

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 084**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016 PCT/EP2016/054106**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16066862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016 E 16706635 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3262421**

54 Título: **Un método para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto**

30 Prioridad:

27.02.2015 EP 15156995
23.04.2015 EP 15164910

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS y
MELANDER, OLLE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 781 084 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

Un método para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto

La materia de la presente invención es un método para determinar la actividad de procesamiento de grasas y/o para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- 5 • determinar mediante un inmunoensayo el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto o
- determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y
- correlacionar dicho nivel de pro-neurotensina 1-117 con la actividad de procesamiento de grasas y/o el riesgo de incidencia de obesidad en dicho sujeto, en el que un nivel elevado es indicativo de una actividad de procesamiento de grasas incrementada y/o es predictivo de un riesgo incrementado de obesidad

y en el que el sujeto no es obeso en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto.

15 La neurotensina es un neuropéptido de 13 aminoácidos derivado del precursor prepro-neurotensina y se libera de manera estequiométrica junto con el péptido estable de 117 aminoácidos pro-neurotensina (P-NT), y la hormona madura se une a tres receptores diferentes, los receptores de neurotensina 1 y 2 (Ntsr1 y Ntsr2), que son receptores acoplados a proteína G, y el receptor de neurotensina 3 (Ntsr3), que no está acoplado a proteína G y también se conoce como Sortilina-1 (SORT1).

20 La neurotensina se libera de manera periférica en el intestino delgado, así como de manera central en el hipotálamo. La secreción periférica de neurotensina se estimula por la ingestión de alimentos, especialmente por la grasa, y se sabe que regula la motilidad gastrointestinal y pancreática y la secreción biliar. De manera interesante, la neurotensina está implicada en el control del apetito como hormona anorexígena, ya que reduce intensamente la ingestión de alimentos tras la inyección central (intracerebroventricular) y periférica (intraperitoneal) en ratas, un efecto que parece estar mediado principalmente a través del receptor de neurotensina 1 (Ntsr1). En los sujetos humanos obesos comparados con los de peso normal, la concentración plasmática de neurotensina postprandial se redujo tras una comida grasa líquida (Wisén *et al.* 1992, Reg Peptides 39(1): 43-54), y se han observado niveles inferiores de neurotensina en ayunas en sujetos humanos obesos en comparación con controles delgados (Weiss *et al.* 2001, Obes Surg 11: 735-739), lo que sugiere que la regulación de la secreción de neurotensina está alterada en la obesidad. Sin embargo, ningún gran estudio ha investigado si la neurotensina está relacionada con el riesgo de desarrollar obesidad, y de qué forma.

30 Un objetivo de la presente invención fue investigar la capacidad pronóstica de NT para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto no obeso. Para abordar esta cuestión, se midieron fragmentos estables de pro-neurotensina en plasma en ayunas en dicho estudio prospectivo de cohortes sueco (Estudio de Dieta y Cáncer de Malmö) y el nivel inicial relacionado de este biomarcador con la obesidad durante 15 años de seguimiento.

35 El riesgo de obesidad en un sujeto no obeso se puede correlacionar con la actividad de procesamiento de grasas de dicho sujeto. Por tanto, la determinación de los niveles de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal puede ser una determinación de la actividad de procesamiento de grasas.

La materia de la presente invención es un método para determinar la actividad de procesamiento de grasas y/o para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- 40 • determinar mediante un inmunoensayo el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto o
- determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y
- correlacionar dicho nivel de pro-neurotensina 1-117 con la actividad de procesamiento de grasas y/o el riesgo de incidencia de obesidad en dicho sujeto, en el que un nivel elevado es indicativo de una actividad de procesamiento de grasas incrementada y/o es predictivo de un riesgo incrementado de obesidad

45 y en el que el sujeto no es obeso en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto.

La actividad de procesamiento de grasas se define como la absorción, el metabolismo y/o el almacenamiento de grasas en el cuerpo humano. La actividad de procesamiento de grasas es sinónimo de la absorción de grasas en el cuerpo o la capacidad de almacenar las grasas que se absorben y se convierten. La mujer con una mayor actividad de procesamiento de grasas tiene un mayor riesgo de ser obesa.

