciones (http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf). Como el objetivo de definir el síndrome metabólico es la identificación de sujetos con mayor riesgo de desarrollar diabetes y/o enfermedades cardiovasculares, los factores pronósticos asociados independientemente con dicho riesgo pueden estar directamente asociados con el síndrome metabólico y, en ese sentido, son factores diagnósticos de la presencia del síndrome metabólico. Por consiguiente, un marcador, que es independientemente predictivo para el desarrollo de diabetes, como se muestra para la copeptina en la presente invención, debe considerarse al mismo tiempo un marcador de diagnóstico (junto con otros parámetros de laboratorio y clínicos de diagnóstico) para la presencia del síndrome metabólico, e incluso se puede anticipar que se convertirá en parte de la definición del síndrome metabólico en el futuro.

Por lo tanto, los niveles determinados de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta en una muestra de sujetos pueden usarse junto con otros parámetros clínicos y/o de laboratorio para ayudar a definir el "síndrome metabólico" como una afección médica. En otras palabras, el nivel de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta pueden usarse como parámetro adicional para mejorar la definición del síndrome metabólico en términos de criterios decisivos, ya que los criterios actuales como se describió anteriormente no conducen en todos los casos a resultados satisfactorios.

La resistencia a la insulina (IR) es un estado en el cual una concentración dada de insulina produce un efecto biológico menor al esperado. La resistencia a la insulina también se ha definido arbitrariamente como el requisito de 200 o más unidades de insulina por día para lograr el control glucémico y prevenir la cetosis. Los altos niveles plasmáticos de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina a menudo conducen al síndrome metabólico y la diabetes tipo 2, incluidas sus complicaciones. Los síntomas de IR pueden incluir fatiga, confusión mental, incapacidad para concentrarse, bajo nivel de azúcar en la sangre, hinchazón intestinal, somnolencia, aumento de peso, almacenamiento de grasa, dificultad para perder peso, aumento de los niveles de triglicéridos en la sangre, aumento de la presión arterial y depresión.

Se describe un método para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para identificar a un sujeto que tiene un mayor riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto como se describió anteriormente, en donde el nivel de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta, ya sea solo o junto con otros parámetros clínicos o de laboratorio útiles en el pronóstico, se utiliza para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para el diagnóstico del síndrome metabólico mediante un método que puede seleccionarse entre las siguientes alternativas:

- Comparación con la mediana del nivel de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos,
- Comparación con un cuantil del nivel de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos,
- Cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante el uso de cálculos del índice de riesgo como el NRI (Índice de reclasificación neta) o el IDI (Índice de discriminación integrado).

El nivel de prohormona arginina vasopresina (AVP) o fragmentos de esta que tienen al menos una longitud de 12 aminoácidos se determina en un ensayo de diagnóstico, preferiblemente mediante un inmunoensayo. Se prefiere particularmente que se determine el nivel de copeptina o fragmentos de esta que tengan al menos una longitud de 12 aminoácidos.

Se describe la comparación del nivel de un marcador (aquí la prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta como la copeptina) para el individuo con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. Puede ser un valor de corte único, como por ejemplo una mediana o media o el percentil 75, 90, 95 o 99 de una población. Se puede establecer sobre la base de grupos comparativos, tal como cuando el riesgo en un grupo definido es el doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un rango, por ejemplo, donde la población analizada se divide en partes iguales (o desiguales) en grupos, tal como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de alto riesgo, o en cuartiles, donde el cuartil más bajo son individuos con el menor riesgo y el cuartil más alto son individuos con el mayor riesgo.

El valor predeterminado puede variar entre las poblaciones particulares seleccionadas, en dependencia de sus hábitos, origen étnico, genética, etc. Por ejemplo, una población aparentemente sana, no fumadora (sin enfermedad detectable, particularmente sin diabetes mellitus) podría tener un rango "normal" y diferente de marcadores que una población fumadora o una población cuyos miembros tienen diabetes mellitus. En consecuencia, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que cae un individuo. Los rangos y categorías apropiados se pueden seleccionar solo con la experimentación de rutina por parte de los expertos en la materia.

En el método descrito, el uso de dicho nivel de prohormona de arginina vasopresina o fragmentos de esta comprende comparar dicho nivel de prohormona de arginina vasopresina o fragmentos de esta con un nivel umbral, de manera que, cuando dicho nivel de prohormona de arginina vasopresina o fragmentos de esta excede dicho nivel umbral, se predice diabetes mellitus y/o síndrome metabólico en un sujeto o se identifica que un sujeto tiene un mayor riesgo de contraer

diabetes mellitus y/o síndrome metabólico.

Otros valores de corte preferidos son, por ejemplo, el percentil 90, 95 o 99 de una población normal. Al usar un percentil más alto que el percentil 75, se reduce la cantidad de sujetos falsos positivos identificados, pero se puede dejar de identificar a los sujetos, que están en riesgo moderado, aunque aún mayor. Por lo tanto, se podría adoptar el valor de corte en dependencia de si se considera más apropiado identificar a la mayoría de los sujetos en riesgo a expensas de identificar también "falsos positivos", o si se considera más apropiado identificar principalmente a los sujetos con alto riesgo a expensas de perder varios sujetos con riesgo moderado.

Otras posibilidades matemáticas para calcular el riesgo de un individuo mediante el uso del valor de copeptina del individuo y otros parámetros clínicos y de laboratorio de pronóstico se basan, por ejemplo, en el análisis de regresión de Cox o son el NRI (Índice de reclasificación neta) o el IDI (Índice de discriminación integrado). Los índices pueden calcularse de acuerdo con Pencina (Pencina MJ, y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med. 2008; 27:157-172).

Por ejemplo, un nivel de copeptina de 5,04 pmol/L (es decir, la concentración media de una población de referencia de sujetos aparentemente sanos) o superior, preferiblemente superior a 7,93 pmol/L (es decir, la concentración límite Q3/Q4 de una población de referencia de sujetos aparentemente sanos) en la muestra puede ser indicativo de un riesgo elevado de que el paciente contraiga diabetes mellitus. Q1, Q2, Q3 y Q4 en la presente memoria se refieren a cuartiles de una población de referencia de sujetos aparentemente sanos.

En otro aspecto particular, se describe un método para diagnosticar el síndrome metabólico en un sujeto que comprende los siguientes pasos:

a. proporcionar una muestra de dicho sujeto,
b. determinar el nivel de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta en dicha muestra
c. determinar otros parámetros clínicos y/o de laboratorio asociados con el diagnóstico del síndrome metabólico
d. correlacionar el nivel de prohormona arginina vasopresina o fragmentos de esta junto con otros parámetros clínicos y/o de laboratorio asociados con el diagnóstico del síndrome metabólico.

También está dentro del alcance de la presente invención un ensayo para la determinación del nivel de copeptina en una muestra para predecir el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus.

Preferiblemente, el ensayo tiene una imprecisión total del ensayo de 20 % del CV a una concentración inferior a 2,2 pmol/L y menor que el 20 % del CV a concentraciones normales superiores a esa concentración, y/o 10 % del CV a una concentración inferior a 9 pmol/L y menor que el 10 % del CV a concentraciones normales superiores a esa concentración.

En otra realización preferida, el ensayo tiene una imprecisión total del ensayo de un máximo del 12 % a la concentración media de copeptina determinada en suero o plasma de una población caucásica de mujeres sanas en ayunas en reposo.

En una realización preferida de los ensayos descritos anteriormente, el ensayo comprende dos anticuerpos anti-copeptina, en donde al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal o fragmento o variante recombinante de este

La invención también se refiere a un ensayo para la determinación del nivel de copeptina en una muestra, en donde el ensayo comprende dos anticuerpos anti-copeptina, en donde al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal.

El ensayo comprende un anticuerpo monoclonal y uno policlonal.

El anticuerpo monoclonal se une a un epítopo comprendido en un péptido que representa las posiciones 132 a 147 de pre-pro-vasopresina.

Los niveles de los marcadores obtenidos por los métodos o por el uso de los ensayos de acuerdo con la presente invención pueden analizarse de varias maneras bien conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, cada resultado obtenido de un ensayo puede compararse con un valor "normal", o un valor que indica una enfermedad o resultado particular. Un diagnóstico/pronóstico particular puede depender de la comparación de cada resultado del ensayo con dicho valor, que puede denominarse "umbral" de diagnóstico o pronóstico. En ciertas realizaciones, los ensayos para uno o más indicadores de diagnóstico o pronóstico se correlacionan con una afección o enfermedad simplemente por la presencia o ausencia del (de los) indicador(es) en el ensayo. Por ejemplo, un ensayo puede diseñarse de modo que solo se produzca una señal positiva por encima de una concentración umbral de interés en particular, y por debajo de dicha concentración el ensayo no proporcione señal por encima del fondo.

La sensibilidad y especificidad de un ensayo de diagnóstico y/o pronóstico dependen de algo más que la "calidad" analítica del ensayo, también dependen de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas de características de funcionamiento del receptor (curvas ROC) se calculan típicamente al graficar el valor de una variable con relación a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" (es decir, aparentemente sanas) y "enfermas" (es decir,

pacientes que padecen diabetes, resistencia a la insulina y/o síndrome metabólico). Para cualquier marcador particular, una distribución de los niveles del marcador para sujetos con y sin una enfermedad probablemente se superpondrán. En dichas condiciones, un ensayo no distingue absolutamente lo normal de lo enfermo con una precisión del 100 %, y el área de superposición indica dónde el ensayo no puede distinguir lo normal de lo enfermo. Se selecciona un umbral, por encima del cual (o por debajo del cual, según el cambio del marcador con la enfermedad), la prueba se considera anormal y por debajo del cual la prueba se considera normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita la identificación correcta de una afección. Las curvas ROC se pueden usar incluso cuando los resultados de la prueba no necesariamente dan un número exacto. Siempre que se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de una prueba en muestras "patológicas" pueden clasificarse según el grado (por ejemplo, 1 = bajo, 2 = normal y 3 = alto). Esta clasificación se puede correlacionar con los resultados en la población "normal" y crear una curva ROC. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hanley y otros, Radiology 143: 29-36 (1982). Preferiblemente, se selecciona un umbral para proporcionar un área de curva ROC mayor de aproximadamente 0,5, con mayor preferencia mayor de aproximadamente 0,7, aún con mayor preferencia mayor de aproximadamente 0,8, incluso con mayor preferencia mayor de aproximadamente 0,85, y con la máxima preferencia mayor de aproximadamente 0,9. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- el 5 % de una medición dada.