50 La grasa alimentaria consiste en una diversidad de lípidos polares y apolares. El triacilglicerol (TAG) es la grasa predominante en la dieta, que contribuye en un 90-95% a la energía total derivada de la grasa alimentaria. Las grasas alimentarias también incluyen fosfolípidos, esteroides (p.ej., colesterol), y muchos otros lípidos (p.ej., vitaminas

liposolubles). La digestión de los lípidos comienza en la cavidad oral por medio de la exposición a las lipasas linguales, que se secretan en las glándulas en la lengua para comenzar el proceso de digestión de triglicéridos. La digestión continúa en el estómago por medio del efecto de las enzimas linguales y gástricas. El estómago también es el sitio principal para la emulsificación de las grasas alimentarias y las vitaminas liposolubles, y la peristalsis es un factor contribuyente importante. Las emulsiones brutas de lípidos entran en el duodeno en forma de gotículas lipídicas finas y después se mezclan con los jugos biliares y pancreáticos para experimentar cambios notables en la forma química y física. La emulsificación continúa en el duodeno junto con la hidrólisis y micelización como preparación para la absorción a través de la pared intestinal. Los jugos biliares y pancreáticos proporcionan la lipasa pancreática, sales biliares, y colipasa, que funcionan de manera cooperativa para asegurar la eficacia de la digestión y absorción de los lípidos. TAG se digiere principalmente mediante la lipasa pancreática en el segmento superior del yeyuno. Los ácidos grasos libres se absorben desde la luz intestinal hacia los enterocitos y se usan para la biosíntesis de grasas neutras. Una vez dentro del enterocito, los productos de la hidrólisis de TAG deben atravesar el citoplasma para alcanzar el retículo endoplásmico (RE), donde se usan para sintetizar lípidos complejos.

Las lipoproteínas principales secretadas por el intestino son las VLDL y los quilomicrones. De estos, los quilomicrones se sintetizan exclusivamente en el intestino para transportar la grasa alimentaria y las vitaminas liposolubles a la sangre. Los quilomicrones son principalmente partículas ricas en TAG muy grandes y esféricas que también contienen PLs, colesterol, vitamina E, vitamina A, y proteínas. El núcleo de la lipoproteína contiene TAG, ésteres de colesterol, y vitaminas liposolubles, mientras la superficie contiene una monocapa de fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina), colesterol libre, y proteínas.

A medida que circulan, los triacilglicerolos de los quilomicrones experimentan una hidrólisis mediante la lipoproteína lipasa, una enzima localizada en la superficie de las células endoteliales capilares de los tejidos musculares y adiposos. Los quilomicrones circulantes tienen una semivida de 5-10 minutos. La hidrólisis de los quilomicrones conduce a la liberación de ácidos grasos y glicerol del núcleo de los quilomicrones, así como de colesterol sin esterificar del revestimiento superficial de estas partículas. La deslipidación se da predominantemente en los tejidos adiposos, musculares y cardíacos, que captan y oxidan o almacenan los ácidos grasos liberados por la lipoproteína lipasa.

Los ácidos grasos, el colesterol y los ácidos biliares que escapan a la absorción intestinal se excretan en forma de ácidos grasos fecales, así como esteroides neutros y ácidos, respectivamente.

En los sujetos con una actividad de procesamiento de grasas eficaz, la proporción de grasa absorbida en el tracto gastrointestinal es menor, la cantidad de grasa absorbida se metaboliza casi completamente y se transporta y se almacena una cantidad pequeña o nula de grasa a los adipocitos de los sujetos. En contraste, en los sujetos con una actividad de procesamiento de grasas ineficaz, la proporción de absorción de grasas en el tracto GI es elevada, pero la grasa absorbida se metaboliza en un grado menor y se transporta y se almacena más grasa en los adipocitos del sujeto.

El término "sujeto", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un ser humano vivo o un organismo no humano. Preferiblemente, en la presente memoria el sujeto es un sujeto humano. En una realización específica de la invención, dicho sujeto es un sujeto no diabético. En otra realización específica de la invención, dicho sujeto es un sujeto sin GAA (no pre-diabético). En otra realización específica de la invención, el sujeto no padece síndrome metabólico. En otra realización específica de la invención, el sujeto no padece una enfermedad cardíaca. En otra realización específica de la invención, el sujeto no padece cáncer. En otra realización específica de la invención, el sujeto es un sujeto hembra.

La expresión "enfermedad cardíaca" incluye el infarto de miocardio, cardiopatía isquémica, ictus, insuficiencia cardíaca (insuficiencia cardíaca aguda o crónica), fibrilación auricular y aleteo auricular.

La expresión "riesgo de obesidad de nueva aparición" es un sinónimo de "riesgo de obesidad", en la que el sujeto no es obeso en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto.

En una realización de la descripción, el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal es el nivel en ayunas de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117. El nivel en ayunas significa la ausencia de ingestión de alimentos 10 horas o preferiblemente 12 horas antes de la toma de la muestra de sangre.

Debido a que el nivel en ayunas de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 no está desencadenado por la ingestión reciente de grasas, parece que, en una realización, el nivel en ayunas es una medida para cuantificar la actividad de procesamiento de grasas de dicho sujeto. Esto puede ser un eslabón perdido que explique por qué ciertos sujetos son susceptibles a ser obesos al procesar cantidades elevadas de grasas ingeridas, mientras otros individuos con niveles bajos de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 tienen un nivel bajo de actividad de procesamiento de grasas. Pero también la determinación de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en una muestra que no se ha tomado en ayunas puede ser un indicador de la actividad de procesamiento de grasas, ya

que ciertos sujetos pueden tener un aumento mayor de los niveles que otros desencadenados por la misma cantidad de ingestión de grasas. En este último ámbito, la pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se pueden medir inicialmente antes de la ingestión de grasas y después, mientras los sujetos con una actividad de procesamiento de grasas incrementada reaccionarán con cantidades liberadas mayores de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 tras la ingestión de grasas.

Por tanto, una realización de la descripción es un método para determinar la actividad de procesamiento de grasas y/o para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto que comprende las siguientes etapas:

- determinar mediante un inmunoensayo el nivel de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en una muestra sin ayuno o con ayuno de fluido corporal obtenido de dicho sujeto o
- determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos en una muestra sin ayuno o con ayuno de un fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y
- administrar grasa a dicho sujeto
- determinar mediante un inmunoensayo el nivel de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto después de la ingestión de grasas o
- determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto después de la ingestión de grasas; y
- calcular la diferencia entre dichos niveles después y antes de la ingestión de grasas y
- correlacionar dicha diferencia entre dichos niveles después y antes de la ingestión de grasas de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 con la actividad de procesamiento de grasas y/o el riesgo de incidencia de obesidad en dicho sujeto, en el que una diferencia mayor es indicativa de una actividad de procesamiento de grasas incrementada y/o predictiva de un riesgo incrementado de obesidad

y en el que el sujeto no es obeso en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto.

Esto significa que la diferencia entre el nivel de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 antes de la ingestión de grasas y dicho nivel después de la ingestión de grasas puede ser indicativa de la actividad de procesamiento de grasas. El estado de dicho sujeto antes de la ingestión de grasas puede ser de ayuno o sin ayuno. Se administra una cantidad normalizada de grasas a dichos sujetos (ensayo de tolerancia a grasa oral), p.ej. una cantidad específica de nata que contiene una cantidad específica de grasa. En el Ejemplo 4 se ha demostrado que ciertos individuos reaccionan de una manera más sensible a la ingestión de grasas que otros y, por tanto, tienen una actividad de procesamiento de grasas mayor.

El nivel de pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto que es predictivo del riesgo de desarrollar una obesidad de nueva aparición y que es indicativo de la actividad de procesamiento de grasas se libera en el intestino delgado. La liberación de neurotensina en el intestino delgado se estimula mediante la ingestión de alimentos, especialmente mediante las grasas (Go y Demol 1981. Peptides (Supl. 2): 267-269), y se sabe que regula la motilidad gastrointestinal y pancreática y la secreción biliar (Reinecke 1985. Prog Histochem Cytochem 16: 1-172). La pro-neurotensina 1-117 y los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se usan como marcadores sustitutos de la neurotensina liberada en forma de neurotensina, y la pro-neurotensina 1-117 y los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se liberan en cantidades equimolares de la pro-neurotensina.

Un hallazgo sorprendente de la presente invención es que la secreción periférica de neurotensina/pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 es indicativa de la susceptibilidad de un sujeto a desarrollar una obesidad de nueva aparición, y es una medida de la actividad de procesamiento de grasas. Por tanto, las medidas alimentarias, como la reducción de la ingestión de grasas, pueden reducir dicho riesgo en dicho sujeto.

La correlación entre el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o los péptidos que comprenden PNT 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto y el riesgo de desarrollar obesidad y también la actividad de procesamiento de grasas es continuo, es decir, cuanto mayor es el nivel mayor es el riesgo.