El eje horizontal de la curva ROC representa (1-especificidad), que aumenta con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la tasa de verdaderos positivos. Por lo tanto, para un punto de corte particular seleccionado, se puede determinar el valor de (1-especificidad), y se puede obtener una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que el nivel del marcador medido permita la identificación correcta de una enfermedad o afección. Por lo tanto, el área bajo la curva ROC se puede usar para determinar la efectividad del ensayo.

En ciertas realizaciones, no se confía en umbrales particulares para uno o más marcadores en un panel para determinar si un perfil de los niveles de marcadores que se obtienen de un sujeto es indicativo de un diagnóstico/pronóstico en particular. Más bien, la presente invención puede utilizar una evaluación de un "perfil" del panel de marcadores como un todo unitario. Un patrón particular de "huellas" de los cambios en dicho panel de marcadores puede, en efecto, actuar como un indicador de diagnóstico o pronóstico específico. Como se analiza en la presente memoria, ese patrón de cambios puede obtenerse de una sola muestra, o de cambios temporales en uno o más miembros del panel (o un valor de respuesta del panel). Un panel en la presente memoria se refiere a un conjunto de marcadores.

Como se describe en la presente memoria más adelante, el valor de respuesta del panel se determina preferiblemente mediante el trazado de curvas ROC para la sensibilidad de un panel particular de marcadores frente a 1-(especificidad) para el panel en varios puntos de corte. En estos métodos, un perfil de mediciones de marcadores de un sujeto se considera en conjunto para proporcionar una probabilidad global (expresada como una puntuación numérica o como un riesgo porcentual) de un diagnóstico o pronóstico. En tales realizaciones, un aumento en un cierto subconjunto de marcadores puede ser suficiente para indicar un diagnóstico/pronóstico particular en un paciente, mientras que un aumento en un subconjunto diferente de marcadores puede ser suficiente para indicar el mismo diagnóstico/pronóstico u otro diferente en otro paciente. Los factores de ponderación también se pueden aplicar a uno o más marcadores en un panel, por ejemplo, cuando un marcador tiene una utilidad particularmente alta para identificar un diagnóstico/pronóstico en particular, se puede ponderar de modo que solo en un nivel dado sea suficiente para indicar un resultado positivo. Del mismo modo, un factor de ponderación puede proporcionar que ningún nivel dado de un marcador en particular sea suficiente para indicar un resultado positivo, sino que solo indica un resultado cuando otro marcador también contribuye al análisis.

En ciertas realizaciones, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan para exhibir al menos aproximadamente 70 % de sensibilidad, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 % de sensibilidad, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 % de sensibilidad, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 % de sensibilidad, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95 % de sensibilidad, combinado con al menos aproximadamente 70 % de especificidad, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 % de especificidad, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 % de especificidad, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 % de especificidad, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95 % de especificidad. En realizaciones particularmente preferidas, tanto la sensibilidad como la especificidad son al menos aproximadamente 75 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 %, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 %, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 %, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95 %. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- el 5 % de una medición dada.

En otras realizaciones, se usa una razón de probabilidad positiva, una razón de probabilidad negativa, una razón de probabilidad o razón de riesgo como una medida de la capacidad de una prueba para predecir el riesgo o diagnosticar una enfermedad. En el caso de una razón de probabilidad positiva, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo control. En el caso de una razón de probabilidad negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable entre los sujetos en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que un resultado

negativo es más probable en el grupo de ensayo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo control. En ciertas realizaciones preferidas, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferiblemente para exhibir una relación de probabilidad positiva o negativa de al menos aproximadamente 1,5 o más o aproximadamente 0,67 o menos, con mayor preferencia al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0,2 o menos, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 10 o más o aproximadamente 0,1 o menos, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 20 o más o aproximadamente 0,05 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- el 5 % de una medición dada.

En el caso de una razón de probabilidad, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo control. En ciertas realizaciones preferidas, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferiblemente para exhibir una razón de probabilidad de al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos, con mayor preferencia al menos aproximadamente 3 o más o aproximadamente 0,33 o menos, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 4 o más o aproximadamente 0,25 o menos, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0,2 o menos, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 10 o más o aproximadamente 0,1 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- el 5 % de una medición dada.

En el caso de una razón de riesgo, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (p. ej., muerte) es igual en los grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor de 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo control. En ciertas realizaciones preferidas, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferiblemente para exhibir una relación de riesgo de al menos aproximadamente 1,1 o más o aproximadamente 0,91 o menos, con mayor preferencia al menos aproximadamente 1,25 o más o aproximadamente 0,8 o menos, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 1,5 o más o aproximadamente 0,67 o menos, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 2,5 o más o aproximadamente 0,4 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/5 % de una medición dada.

El experto en la técnica comprenderá que asociar un indicador de diagnóstico o pronóstico, con un diagnóstico o con un riesgo de pronóstico de un resultado clínico futuro es un análisis estadístico. Por ejemplo, un nivel de marcador mayor que X puede indicar que un paciente tiene más probabilidades de sufrir un resultado adverso que los pacientes con un nivel menor o igual a X, según lo determinado por un nivel de significación estadística. Además, un cambio en la concentración del marcador desde los niveles iniciales puede reflejar el pronóstico del paciente, y el grado de cambio en el nivel del marcador puede estar relacionado con la gravedad de los eventos adversos. La significación estadística a menudo se determina comparando dos o más poblaciones y determinando un intervalo de confianza y/o un valor p. Véase, p. ej., Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos de la invención son 90 %, 95 %, 97,5 %, 98%, 99 %, 99,5 %, 99,9 % y 99,99 %, mientras que los valores preferidos de p son 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, y 0,0001.

En otras realizaciones más, se pueden hacer múltiples determinaciones de marcadores de diagnóstico o pronóstico, y se puede usar un cambio temporal en el marcador para determinar un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, una concentración de un marcador en una muestra del sujeto puede determinarse en un momento inicial, y nuevamente en un segundo momento a partir de una segunda muestra del sujeto. En tales realizaciones, un aumento en el marcador desde el momento inicial hasta el segundo momento puede ser indicativo de un diagnóstico en particular, o un pronóstico en particular. Del mismo modo, una disminución en el marcador desde el momento inicial hasta el segundo momento puede ser indicativa de un diagnóstico en particular o un pronóstico en particular.

El término "muestra", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida con el propósito de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de ensayo preferidas incluyen sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo y derrames pleurales. Además, un experto en la técnica se daría cuenta de que algunas muestras de ensayo se analizarían más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, la muestra se selecciona del 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. Preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre, con la máxima preferencia una muestra de suero o una muestra de plasma.

El término "correlacionar", como se usa en la presente memoria en referencia al uso de marcadores de diagnóstico y pronóstico, se refiere a comparar la presencia o cantidad del (de los) marcador(es) en un paciente con su presencia o cantidad en personas que se sabe que padecen o se sabe que están en riesgo de una afección dada; o en personas que se sabe que no tienen una afección dada. Como se analizó anteriormente, un nivel de un marcador en una muestra del paciente se puede comparar con un nivel que se sabe que está asociado con un diagnóstico específico. Se dice que el

nivel de marcador de la muestra se ha correlacionado con un diagnóstico; es decir, el experto puede usar el nivel del marcador para determinar si el paciente tiene un diagnóstico específico y responder en consecuencia. Alternativamente, el nivel del marcador de la muestra se puede comparar con un nivel de marcador que se sabe que está asociado con un buen resultado *(por ejemplo,* la ausencia de enfermedad, etcétera). En realizaciones preferidas, un perfil de niveles de marcadores se correlaciona con una probabilidad global o un resultado particular.

La invención también se refiere a un método para la estratificación de un paciente en grupos de riesgo, dicho método comprende los pasos descritos anteriormente.

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

La invención se refiere además al uso de un inmunoensayo para un método de acuerdo con la invención, en donde al menos un anticuerpo anti-copeptina o fragmento o variante recombinante de este se usa para determinar el nivel de copeptina o variantes moleculares de esta en una muestra. Preferiblemente, el al menos un anticuerpo anti-copeptina es un anticuerpo monoclonal.

Preferiblemente, el inmunoensayo es un ensayo en sándwich y en donde además del primer anticuerpo anti-copeptina se usa un segundo anticuerpo anti-copeptina para determinar el nivel de copeptina o variantes moleculares de esta en una muestra. Preferiblemente, al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo monoclonal.

También está dentro del alcance de la presente invención el uso *in vitro* de una sonda de captura dirigida contra la vasopresina o fragmentos de esta o sus precursores o fragmentos de estos para predecir el riesgo de un sujeto aparentemente sano de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico o para diagnosticar síndrome metabólico en un sujeto. Preferiblemente, las sondas de captura se dirigen contra uno o más epítopos ubicados en las posiciones de aminoácidos 126-164 de pre-pro-AVP.

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

Los fragmentos o variantes recombinantes de dicho anticuerpo monoclonal exhiben al menos el 80 % de la afinidad de dicho anticuerpo monoclonal para pre-pro-AVP. Preferiblemente, los fragmentos o variantes recombinantes de dicho anticuerpo monoclonal exhiben al menos el 80 % de la afinidad de dicho anticuerpo monoclonal para el epítopo comprendido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de pre-pro-AVP. Este es un requisito previo preferido para la presente invención ya que solo los fragmentos mencionados anteriormente y la variante recombinante son tan útiles como el anticuerpo monoclonal para proporcionar un ensayo de acuerdo con la presente invención que es un ensayo que tiene una imprecisión total del ensayo de 20 % de CV a una concentración por debajo de 2,2 pmol/L y menor que el 20 % de CV a concentraciones normales superiores a esa concentración, y/o 10 % de CV a una concentración inferior a 9 pmol/l y menor que el 10 % de CV a concentraciones normales superiores a esa concentración. Este ensayo puede proporcionarse si al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal o un fragmento o variante recombinante de este que exhibe al menos el 80 % de la afinidad de dicho anticuerpo monoclonal para el epítopo comprendido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de pre-pro-AVP.