Por viabilidad, la persona experta en la técnica puede usar umbral(es).

La expresión "nivel elevado" significa un nivel por encima de un cierto nivel umbral.

Los niveles umbrales se pueden determinar midiendo muestras de sujetos que sí desarrollaron cierta afección (p.ej. obesidad) y muestras de sujetos que no desarrollaron la afección. Una posibilidad para determinar un umbral es el cálculo de curvas de características operativas del receptor (curvas ROC), que representan el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en la población "normal" (p.ej. los sujetos que no desarrollaron obesidad) y la población con "enfermedad" (p.ej. los sujetos que sí desarrollaron obesidad). Una distribución de los niveles de marcadores para los sujetos que desarrollan o que no desarrollan una cierta afección probablemente se solapará. En tales condiciones, un ensayo no distingue absolutamente lo "normal" de la "enfermedad" con un 100% de exactitud, y el área de solapamiento indica dónde el ensayo no puede distinguir lo normal de la "enfermedad". Se selecciona un umbral, por encima del cual (o por debajo del cual, dependiendo de cómo cambie un marcador con la "enfermedad") se considera que el ensayo es anormal y por debajo del cual se considera que el ensayo es normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medida percibida permita una identificación correcta de una afección. Las curvas ROC se pueden usar incluso cuando los resultados del ensayo no proporcionan necesariamente un número exacto. Mientras se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo en muestras de "enfermedad" se podrían clasificar según el grado (p.ej. 1=bajo, 2=normal, y 3=elevado). Esta clasificación se puede correlacionar con los resultados en la población "normal", y crear una curva ROC. Estos métodos son muy conocidos en la técnica (Hanley *et al.* 1982. Radiology 143: 29-36). Preferiblemente, se selecciona un umbral para proporcionar un área de la curva ROC mayor de alrededor de 0,5, más preferiblemente mayor de alrededor de 0,7, aún más preferiblemente mayor de alrededor de 0,8, incluso más preferiblemente mayor de alrededor de 0,85, y lo más preferiblemente mayor de alrededor de 0,9. La expresión "alrededor de", en este contexto, se refiere a +/-5% de una medida dada. El eje horizontal de la curva ROC representa (1-especificidad), que se incrementa con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que se incrementa con la tasa de verdaderos positivos. Por tanto, para un umbral 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 de marcador medido permita la identificación correcta de una enfermedad o afección. Por tanto, se puede usar el área bajo la curva ROC para determinar la eficacia del ensayo. La razón de probabilidades es una medida del tamaño del efecto, que describe la fuerza de la asociación o no independencia entre dos valores de datos binarios (p.ej., la razón de la probabilidad de que un evento que ocurre en el grupo negativo de ensayo respecto de que ocurra en el grupo positivo de ensayo).

Los niveles umbrales se pueden obtener, por ejemplo, a partir de un análisis de Kaplan-Meier, en el que la existencia de una enfermedad o la probabilidad de una afección grave y/o muerte se correlacionan, p.ej., con los cuartiles de los marcadores respectivos en la población. Según este análisis, los sujetos con niveles de marcadores por encima del 75º percentil tienen un riesgo significativamente incrementado de adquirir las enfermedades según la invención. Este resultado se apoya adicionalmente por el análisis de regresión de Cox con ajuste para los factores de riesgo clásicos. El cuartil más alto frente a todos los demás sujetos está asociado muy significativamente con el riesgo incrementado de adquirir una enfermedad o la probabilidad de una afección grave y/o muerte según la invención.

Otros valores umbrales preferidos son, por ejemplo, los 90º, 95º o 99º percentiles de una población de referencia. Mediante el uso de un percentil mayor que el 75º percentil, se reduce el número de sujetos falsos positivos identificados, pero se podrían pasar por alto sujetos que tengan un riesgo moderado, aunque todavía incrementado. Por tanto, se podría adaptar el valor umbral dependiendo de si se considera más adecuado identificar la mayoría de los sujetos de riesgo a costa de identificar también "falsos positivos", o si se considera más adecuado identificar principalmente a los sujetos de riesgo elevado a costa de pasar por alto varios sujetos de riesgo moderado.

Otras posibilidades matemáticas para calcular el riesgo de un individuo usando el valor del nivel de marcador del individuo y otros parámetros pronósticos de laboratorio y clínicos son, por ejemplo, el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrado). Los índices se pueden calcular según Pencina (Pencina MJ, *et al.*: 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).

Un fluido corporal se puede seleccionar del grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), y saliva. En una realización específica, un fluido corporal se puede seleccionar del grupo que comprende sangre, suero, plasma.

Los presentes datos sugieren una correlación intensa entre el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma, especialmente pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 con el desarrollo de obesidad de nueva aparición y con la actividad de procesamiento de grasas.

Los fragmentos de pro-neurotensina que se pueden determinar en un fluido corporal pueden ser, p.ej.

SEQ ID N°: 1 (Pro-neurotensina 1-147)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA

ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ

EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

SEQ ID Nº: 2 (Pro-neurotensina 1-125 (neuromedina N grande))

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

SEQ ID Nº: 3 (neuromedina N)

KIPYIL

5 SEQ ID Nº: 4 (neurotensina)

piroQLYENKPRRP YIL

SEQ ID Nº: 5 (pro-neurotensina 1-117)

SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVI

SEQ ID Nº: 6 (pro-neurotensina 1-132)

SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
10 EDILDTGNDK NGKEEVIKRRK IPYILKRQLY EN

SEQ ID Nº: 7 (Pro-Neurotensina 1-140 (neurotensina grande))

SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVIKRRK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL

SEQ ID Nº: 8 (pro-neurotensina 120-140)

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL

15 SEQ ID Nº: 9 (pro-neurotensina 120-147)

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

SEQ ID Nº: 10 (pro-neurotensina 128-147)

QLYENKPRRP YILKRDSYYY

20 En una realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de pro-neurotensina 1-117.

En una realización específica, el nivel de pro-neurotensina, especialmente pro-neurotensina 1-117 o los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117, se mide con un inmunoensayo. De manera más específica, se usa un inmunoensayo como se describe en Ernst *et al.* Peptides 27 (2006) 1787-1793. En una realización específica, se determina la reactividad inmunitaria de pro-neurotensina 1-117, en la que la reactividad inmunitaria significa lo siguiente:

25 Determinar el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma puede significar que se determina la inmunorreactividad hacia pro-neurotensina o los fragmentos de la misma, que incluyen neurotensina y neuromedina N. Una molécula de unión usada para la determinación de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma que incluyen neurotensina y neuromedina N dependiendo de la región de unión se puede unir a más de una de las moléculas mostradas anteriormente. Esto es evidente para una persona experta en la técnica.

30

5 Por tanto, según la presente descripción, el nivel de analito inmunorreactivo mediante el uso de al menos una molécula de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de cualquiera del péptido y fragmentos peptídicos anteriores, (es decir, pro-neurotensina (pro-NT) y los fragmentos según cualquiera de las secuencias 1 a 10), se determina en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y se correlaciona con las realizaciones específicas de importancia clínica.

En una realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de pro-NT 1-117 (SEQ ID N° 5: pro-neurotensina 1-117). En una realización más específica, se determina el nivel de analito inmunorreactivo mediante el uso de al menos una molécula de unión que se une a pro-NT 1-117 y se correlaciona con las realizaciones específicas de relevancia clínica según la invención.

10 En otra realización de la descripción, se determina la inmunorreactividad hacia pro-neurotensina o los fragmentos de la misma que no incluyen neurotensina y neuromedina N.

15 Un inmunoensayo que puede ser útil para determinar el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o un péptido que comprende pro-neurotensina 1-117 puede comprender las etapas resumidas en el Ejemplo 2. Un inmunoensayo que puede ser útil para determinar el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos o un péptido que comprende pro-neurotensina 1-117 puede comprender al menos un anticuerpo o al menos dos anticuerpos dirigidos hacia un epítipo en la pro-neurotensina 1-117. Al menos uno de estos anticuerpos puede estar marcado. Todos los umbrales y valores se deben considerar teniendo en cuenta el ensayo y la calibración usada según el Ejemplo 2. Una persona experta en la técnica puede saber que el valor absoluto de un umbral podría estar influenciado por la calibración usada. Esto significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria se deben entender en el contexto de la calibración usada en la presente memoria (Ejemplo 2). Hay disponible un calibrador de pro-NT humana de ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania. De manera alternativa, el ensayo se puede calibrar mediante pro-NT 1-117 sintética o recombinante o los fragmentos de la misma (véase también Ernst *et al.*, 2006).