La secuencia de aminoácidos de pre-pro-AVP se proporciona en la SEQ ID NO: 1 (Figura 1). La secuencia de aminoácidos de la copeptina se proporciona en la SEQ ID NO: 2 (Figura 2). La copeptina puede estar glicosilada. Pre-pro-AVP es el péptido precursor de la prohormona arginina vasopresina (pro-AVP, SEQ ID NO: 3, Fig. 3) y sus fragmentos (incluidas arginina vasopresina, neurofisina II y copeptina). Además de pro-AVP, pre-pro-AVP comprende una secuencia señal de 19 aminoácidos en el N-terminal. A menos que se indique lo contrario, todas las especificaciones de secuencias en la presente memoria se refieren a la secuencia de pre-pro-AVP. Como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo puede estar basado en la unión de un analito a detectar a una o más sondas de captura con una cierta afinidad. Con respecto a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas objetivo o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferiblemente mayor que 10^8 M^{-1}.

En el contexto de la presente invención, las "moléculas de captura" son moléculas que pueden usarse para unir moléculas objetivo o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, el péptido o péptidos cardiovasculares) de una muestra. Las moléculas de captura deben, por lo tanto, tener una forma adecuada, tanto espacialmente como en términos de características de la superficie, tales como carga superficial, hidrofobicidad, hidrofilicidad, presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unir específicamente las moléculas objetivo o moléculas de interés. Por este medio, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrofóbicas o de enlaces de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente entre las moléculas de captura y las moléculas objetivo o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de ARN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferiblemente, las moléculas de captura son anticuerpos, que incluyen fragmentos de los mismos con suficiente afinidad a un objetivo o molécula de interés, y que incluyen anticuerpos recombinantes o fragmentos de

anticuerpos recombinantes, así como derivados modificados químicamente y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de al menos 12 aminoácidos de la misma.

Los métodos de detección preferidos comprenden inmunoensayos en varios formatos, tales como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), matrices de perlas basadas en Lu-minex, ensayos de micromatrices de proteínas y formatos de pruebas rápidas como por ejemplo pruebas de tiras inmunocromatográficas.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos tipo sandwich competitivos y no competitivos. En una realización particularmente preferida, el ensayo está en la forma de un ensayo tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en donde la molécula a detectar y/o cuantificar está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo, una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, por ejemplo, con un colorante, con un radioisótopo, o un resto reactivo o catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se mide entonces mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos involucrados con los "ensayos sandwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayo 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C y otros, Curr Opin Chem Biol. 2006 feb;10(1):4-10. PMID: 16376134, incorporado en la presente memoria como referencia).

En una realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferiblemente anticuerpos que están presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en donde un primer componente de marcaje está unido a la primera molécula de captura, en donde dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la amplificación o inactivación con fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcado se une a la segunda molécula de captura, de modo que al unirse ambas moléculas de captura al analito se genera una señal medible que permite la detección de los complejos sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

Aún con mayor preferencia, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o un colorante de quimioluminiscencia, en particular un colorante del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden el uso de colorantes, que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que comprende FAM (5 o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), Rodamina, Rodamina Verde, Rodamina Roja, Rodamina 110, colorantes BODIPY, como BODIPY TMR, Oregon Green, cumarinas como Umbeliferona, benzimidas, como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como Texas Red, Yakima Yellow, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden el uso de colorantes, basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4ª ed., Editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol.15, p. 518-562, incorporado en la presente memoria como referencia, incluidas las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son ésteres de acridinio.

La realización de máxima preferencia en donde el ensayo comprende un anticuerpo monoclonal y uno policlonal se comparó con un ensayo que comprende dos anticuerpos policlonales. Para evaluar comparativamente la precisión de ambos ensayos, se determinó la imprecisión total del ensayo mediante la medición, por duplicado, de 22 muestras de suero humano con diversas concentraciones de copeptina. Estos datos fueron generados por 6 operadores diferentes en 12 ejecuciones del ensayo, con 2 lotes diferentes de reactivos en 2 laboratorios diferentes. Los perfiles de precisión resultantes se muestran en las figuras 4 y 5. Para el ensayo de poli/poli, se obtuvo el 20 % de CV a 2,2 pmol/L y el 10 % de CV a 9 pmol/L. En contraste, para el ensayo mono/poli, se obtuvo el 20 % de CV a 0,75 pmol/L y el 10 % de CV a 2,9 pmol/L.
Se ha informado que las concentraciones medias de copeptina de hembras sanas en ayunas en reposo son de 3,2 pmol/L (Bhandari SS, Loke I, Davies JE, Squire IB, Struck J, Ng LL. El sexo y la función renal influyen en los niveles plasmáticos de copeptina en individuos sanos. Clin Sci (Lond). 22 de julio de 2008. [Epub antes de imprimir]) y 3,7 pmol/L (Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin.Clin Chem. Enero de 2006; 52(1):112-9.). En el presente análisis, se determinó que la imprecisión total del ensayo a 3,2 pmol/L fue del 15 % para el ensayo de poli/poli, mientras que fue del 9,5 % para el ensayo de mono/poli. Por lo tanto, claramente el ensayo mono/poli es mucho más adecuado para evaluar los niveles de copeptina en la población normal. Ambos ensayos se describen en detalle a continuación:

Ensayo 1 (poli/poli)

La determinación de la copeptina en el formato de quimioluminiscencia/tubo recubierto se realizó como se describe (Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. Clin Chem. Enero de 2006; 52(1):112-9.). Brevemente, los tubos se revistieron con un anticuerpo policlonal de oveja purificado (2 µg/tubo) producido contra un péptido que representa las posiciones 132-147 de pre-pro-vasopresina. Un anticuerpo policlonal de oveja purificado producido contra un péptido que representa las posiciones 149-164 de pre-pro-Vasopresina se marcó con MACN-acridinio-N-hidroxisuccinimida-éster y se usó como marcador. Las diluciones de un péptido que representa las posiciones 132-164 de pre-pro-AVP en suero de caballo normal sirvieron como patrones. El inmunoensayo se realizó al incubar 50 µl de muestras/patrones y 200 µl de marcador en tubos recubiertos durante 2 horas a temperatura ambiente. Los tubos se lavaron 4 veces con 1 ml de solución de lavado LUMItest (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania), y la quimioluminiscencia unida se midió con un luminómetro LB952T (Berthold, Bad Wildbach, Alemania).

Ensayo 2 (mono/poli)

Se desarrolló un anticuerpo monoclonal (294/1A7), que tiene un epítopo en copeptina ubicado en las posiciones correspondientes a 132-147 de pre-pro-Vasopresina. El anticuerpo se desarrolló empleando procedimientos estándar como se ha descrito (Harlow E, Lane D "Antibodies - A Laboratory Manual" 1988 por Cold Spring Harbor Laboratory, páginas 148 y siguientes, ISBN 0-87969-314-2). Brevemente, un péptido sintetizado químicamente que representa las posiciones 132-164 de pre-pro-Vasopresina y extendido por un resto de cisteína adicional en el extremo N terminal se acopló a BSA usando Sulfo-MBS como reticulante. Los ratones Balb/c fueron inmunizados y reforzados con este conjugado. Las células del bazo de los ratones inmunizados se fusionaron con una línea celular de mieloma SP2/0, y las células de hibridoma productoras de anticopeptina se seleccionaron por su capacidad de secretar anticuerpos que reconocen un péptido que cubre las posiciones 132-147 de pre-pro-Vasopresina. Las células de hibridoma seleccionadas positivamente se volvieron a clonar, lo que condujo a varias líneas celulares de hibridoma, una de las cuales produjo el anticuerpo monoclonal 294/1A7, que se usó después.
El anticuerpo monoclonal se usó para reemplazar el anticuerpo policlonal usado en la fase sólida en el ensayo de poli/poli descrito anteriormente. Todos los demás componentes del ensayo y la realización del ensayo no cambiaron en comparación con el ensayo de poli/poli descrito anteriormente.

Con los métodos y ensayos de la presente invención, se puede determinar el riesgo de un sujeto de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico. En otros casos, se puede realizar un diagnóstico de síndrome metabólico, preferiblemente en combinación con otros parámetros clínicos y/o de laboratorio, en un sujeto. A partir de los resultados de los métodos y ensayos de la presente invención, se puede elegir una estrategia de tratamiento o prevención adecuada para un sujeto. Se aconseja a los sujetos con mayor riesgo de contraer síndrome metabólico y/o diabetes mellitus que cambien sus estilos de vida, por ejemplo, que disminuyan moderadamente su ingesta calórica diaria, cambien la composición de la dieta y/o aumenten las actividades físicas.