25 En una realización de la presente descripción, puede ser un ensayo denominado POC (punto de atención), que es una tecnología de ensayo que permite llevar a cabo el ensayo en menos de 1 hora cerca del paciente sin necesidad de un sistema de ensayo completamente automatizado. Un ejemplo de esta tecnología es la tecnología de ensayo inmunocromatográfico.

30 En una realización, tal ensayo es un inmunoensayo de tipo sándwich mediante el uso de cualquier tipo de tecnología de detección que incluye, pero sin limitación, un marcador enzimático, marcador de quimioluminiscencia, marcador de electroquimioluminiscencia, preferiblemente un ensayo completamente automatizado. En una realización, tal ensayo es un ensayo de tipo sándwich marcado enzimáticamente. Los ejemplos de ensayos automatizados o completamente automatizados comprenden los ensayos que se pueden usar para uno de los siguientes sistemas: Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centauer®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas®, Alere Triage®.

35 Se conoce una diversidad de inmunoensayos y se pueden usar para los ensayos y métodos de la presente invención, y estos incluyen: radioinmunoensayos ("RIA"), inmunoensayos múltiples enzimáticos homogéneos ("EMIT"), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas ("ELISA"), inmunoensayo de reactivación de apoenzima ("ARIS"), inmunoensayos de tiras reactivas y ensayos de inmunocromatografía.

En una realización de la invención, al menos una de las dos moléculas de unión está marcada para ser detectada.

40 Los métodos de detección preferidos comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos mediante quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), matrices de microesferas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices proteicas, y formatos de ensayo rápidos tales como, por ejemplo, ensayos de tiras inmunocromatográficas.

En una realización preferida, dicho marcador se selecciona del grupo que comprende un marcador quimioluminiscente, marcador enzimático, marcador de fluorescencia, marcador de radioyodo.

45 Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos competitivos y no competitivos. En una realización, el ensayo está en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula a detectar y/o cuantificar se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede estar unido a una fase sólida, p.ej. una microesfera, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, p.ej. con un colorante, un radioisótopo, o un reactivo o resto catalíticamente activo. Después se mide la cantidad de anticuerpo marcado unido al analito mediante un método adecuado. La composición general y los procedimientos implicados con los "ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos, y la persona experta los conoce.

55 En otra realización, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferiblemente anticuerpos que están presentes en forma de dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en la que un primer componente de marcaje está unido a la primera molécula de captura, en la que dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en el apagamiento o la amplificación de fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje está unido a la segunda molécula de captura, de forma que tras la unión de

ambas moléculas de captura al analito se genera una señal medible que permite la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la disolución que comprende la muestra.

5 En otra realización, 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 de tipo cianina.

10 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden el uso de colorantes, que se pueden seleccionar, 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'-dimetoxifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-Tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-Carboxi-X-rodamina (ROX), 5-Carboxirodamina-6G (R6G5), 6-carboxirodamina-6G (RG6), Rodamina, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, Rodamina 110, colorantes BODIPY, tales como BODIPY TMR, Verde Oregón, Cumarinas tales como Umbeliferona, Benzimidaz, tales como Hoechst 33258; Fenantridinas, tales como Rojo Texas, Amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina, y similares.

15 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden el uso de colorantes, basados en los principios físicos descritos para los materiales quimioluminiscentes en (24). Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son ésteres de acridinio.

20 Como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Tal ensayo se puede basar en la unión de un analito a detectar a una o más sondas de captura con cierta afinidad. Con respecto a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas objetivo o las moléculas de interés, la constante de afinidad es preferiblemente mayor de 10^8 M^{-1} .

25 En el contexto de la presente invención, las "moléculas de unión" son moléculas que se pueden usar para unirse a las moléculas objetivo o moléculas de interés, es decir, los analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, pro-Neurotensina y los fragmentos de la misma), de una muestra. Las moléculas de unión, por tanto, deben tener una forma adecuada, tanto espacialmente como desde el punto de vista de las características superficiales, tales como la carga superficial, hidrofobia, hidrofilia, presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unirse de manera específica a las moléculas objetivo o moléculas de interés. En la presente memoria, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de Van der Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobas o por enlaces de hidrógeno, o una combinación de dos o más de las interacciones anteriormente mencionadas, entre las moléculas de captura y las moléculas objetivo o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de unión se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de APN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferiblemente, las moléculas de unión son anticuerpos, lo que incluye los fragmentos de los mismos con una afinidad suficiente hacia una molécula objetivo o molécula de interés, e incluyen los anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos recombinantes, así como los derivados modificados químicamente y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o los fragmentos de los mismos derivados de la cadena variable con una longitud de al menos 12 aminoácidos.