La correlación entre el nivel de prohormona de arginina vasopresina o fragmentos de esta en muestras de sujetos con riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico, según lo encontrado por los inventores de la presente, sugiere un papel del sistema de vasopresina en la homeostasis de la glucosa y el desarrollo de diabetes. Los niveles elevados de vasopresina (y su prohormona y fragmentos de esta) están asociados con diabetes mellitus y síndrome metabólico. El efecto de la vasopresina puede estar mediado particularmente a través del receptor V1b (V1bR). Por lo tanto, la presente invención también se refiere al tratamiento o prevención del síndrome metabólico y/o diabetes mellitus mediante la inhibición del receptor V1bR. La presente invención se refiere a antagonistas de V1bR para el uso en el tratamiento y/o prevención del síndrome metabólico y/o diabetes mellitus. Los antagonistas de V1bR particularmente preferidos pueden seleccionarse del grupo que comprende anticuerpos y moléculas pequeñas. Antagonistas V1bR posibles pueden ser identificados en ensayos de unión conocidos por el experto mediante la identificación de sus valores de $IC_{50,}$ por ejemplo, con el uso de un ensayo de radio receptor.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de pre-pro-AVP (SEQ ID NO: 1).
Figura 2: Secuencia de aminoácidos de CT-pro-AVP (copeptina) (SEQ ID NO: 2).
Figura 3: Secuencia de aminoácidos de pro-AVP (SEQ ID NO: 3).
Figura 4: Perfil de precisión para el ensayo de copeptina con anticuerpos policlonal/policlonal. Gráfico del coeficiente de variación entre ensayos (CV [%]) con relación a las concentraciones de copeptina [pmol/L]. Se indican las concentraciones de copeptina, que se determinan con un CV del 10 % y 20 %, respectivamente.
Figura 5: Perfil de precisión para el ensayo de copeptina con anticuerpos monoclonal/policlonal. CV entre ensayos [%] graficado con relación a las concentraciones de copeptina [pmol/L]. Se indican las concentraciones de copeptina, que se determinan con un CV del 10 % y 20 %, respectivamente.
Figura 6: La copeptina plasmática elevada se asocia independientemente con diabetes. Las razones de probabilidades se llevan a un gráfico para la diabetes para los cuartiles de los niveles de copeptina. Ajustado según: edad, sexo, TG, HDL, PAS, PAD, AHT, IMC, cintura, W/H, cistatina C, CRP, ECV previa.
Figura 7: La copeptina plasmática elevada es un predictor independiente de diabetes futura (se excluyen los sujetos con diabetes conocida o FBG> 6,0 mM al inicio del estudio). El efecto es independiente de la glucosa inicial. Las razones de probabilidades se llevan a un gráfico para la diabetes incidente para los cuartiles de los niveles de copeptina. Ajustado

según: edad, sexo, TG, HDL, PAS, PAD, AHT, IMC, cintura, W/H, cistatina C, CRP, ECV previa, tabaquismo, herencia de diabetes, insulina fP y glucosa fB.

Figura 8: La copeptina plasmática elevada es un predictor independiente de diabetes futura (se excluyen los sujetos con diabetes conocida o FBG ≥ 5,4 mM al inicio del estudio). Efecto independiente de la glucosa y los restos (se fortalece después de la exclusión de IFG. Las razones de probabilidades se llevan a un gráfico para la diabetes incidente para los cuartiles de los niveles de copeptina. Ajustado según: edad, sexo, TG, HDL, PAS, PAD, AHT, IMC, cintura, W/H, cistatina C, CRP, ECV previa, tabaquismo, herencia de diabetes, insulina fP y glucosa fB.

Figura 9: Gráficos de ROC para la predicción de diabetes futura mediante el uso de a) una combinación de edad, sexo, IMC y herencia de DM y b) con la adición de copeptina a esta combinación.

Figura 10: Gráficos de ROC para la predicción de diabetes futura mediante el uso de a) una combinación de edad, sexo, PAS, IMC, cintura, glucosa, TG, HDL y herencia de DM y b) con la adición de copeptina a esta combinación.

Figura 11: El nivel de glucosa sanguínea en ayunas (mmol/L) se correlacionó con cuartiles de copeptina plasmática en aumento, expresado como media con intervalos de confianza del 95 %, en sujetos no diabéticos (n = 4377). P (tendencia lineal) < 0,001

Figura 12: El nivel de glucosa insulina en ayunas (mU/L) se correlacionó con los cuartiles de copeptina plasmática en aumento, expresado como media con intervalos de confianza del 95 %, en sujetos no diabéticos (n = 4377). P (tendencia lineal) < 0,001

Ejemplos

Ejemplo 1: estudio clínico

El estudio Malmö Diet and Cancer (MDC) es una cohorte prospectiva basada en la población que consistió en 28 449 personas encuestadas en 1991-1996. De esta cohorte, 6103 personas fueron seleccionadas al azar para estudiar la epidemiología de la enfermedad de la arteria carótida, conocida como cohorte cardiovascular de MDC (MDC-CC). Se obtuvieron muestras de plasma en ayunas en 5405 sujetos en la MDC-CC. De ellas, los datos completos de las covariables, incluidos los factores de riesgo conocidos de diabetes, posibles factores de confusión y copeptina en plasma (P-copeptina), estaban disponibles en 4742 individuos (Tabla 1).

La diabetes en el examen inicial se definió como el autoinforme de un diagnóstico médico o el uso de medicamentos antidiabéticos o glucosa en sangre en ayunas (FBG) de ≥ 6,1 mmol/L. Todos los análisis en plasma y sangre se realizaron en muestras después de un ayuno nocturno. La FBG se midió en sangre completa mediante un método de hexoquinasa-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El colesterol LDL se calculó de acuerdo con la fórmula de Friedewald. En muestras de plasma en ayunas que habían sido almacenadas a -80 ° C, medimos la copeptina usando el Ensayo 2 (mono/poli) como se describió anteriormente. La proteína C reactiva (CRP) se midió mediante un ensayo de alta sensibilidad (Tina-quant CRP, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La cistatina C se midió usando un ensayo inmunonefelométrico mejorado con partículas (N Latex Cystatin C, Dade Behring, IL).

La presión sanguínea se midió con el uso de un esfingomanómetro de columna de mercurio después de 10 minutos de descanso en posición supina. La información de tabaquismo se obtuvo mediante un cuestionario autoadministrado, donde el tabaquismo actual se definió como cualquier consumo de tabaco en el último año. La enfermedad cardiovascular previa se definió como la presencia de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular antes del examen inicial. La herencia de diabetes se obtuvo mediante un cuestionario y se definió como diabetes conocida en al menos un pariente de primer grado.

La diabetes de nueva aparición después del examen inicial hasta junio de 2007 fue evaluada mediante tres registros: (1) El registro de HbAlc de Malmo (MHR) en el Departamento de Química Clínica, Malmo University Hospital, que analizó y catalogó todas las muestras de HbAlc tomadas en centros institucionales y atención no institucional en la gran área de Malmo desde 1990 en adelante. En el MHR, los individuos se definieron como diabéticos si tenían al menos dos registros de HbAlc ≥ 6,0 % mediante el uso del sistema de estandarización sueco Mono-S, que corresponde al 7,0 % según el Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina (NGSP) de EE. UU. O al menos tres registros de HbAlc ≥ 5,5 % (correspondiente a 6,5 % según NGSP). (2) El Registro Nacional de Diabetes de Suecia (NDR), que se inició en 1996 y cubrió aproximadamente el 50 % de todos los pacientes con diabetes en Suecia en 2007; (3) Un registro regional de la región de Scania en la que Malmo es la ciudad principal (registro de Diabetes 2000) (Lindholm E, Eur J Epidemiol 2001:17:983-989), que se inició en 2000 y cubrió aproximadamente el 25 % de todos los pacientes diabéticos en la región de Scania en 2001.

Los sujetos que no aparecieron en ninguno de los tres registros antes del examen inicial y que no tenían diabetes en el examen inicial en el MDC-CC de acuerdo con nuestros criterios (es decir, ningún antecedente autoinformado de diabetes diagnosticada por un médico, ausencia de terapia antidiabética, FBG en el examen inicial < 6,0 mmol/L) y se registraron como pacientes con diabetes en el registro NDR o Diabetes 2000 o cumplieron con nuestros criterios de diabetes basados en HbAlc en el MHR en cualquier momento después de su examen inicial en el MDC-CC hasta junio de 2007 fueron clasificados como con diabetes de nueva aparición. Los protocolos de estudio fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Lund. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico SPSS (versión 14,0) para todos los cálculos. Las diferencias entre grupos en las variables continuas se analizaron mediante el uso de la prueba t de Student y se informaron como medias ± DE si se distribuyeron normalmente, mientras que se analizaron con la prueba de Mann-Whitney y se informaron como medianas y rangos intercuartiles si no se distribuyeron normalmente. Las diferencias en las variables dicotómicas se analizaron mediante la prueba de chi-2. El valor de p para la tendencia lineal de glucosa e insulina en ayunas en cuartiles de copeptina P en sujetos no diabéticos se evaluó mediante regresión lineal con la concentración de insulina en ayunas transformada con el logaritmo natural. Utilizamos la regresión logística sin procesar y ajustada multivariada para evaluar si los cuartiles crecientes de copeptina P (Q1copeptina-Q4copeptina, Q1copeptina como la categoría de referencia) estaban relacionados con la diabetes al inicio del estudio en toda la cohorte (n = 4742). En los sujetos sin diabetes al inicio del estudio (n = 4377), se utilizó la regresión logística sin procesar y multivariada para evaluar si los cuartiles crecientes de copeptina P (Q1copeptina-Q4copeptina, Q1copeptina como la categoría de referencia) estaban relacionados con la resistencia a la insulina, definida como perteneciente al cuartil superior de insulina en ayunas, y con la diabetes de nueva aparición. Finalmente, la relación entre los cuartiles crecientes de P-copeptina y el riesgo de diabetes de nueva aparición se probó en sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas (glucosa plasmática en ayunas 6,1 mmol/L correspondiente a FBG <5,5 mmol/L) (n = 3702). Los datos de los análisis de regresión logística se expresaron como razón de probabilidades (OR) e intervalos de confianza (IC) del 95 %. Un valor de p de dos colas < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Para evaluar la sensibilidad y la especificidad de la P-copeptina en la predicción de diabetes de nueva aparición sobre los conjuntos de predictores clásicos de diabetes, comparamos el área bajo las curvas de Características operativas del receptor (ROC) utilizando un modelo personal (edad, sexo, IMC y herencia de diabetes) y un modelo clínico (modelo personal + presión arterial sistólica, triglicéridos, HDL, circunferencia de la cintura y FBG) con y sin P-copeptina en cada uno de los dos modelos.

Resultados

De los pacientes con diabetes en el examen inicial (n = 365), solo el 29 % informó antecedentes de diabetes diagnosticada por un médico o tratamiento, mientras que la mayoría (71%) se clasificaron con diabetes sobre la base de un FBG > 6,1 mmol/L en el examen inicial. La P-copeptina fue mayor entre los pacientes con diabetes en comparación con los sujetos no diabéticos (Tabla 1). En el segmento no diabético de la población, FBG aumentó con la copeptina (Figura 11). Hubo un aumento gradual en la OR para la diabetes con cuartiles crecientes de copeptina tanto en un modelo sin procesar como después del ajuste para todas las características iniciales que diferían significativamente en las comparaciones univariadas entre pacientes con diabetes y controles (Tabla 1), excepto la concentración de insulina en plasma en ayunas (ajuste del modelo 1) (Tabla 2) (Fig. 6). Entre los sujetos no diabéticos, la concentración plasmática de insulina aumentó gradualmente con los cuartiles de P-copeptina (Figura 12) y la OR para la resistencia a la insulina (cuartil superior de insulina plasmática en ayunas en el segmento no diabético de la población) aumentó con P-copeptina tanto en el análisis con datos sin procesar como después del ajuste extendido del modelo 1, incluidas las covariables del modelo 1 y FBG (Tabla 2). Entre los sujetos sin diabetes al inicio del estudio, las concentraciones de copeptina en los límites del cuartil fueron las siguientes: Q1/Q2: 3,13 pmol/L, Q2/Q3: 5,05 pmol/L, Q3/Q4: 7,94 pmol/L.

Entre los sujetos sin diabetes al inicio del estudio (n = 4377), 174 sujetos desarrollaron diabetes de nueva aparición y entre los sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio (n = 3702), 79 sujetos desarrollaron diabetes de nueva aparición durante el seguimiento (Tabla 3). La P-copeptina al inicio del estudio fue significativamente mayor en los sujetos que desarrollaron diabetes de nueva aparición en comparación con aquellos que no lo hicieron tanto entre los sujetos sin diabetes al inicio del estudio como entre los sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio (Tabla 3). La probabilidad de desarrollar diabetes de nueva aparición aumentó con los cuartiles de copeptina P en el análisis con datos sin procesar, así como después del ajuste para las covariables del modelo 1 y la insulina en ayunas, FBG, tabaquismo, herencia de diabetes y LDL tanto en sujetos sin diabetes (Fig. 7) como en sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio (Fig. 8) (Tabla 4). En los sujetos sin diabetes al inicio del estudio, el área bajo la curva de Características Operativas del Receptor (ROC) para la predicción de diabetes futura aumentó de 69,4 a 71,0 % (P = 0,08) y de 83,2 a 84,1 % (P = 0,007) cuando se agregó copeptina al modelo personal y al modelo clínico de predicción de diabetes, respectivamente. En los sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio, el área bajo la curva ROC para la predicción de diabetes futura aumentó de 66,3 a 71,3% (P = 0,03) (Fig. 9) y de 78,3 a 80,5 % (P = 0,04) (Fig. 10) cuando se añadió copeptina al modelo personal y al modelo clínico de predicción de diabetes, respectivamente.

Discusión

Aquí demostramos en una gran cohorte basada en la población que la P-copeptina está marcadamente elevada en pacientes con diabetes y que la P-copeptina aumenta linealmente con FBG en sujetos no diabéticos, es decir, en sujetos con niveles de FBG que definitivamente no afectan la osmolalidad. En los sujetos no diabéticos hubo una fuerte relación transversal entre la P-copeptina y la resistencia a la insulina (según lo estimado por la insulina plasmática en ayunas) y esta relación fue independiente de una gran cantidad de factores de confusión, incluida la FBG. Además, la P-copeptina al inicio del estudio fue un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de diabetes de nueva aparición durante el seguimiento. Es importante destacar que esta relación era independiente de una amplia gama de factores de riesgo conocidos para la diabetes al inicio del estudio, incluida la FBG y la insulina en ayunas, estos dos últimos estaban fuertemente relacionados

con la P-copeptina. Cuando la cohorte se restringió a sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas, la relación entre la P-copeptina y la diabetes de nueva aparición se fortaleció a pesar de que casi la mitad de los casos de diabetes de nueva aparición ocurrieron entre los sujetos que tenían alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio. Como se esperaba, la FBG fue el factor de riesgo más fuerte para la diabetes de nueva aparición. Cada aumento de 1 mmol/L de FBG al inicio del estudio aumentó el riesgo de diabetes futura con una OR de 11,4 (IC del 95 %: 7,4-17,5) en el modelo totalmente ajustado (Tabla 4). Teniendo esto en cuenta, es impresionante que el cuartil superior versus inferior de copeptina se asocie con una OR de 3,6 para la diabetes de nueva aparición en sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas después del ajuste completo de las covariables iniciales, incluida la FBG (Tabla 4). Es importante destacar que, en sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas, hubo una mejora significativa del 2,2-4,0 % del área bajo la curva ROC cuando se agregó P-copeptina a los modelos de factores de riesgo de diabetes clásicos, lo que indica que la P-copeptina mejora la sensibilidad y la especificidad de la predicción individual de riesgo de diabetes. En la muestra más grande, incluidos los sujetos con glucosa en ayunas alterada, la P-copeptina mejoró el área bajo la curva ROC de manera menos marcada. El menor grado de mejoría del área bajo la curva ROC en los análisis que incluyen sujetos con niveles más altos de FBG (es decir, sujetos con alteración de la glucosa en ayunas) puede ser el resultado de que FBG sea un predictor más poderoso de diabetes en los niveles de FBG cerca del límite diagnóstico de 6,1 mmol/L, mientras que los marcadores que no son diagnósticos de diabetes, como la P-copeptina, pueden indicar mejor la susceptibilidad a la diabetes más temprano en el estado pre-diabético. Es importante destacar que los nuevos marcadores de riesgo como herramientas de detección para el riesgo futuro de diabetes son más importantes en sujetos con FBG normal, ya que los sujetos con glucosa en ayunas alterada comúnmente reciben atención médica para predecir la diabetes de todos modos, dado el bien conocido valor predictivo de diabetes de un FBG elevado. Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que la adición de P-copeptina a las herramientas de detección establecidas puede tener un valor clínico para la predicción de diabetes. Sin embargo, no tenemos datos sobre los subtipos de diabetes de nueva aparición, dada la edad media de 57 años en el segmento no diabético de nuestra población y la fuerte relación transversal entre la copeptina P y la resistencia a la insulina, suponemos que la elevación de la copeptina P indica riesgo de diabetes tipo 2 en lugar de diabetes tipo 1.

Además de tener implicaciones para la predicción de la diabetes, nuestros hallazgos sugieren un papel del sistema de AVP en la fisiopatología de la diabetes y potencialmente para el desarrollo de nuevos regímenes de tratamiento antidiabético. Los estudios en animales han demostrado que los ratones que carecen de V1aR (V1aR -/-) muestran niveles elevados de AVP, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, mientras que los ratones que carecen de V1bR (V1bR -/-) tienen el fenotipo opuesto de FBG más baja y mejor sensibilidad a la insulina. Sobre la base de estos datos en animales y nuestros propios hallazgos de que la P-copeptina elevada se asocia con FBG elevada, resistencia a la insulina y mayor riesgo de diabetes futura, se puede especular que la AVP elevada, como consecuencia de la resistencia a la AVP a nivel de VlaR o en otros lugares, contribuye a la resistencia a la insulina y a la diabetes a través de la estimulación del V1bR. De hecho, el bloqueo farmacológico del V2R, un potente estímulo del aumento de la secreción de AVP a través de retroalimentación negativa en el eje hipotalámico-neuropituitario, se asoció con un aumento de cinco veces en eventos hiperglucémicos durante 30 días de tratamiento con tolvaptano en pacientes con hiponatremia. Por lo tanto, la elevación de AVP, cualquiera que sea el mecanismo subyacente, puede contribuir a la homeostasis de glucosa alterada, posiblemente a través de la estimulación del V1bR. Estos hallazgos justifican estudios de manipulaciones farmacológicas del sistema de AVP en relación con el metabolismo de la glucosa en el hombre.

La cantidad de casos de diabetes de nueva aparición en el MDC-CC puede parecer menor de lo esperado. Hay tres razones importantes que son las más propensas a explicar esto. (1) La tasa de participación en el estudio de MDC fue solo del 40 % y, como consecuencia de eso, la población de MDC es más saludable e incluye desproporcionadamente a muchas mujeres en comparación con la población de fondo (Manjer 2001). Como resultado de esto, es probable que se subestime la relación entre la P-copeptina y la diabetes de nueva aparición que describimos. (2) La incidencia de diabetes que observamos en los tres registros se basa en el requisito previo de que las personas busquen activamente atención médica y no en la detección de los niveles de glucosa en la población, lo que lleva a una incidencia menor que la observada en los estudios de detección regular de diabetes mediante la medición de FBG. Además, en contraste con nuestra definición de diabetes de nueva aparición, la definición de diabetes en el examen inicial de MDC-CC incluyó la medición de FBG. De hecho, de los que se definió que tenían diabetes en el 71 % no informaron antecedentes de diabetes o tratamiento antidiabético, pero fueron diagnosticados únicamente con base en FBG. La exclusión de este gran número de pacientes con diabetes, que no sabían que tenían diabetes antes del examen inicial, disminuyó notablemente la incidencia de diabetes de nueva aparición durante el seguimiento. (3) A pesar de los aspectos analizados anteriormente, es probable que nuestro estudio haya omitido una serie de casos de nueva aparición que de hecho fueron diagnosticados con diabetes dentro del sistema de atención médica. El MHR registró todos los valores de HbAlc en la gran área de Malmo desde 1990 en adelante, sin embargo, pasamos por alto los casos diagnosticados con diabetes en la gran área de Malmo sin que se midiera la HbAlc o si la HbAlc solo se midió una vez o si solo fue marginalmente elevada en repetidas ocasiones. Los casos de diabetes de nueva aparición no detectados en el MHR como resultado de mudarse fuera de la gran área de Malmo después del examen inicial de MDC-CC tendrían una oportunidad razonable de ser detectados por el NDR nacional y/o el registro regional de Diabetes 2000, especialmente por el NDR ya que este registro se estimó que cubría el 50 % de todos los pacientes con diabetes en Suecia en 2007. Aún así, la cobertura de los registros de NDR y Diabetes 2000 es incompleta. Por estas razones, hemos clasificado un número desconocido de sujetos que desarrollaron diabetes durante el seguimiento como no diabéticos. Por otro lado, dados los estrictos criterios de HbAlc para la diabetes de nueva aparición en el MHR y la validez comprobada del registro NDR y Diabetes 2000, confiamos en la validez del criterio de valoración en los sujetos que clasificamos como casos de diabetes de nueva aparición. La validez del diagnóstico de diabetes de nueva aparición sobre la base de los registros se ve respaldada por el hecho de que la mayoría de los factores de riesgo

conocidos para la diabetes se elevaron notablemente al inicio de MDC-CC en estos sujetos en comparación con aquellos que no desarrollaron diabetes de acuerdo con los tres registros (tabla 3). Es importante destacar que estas diferencias fueron igualmente pronunciadas cuando la población del estudio se restringió a los sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio, lo que excluye la posibilidad de que nuestros hallazgos con respecto a los factores de riesgo de diabetes establecidos y la P-copeptina en relación con la diabetes de nueva aparición fueran conducidos únicamente en sujetos que tuvieron un valor de FBG casi diabético en el examen inicial de MDC-CC.