35 El marcador quimioluminiscente puede ser un marcador de éster de acridinio, marcadores de esteroides que implican marcadores de isoluminol, y similares.

40 Los marcadores enzimáticos pueden ser de lactato deshidrogenasa (LDH), creatina quinasa (CPK), fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa ácida, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, etc.

En una realización de la invención, al menos una de las dos moléculas de unión está unida a una fase sólida, como partículas magnéticas y superficies de poliestireno.

45 El umbral para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar obesidad de nueva aparición es por encima de 60 pmol/L de pro-NT, preferiblemente por encima de 90 pmol/L, más preferiblemente por encima de 123 pmol/L. En una realización específica, dicho umbral es por encima de 180 pmol/L o por encima de 190 pmol/L. Estos umbrales están relacionados con el método de calibración mencionado anteriormente. Un valor de pro-NT por encima de dicho umbral significa que el sujeto tiene un riesgo incrementado de desarrollar obesidad de nueva aparición.

50 La obesidad se define como un índice de masa corporal $\geq 30 \text{ kg/m}^2$.

Un sujeto no obeso se define con un índice de masa corporal $< 30 \text{ kg/m}^2$.

La obesidad de nueva aparición se define como el desarrollo de obesidad de sujetos no obesos después de un cierto tiempo de seguimiento.

55 El índice de masa corporal (IMC) se definió como el peso corporal en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros.

El tiempo de seguimiento es de hasta 1 año, preferiblemente hasta 2 años, más preferiblemente hasta 5 años, incluso más preferiblemente más de 10 años, incluso más preferiblemente hasta 15 años, incluso más preferiblemente hasta 16,5 años, lo más preferiblemente hasta 18 años.

5 La definición de la diabetes es la siguiente: antecedentes de diagnóstico médico o estar con medicación anti-diabética o tener una glucemia en ayunas $\geq 6,1$ mmol/l (que corresponde a $\geq 7,0$ mmol/l en plasma) en el examen inicial.

La pre-diabetes o glucosa alterada en ayunas (GAA) se define como una glucemia plasmática en ayunas entre $\geq 5,4$ y $< 6,1$ mmol/l (que corresponde a 6,1 - 6,9 mmol/l en plasma).

10 En una realización específica del método según la invención, dicho sujeto es un sujeto no diabético con una glucemia en ayunas menor de 5,4 mmol/l (que corresponde a $< 6,1$ mmol/l en plasma). El síndrome metabólico se definió mediante los criterios de la Organización Mundial de la Salud (Alberti y Zimmet. 1998. *Diabet Med.* 15:539-553; Organización Mundial de la Salud. 1999. Definición, diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus y sus complicaciones: informe de una consulta de la OMS. Parte 1: diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. Ginebra, Suiza: Organización de Mundial de la Salud) que requieren la presencia de resistencia a insulina identificada mediante uno de lo siguiente: (1) diabetes tipo II; (2) glucosa alterada en ayunas; (3) tolerancia alterada a la glucosa o (4) para aquellos con niveles normales de glucosa en ayunas (< 110 mg/dL), absorción de glucosa por debajo del cuartil inferior para la población de referencia en investigación en condiciones hiperinsulinémicas, euglucémicas, y dos de lo siguiente: (1) tensión arterial: $\geq 140/90$ mmHg; (2) dislipidemia: triglicéridos (TG): $\geq 1,695$ mmol/L y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) $\leq 0,9$ mmol/L (hombres), $\leq 1,0$ mmol/L (mujeres); (3) obesidad central: proporción cintura:cadera $> 0,90$ (hombres); $> 0,85$ (mujeres), o índice de masa corporal > 30 kg/m²; (4) microalbuminuria: tasa de excreción urinaria de albúmina ≥ 20 µg/min o proporción albúmina:creatinina ≥ 30 mg/g.

20 El sujeto puede tener una tensión arterial normal (TA tensión arterial (TA) normal). Dicho sujeto puede ser normotenso/tensión arterial alta.