En conclusión, la P-copeptina predice la diabetes independientemente de una amplia gama de factores de riesgo de diabetes establecidos, incluidos los niveles de glucosa e insulina en ayunas. Nuestros hallazgos sugieren un papel del sistema de AVP en el desarrollo de la diabetes y pueden tener implicaciones para la evaluación del riesgo y la nueva farmacoterapia antidiabética.

Tabla 1. Características iniciales de los sujetos con y sin diabetes

	Sujetos no diabéticos (n = 4377)	Pacientes con diabetes (n = 365)	Valor de p
Edad (años)	57,4 ± 5,9	59,5 ± 5,5	< 0,001
FBG (mmol/l)	4,9 ± 0,45	8,1 ± 3,0	< 0,001
Triglicéridos (mmol/l)*	1,12 (0,85-1,53)	1,64 (1,13-2,33)	< 0,001
PA sistólica (mmHg)	140 ± 19	150 ± 20	< 0,001
PA diastólica (mmHg)	87 ± 9,4	90 ± 9,5	< 0,001
IMC (kg/m2)	25,5 ± 3,7	28,7 ± 4,5	< 0,001
Cintura (cm)	82,6 ± 12	94,4 ± 13	< 0,001
Proporción cintura-cadera	0,84 ± 0,09	0,91 ± 0,09	< 0,001
HDL (mmol/l)	1,40 ± 0,37	1,23 ± 0,35	< 0,001
LDL (mmol/l)	4,2 ± 0,98	4,2 ± 1,0	0,22
Cistatina C (mg/l)	0,773 ± 0,143	0,809 ± 0,193	0,001
Copeptina (pmol/l)*	5,04 (3,12-7,94)	6,90 (4,32-10,7)	< 0,001
Insulina (mU/L) *	6,0 (4,0-9,0)	12 (7,0-18)	< 0,001
CRP (mg/l)	1,3 (0,6-2,6)	2,3 (1,3-4,5)	< 0,001
Hombres (%)	39,2	56,2	< 0,001
AHT (%)	14,7	37,3	< 0,001
Fumador actual (%)	26,5	24,4	0,41
Herencia de diabetes (%)	3,0	3,0	0,87
ECV anterior (%)	2,0	3,8	0,02

Tabla 2: Diabetes prevalente y resistencia a la insulina en relación con los cuartiles de la P-copeptina inicial.

Variable dependiente		OR (IC del 95 %) Q2 copeptina vs Q1copeptina	OR (IC del 95 %) Q3 copeptina vs Q1 copeptina	OR (IC del 95 %) Q4 copeptina vs Q1 copeptina	P para lineal tendencia
Diabetes*	sin	1,44 (1,00-2,07)	1,92 (1,36-2,71)	2,83 (2,04-3,93)	< 0,001
	Ajustado	1,19 (0,81-1,75)	1,39 (0,96-2,01)	1,45 (1,00-2,11)	0,04
Hiperinsulinemia †	sin	1,30 (1,06-1,60)	1,53 (1,25-1,87)	2,34 (1,93-2,85)	< 0,001
	Ajustado	1,19 (0,94-1,51)2	1,26 (0,99-1,60)2	1,61 (1,26-2,06)2	< 0,001

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

Tabla 3. Características iniciales en los sujetos que se convirtieron y los que no se convirtieron en diabéticos durante e seguimiento. Sujetos sin diabetes al inicio (n = 4377)

	No convertidos (n = 4203)	Diabetes incidente (n = 174)	P
Edad (años)	57,3 ± 5,9	57,9 ± 5,7	0,26
Hombres (%)	38,9	45,4	0,09
Glucosa (mmol/l)	4,9 ± 0,44	5,4 ± 0,44	< 0,001
Triglicéridos (mmol/l)	1,11 (0,84-1,51)	1,46 (1,05-1,96)	< 0,001
PA sistólica (mmHg)	140 ± 19	146 ± 19	< 0,001
PA diastólica (mmHg)	86 ± 9,3	90 ± 10	< 0,001
AHT (%)	14,2	27,6	< 0,001
IMC (kg/m2)	25,4 ± 3,6	28,2 ± 4,7	< 0,001
Cintura (cm)	82,2 ± 12	91,5 ± 14	< 0,001
Proporción cintura-cadera	0,84 ± 0,09	0,89 ± 0,10	< 0,001
HDL (mmol/l)	1,41 ± 0,37	1,25 ± 0,33	< 0,001
LDL (mmol/l)	4,2 ± 0,98	4,3 ± 1,0	0,06
Cistatina C (mg/l)	0,77 ± 0,14	0,82 ± 0,21	< 0,001
Copeptina (pmol/l)	4,98 (3,09-7,84)	6,35 (4,05-9,88)	< 0,001
Insulina (mU/L)	6,0 (4,0-9,0)	9,0 (6,0-13)	< 0,001
CRP (mg/l)	1,2 (0,6-2,6)	2,1 (0,9-4,1)	< 0,001
Fumador actual (%)	26,4	29,5	0,37
Herencia de diabetes (%)	2,8	6,9	0,002
ECV anterior (%)	2,0	2,3	0,80
Sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio (n = 3702)			
	No convertidos (n = 3623)	Diabetes incidente (n = 79)	P
Edad (años)	57,2 ± 5,9	58,1 ± 5,4	0,20
Hombres (%)	36,5	38,0	0,79
Glucosa (mmol/l)	4,7 ± 0,34	5,0 ± 0,28	< 0,001
Triglicéridos (mmol/l)	1,34 (0,82-1,47)	1,34 (1,06-1,92)	< 0,001
PA sistólica (mmHg)	139 ± 19	146 ± 19	0,001
PA diastólica (mmHg)	86 ± 9,2	89 ± 9,5	0,004
AHT (%)	13,4	24,1	0,006
IMC (kg/m2)	25,2 ± 3,6	27,5 ± 4,9	< 0,001
Cintura (cm)	81,3 ± 12	88,7 ± 14	< 0,001
Proporción cintura-cadera	0,84 ± 0,09	0,87 ± 0,09	< 0,001
HDL (mmol/l)	1,43 ± 0,37	1,27 ± 0,32	< 0,001
LDL (mmol/l)	4,2 ± 0,98	4,1 ± 0,93	0,99
Cistatina C (mg/l)	0,77 ± 0,14	0,83 ± 0,27	< 0,001
Copeptina (pmol/l)	4,90 (3,03-7,65)	6,74 (4,44-10,9)	0,001
Insulina (mU/L)	6,0 (4,0-8,0)	8,0 (6,0-11)	< 0,001
CRP (mg/l)	1,2 (0,6-2,4)	2,4 (1,0-4,1)	< 0,001
Fumador actual (%)	25,4	30,4	0,31
Herencia de diabetes (%)	3,0	7,6	0,02
ECV anterior (%)	1,9	2,5	0,67

Las variables continuas se dan como medias ± DE a menos que se especifique lo contrario
*mediana (rango intercuartil)
AHT, tratamiento antihipertensivo; IMC, índice de masa corporal; FBG, glucosa en sangre en ayunas; ECV previa enfermedad cardiovascular presente antes del examen inicial.

Tabla 4: Diabetes de nueva aparición en relación con los cuartiles de la P-copeptina inicial.

Variable dependiente		OR (IC del 95 %) Q2 copeptina vs Q1 copeptina	OR (IC del 95 %) Q3 copeptina vs Q1 copeptina	OR (IC del 95 %) Q4 copeptina vs Q1 copeptina	P (prueba de tendencia lineal)
Incidente diabetes entre no DM*	sin procesar	1,28 (0,76-2,15)	1,94 (1,19-3,14)	2,64 (1,66-4,19)	< 0,001
	Ajustado‡	1,37 (0,78-2,39)	1,79 (1,06-3,05)	2,09 (1,23-3,56)	0,004
Incidente diabetes entre no IFG†	sin procesar	1,85 (0,81-4,20)	2,12 (0,95-4,73)	4,56 (2,18-9,52)	< 0,001
	Ajustado‡	1,80 (0,78-4,16)	1,92 (0,84-4,38)	3,48 (1,58-7,65)	0,001

* Sujetos que desarrollaron diabetes durante el seguimiento (n = 174) entre los sujetos sin diabetes al inicio del estudio (n = 4377)

† Sujetos que desarrollaron diabetes durante el seguimiento (n = 79) entre los sujetos sin alteración de la glucosa en ayunas al inicio del estudio (n = 3702)

‡ Ajustado según la edad, sexo, HDL, triglicéridos, presión arterial, tratamiento antihipertensivo, índice de masa corporal, cintura, relación cintura/cadera, cistatina C, CRP y enfermedad cardiovascular prevalente, tabaquismo, herencia de diabetes, LDL, FBG e insulina en ayunas.

Listado de secuencias

<110> B.R.A.H.M.S GmbH
<120> Prohormona arginina vasopresina como biomarcador predictivo para la diabetes
<130> FBP24605-A
<150> EP 09744978.9
<151> 2009-10-29
<160> 3
<170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Asp Ala Tyr
```

<210> 2
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

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

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

Pro Ala Gln Pro Asp Ala Tyr
        35
```

<210> 3
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr
145
```

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo para la determinación del nivel de copeptina en una muestra, en donde el ensayo tiene una imprecisión total del ensayo del 20 % del coeficiente de variación (CV) a una concentración inferior a 2,2 pmol/L de copeptina y un coeficiente de variación inferior al 20 % (CV) a concentraciones normales superiores a esa concentración, y/o 10 % del coeficiente de variación (CV) a una concentración inferior a 9 pmol/l de copeptina y un coeficiente de variación (CV) inferior al 10 % a concentraciones normales por encima de esa concentración, en donde el ensayo comprende dos anticuerpos anti-copeptina, en donde uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal, que se une a un epítopo comprendido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de pre-pro-vasopresina, y un anticuerpo anti-copeptina policlonal.

2. Un ensayo para la determinación del nivel de copeptina en una muestra, en donde el ensayo comprende dos anticuerpos anti-copeptina, en donde uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal, que se une a un epítopo comprendido en un péptido que representa las posiciones 132-147 de pre-pro-vasopresina y un anticuerpo policlonal anti-copeptina.

3. El uso de un ensayo de conformidad con las reivindicaciones 1 a 2 para predecir el riesgo de un sujeto de desarrollar diabetes mellitus.

Figura 1

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

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

Figura 2

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

```
1      ASDRSNATQL DGPAGALLLR LVQLAGAPEP FEPAQPDAY
```

Figura 3

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

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

Figura 4

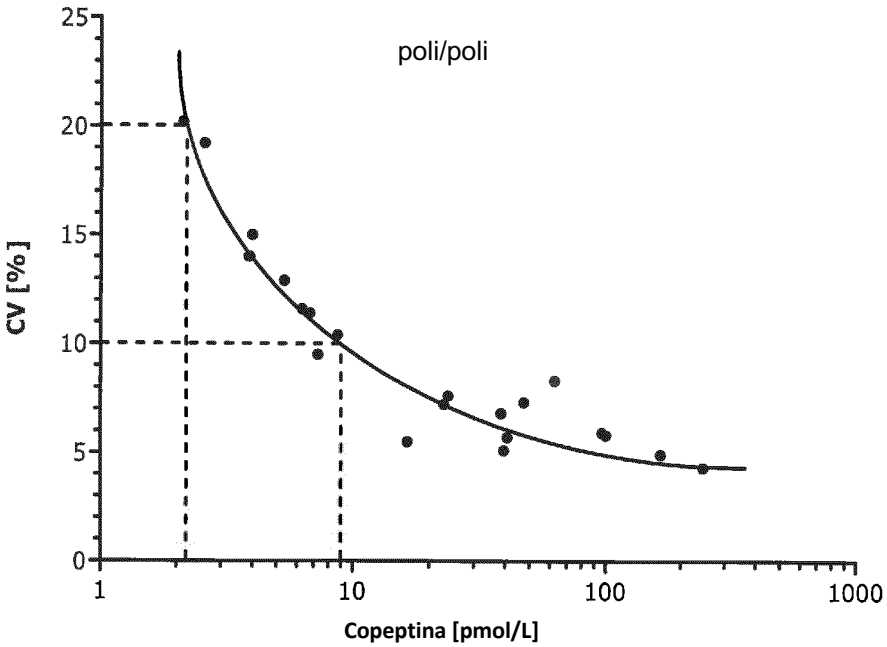


Figura 5

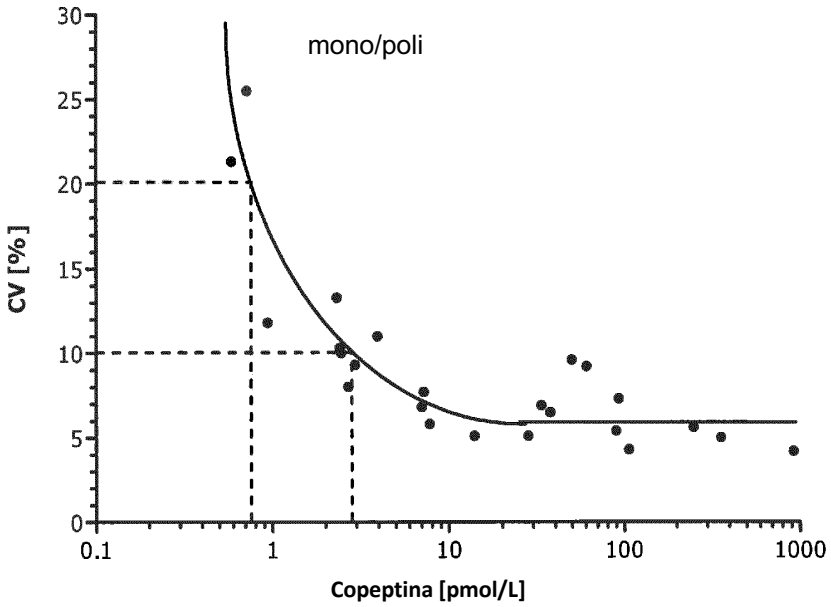


Figura 6

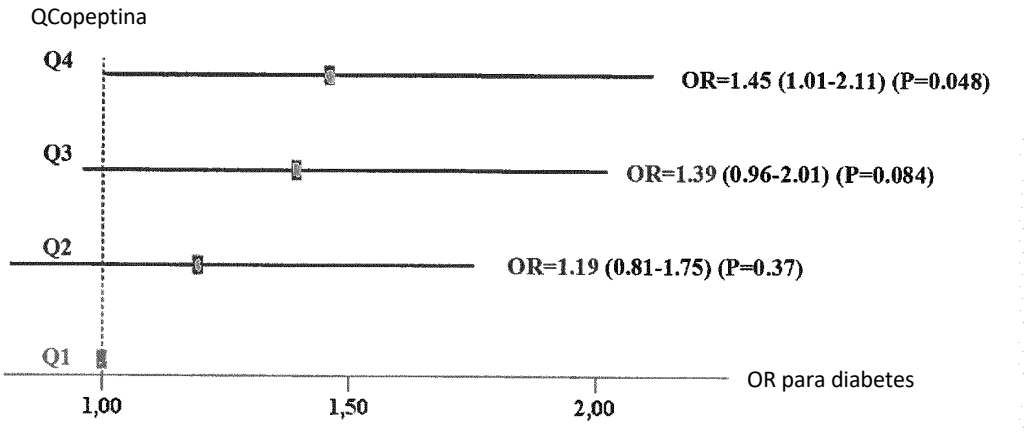

QCopeptina
Q4
OR=1.45 (1.01-2.11) (P=0.048)
Q3
OR=1.39 (0.96-2.01) (P=0.084)
Q2
OR=1.19 (0.81-1.75) (P=0.37)
Q1
OR para diabetes
1,00
1,50
2,00

Figura 7

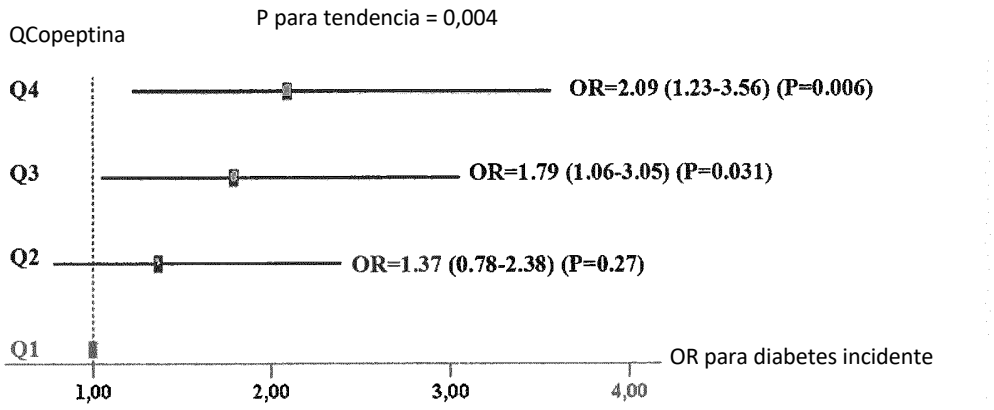

P para tendencia = 0,004
QCopeptina
Q4
OR=2.09 (1.23-3.56) (P=0.006)
Q3
OR=1.79 (1.06-3.05) (P=0.031)
Q2
OR=1.37 (0.78-2.38) (P=0.27)
Q1
OR para diabetes incidente
1,00
2,00
3,00
4,00

Figura 8

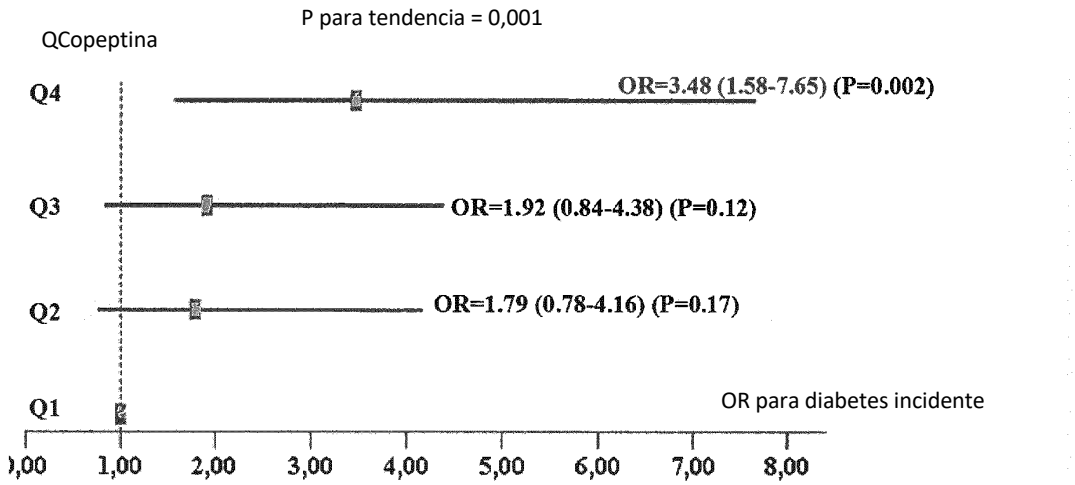

P para tendencia = 0,001
QCopeptina
Q4
OR=3.48 (1.58-7.65) (P=0.002)
Q3
OR=1.92 (0.84-4.38) (P=0.12)
Q2
OR=1.79 (0.78-4.16) (P=0.17)
Q1
OR para diabetes incidente
,00
1,00
2,00
3,00
4,00
5,00
6,00
7,00
8,00

Figura 9

Modelo personal: (edad, sexo, IMC y herencia de DM) ± P-copeptina

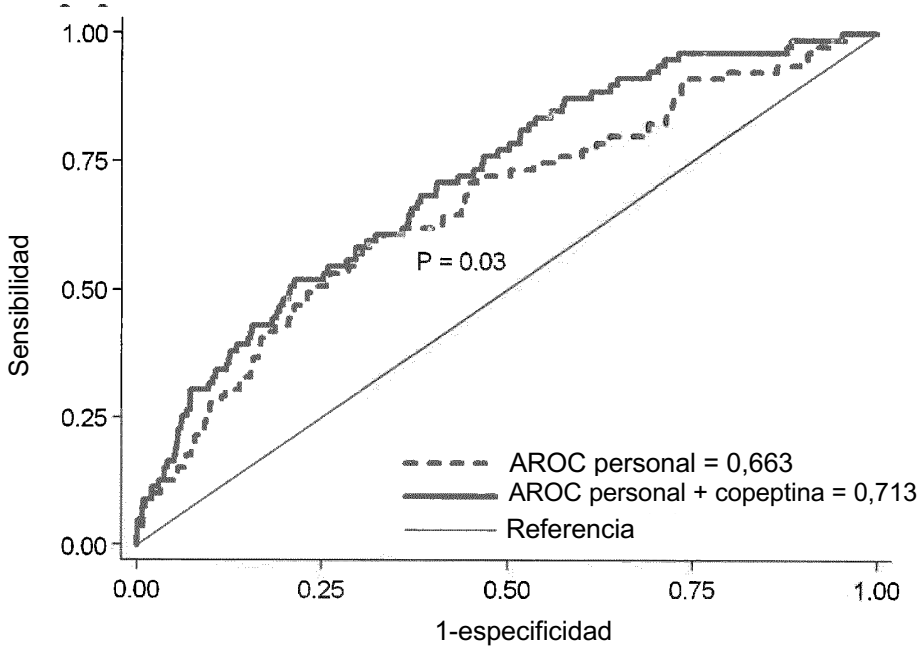


Figura 10

Modelo clínico: (edad, sexo, PAS, IMC, cintura, glucosa, TG, HDL y herencia de DM) ± P-copeptina

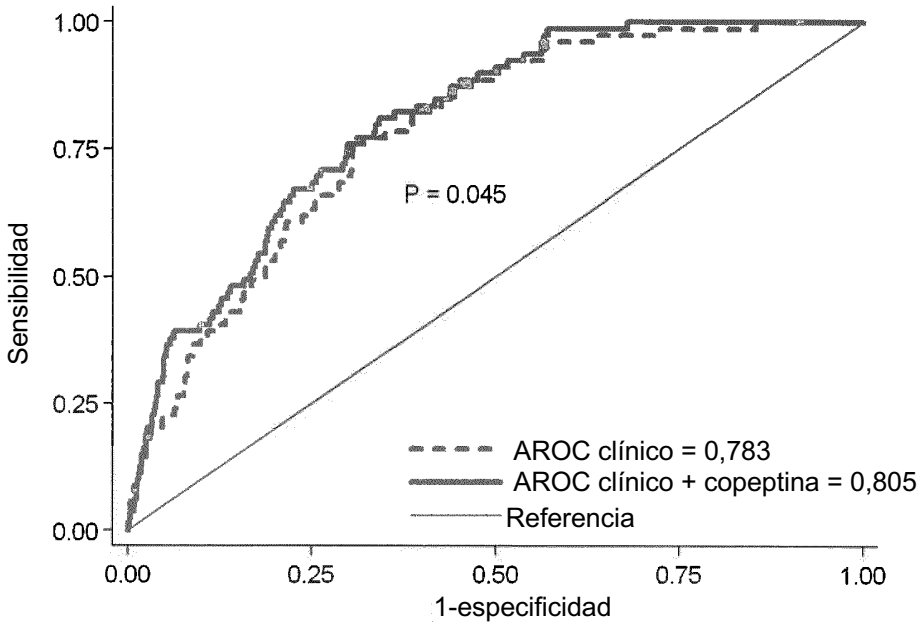


Figura 11

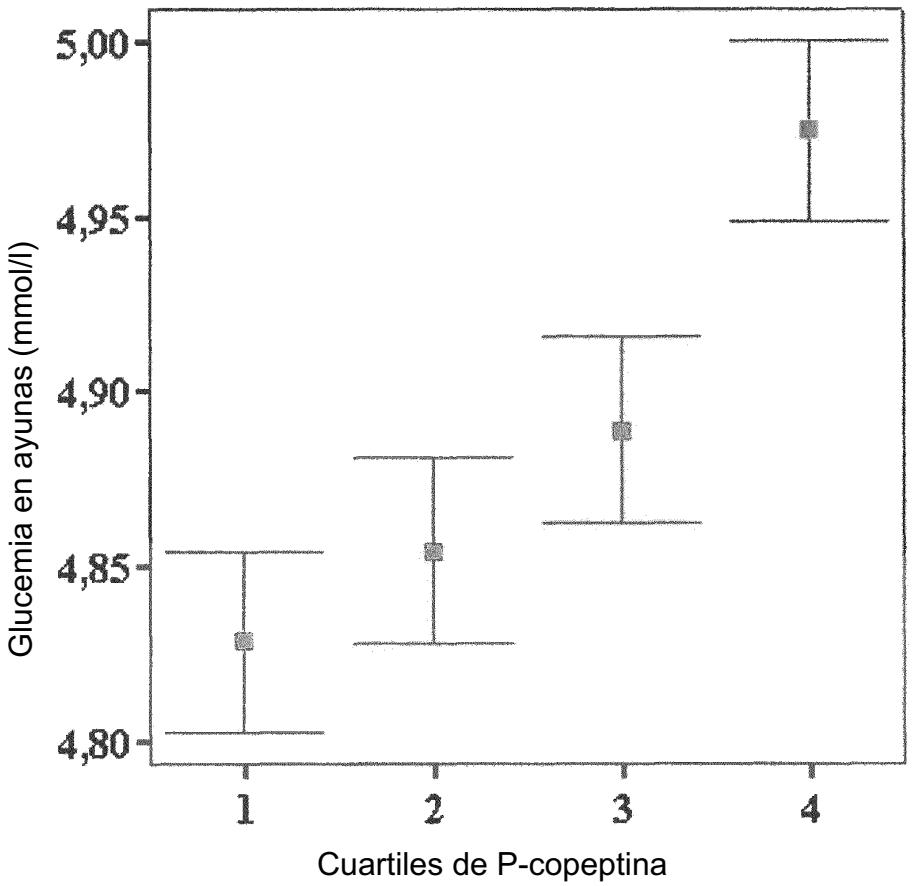
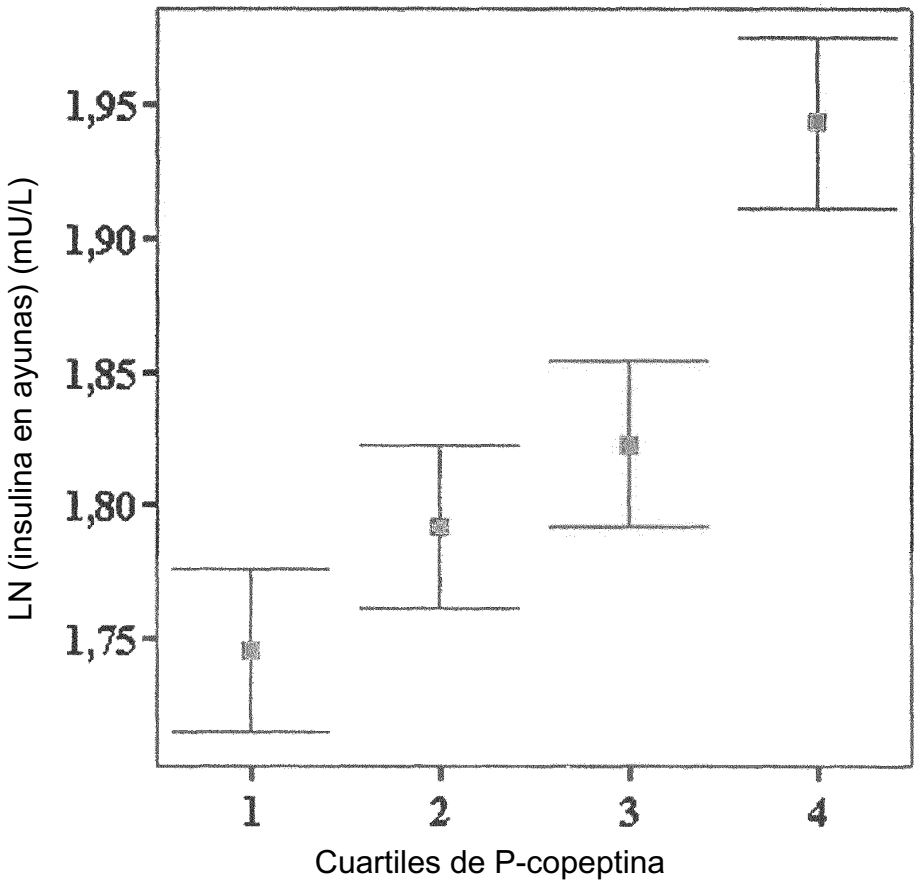

5,00
4,95
4,90
4,85
4,80
Glucemia en ayunas (mmol/l)
1
2
3
4
Cuartiles de P-copeptina

Figura 12


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