La definición de normotenso/tensión arterial alta (TAA) es como sigue:

25 TAA: TA sistólica ≥ 140 mmHg o TA diastólica ≥ 90 mmHg, o tener medicaciones antihipertensivas. Los sujetos que tienen una tensión arterial normal (TA) son todos los demás sujetos, es decir, los sujetos con TA sistólica < 140 mmHg o TA diastólica < 90 mmHg o que no tienen medicaciones antihipertensivas.

30 En una realización específica del método según la invención, la predicción del riesgo del sujeto de desarrollar obesidad de nueva aparición se mejora adicionalmente determinando y usando el nivel de al menos un parámetro de laboratorio o marcador adicional seleccionado del grupo que comprende la glucemia en sangre o en plasma en ayunas, triglicéridos, colesterol de HDL o las subfracciones del mismo, colesterol de LDL o las subfracciones del mismo, cistatina C, insulina, CRP, tasa de filtración glomerular estimada (TFGe).

35 En una realización específica del método según la invención, se determina adicionalmente al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende la edad, el sexo, la tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, tratamiento antihipertensivo (TAH), circunferencia de la cintura, proporción cintura-cadera, fumador actual, herencia de diabetes, herencia de cáncer y enfermedad cardiovascular (ECV) previa.

40 Una realización adicional de la descripción es un método para determinar la actividad de procesamiento de grasas y/o predecir el riesgo de obesidad de nueva aparición, en el que se usa el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma solo o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles como pronóstico para la determinación de la actividad de procesamiento de grasas y/o la predicción del riesgo de obesidad de nueva aparición en un sujeto mediante un método que se puede seleccionar de las siguientes alternativas:

- la comparación con la mediana del nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos,
- 45 - la comparación con un cuantil del nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos,
- el cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o usando cálculos de índice de riesgo tales como el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrado).

50 En una realización 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 anteriormente mencionadas. En una realización específica del método según la invención, se determina el nivel de pro-neurotensina o los fragmentos de la misma o un péptido que comprende pro-neurotensina 1-117 que tiene al menos una longitud de 5 aminoácidos mediante un ensayo de diagnóstico, preferiblemente mediante un inmunoensayo.

En una realización específica del método según la invención, el método se lleva a cabo más de una vez para monitorizar el riesgo de adquirir obesidad de nueva aparición o para monitorizar el desarrollo del tratamiento de dicho sujeto para reducir el riesgo de adquirir obesidad de nueva aparición en un sujeto, en el que dicho sujeto no es obeso.

5 En una realización específica del método según la invención, dicha monitorización se lleva a cabo para determinar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.

En una realización específica del método según la invención, el método se usa para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

También se describe un dispositivo de punto de asistencia para llevar a cabo un método según la invención.

También se describe en la presente memoria un ensayo y/o kit para llevar a cabo un método según la invención.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo de Anticuerpos

Péptidos/conjugados para la Inmunización:

15 Se sintetizaron péptidos para la inmunización (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional para la conjugación de los péptidos a albúmina de suero bovino (BSA). Los péptidos se unieron de manera covalente a BSA mediante el uso de Sulfo-SMCC (Perbio-Science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el manual de Perbio.

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

H-CSDSEEEKKALEADFLTNMH-NH₂

20 péptido (P-NT 44-62) del anticuerpo de fase sólida (AFS):

H-CNLNSPAEETGEVHEEELVA-NH₂

Los anticuerpos se generaron según el siguiente método:

25 Se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado péptido-BSA en el día 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg en el día 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de llevar a cabo el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, proporcionado en forma de una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

30 Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37 °C. Después de lavar, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron los clones híbridos cultivando en medio HAT (medio de cultivo RPMI 1640 complementado con un 20% de suero de ternero fetal y complemento HAT). Después de dos semanas se sustituye el medio HAT con medio HT durante tres pases, seguido de vuelta al medio de cultivo celular normal.

35 Los sobrenadantes de cultivo celular se cribaron de manera primaria en busca de anticuerpos IgG específicos del antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos que dieron positivo se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Después de reensayar, los cultivos seleccionados se clonaron y se reclonaron mediante el uso de la misma técnica de dilución limitante, y se determinaron los isotipos. (Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. *et al.* "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996)).

40 Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos se produjeron por medio de métodos habituales de producción de anticuerpos (Marx *et al.*, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997), y se purificaron por medio de cromatografía de Proteína A. Las purezas de los anticuerpos fueron > 95% basadas en el análisis mediante electroforesis en gel de SDS.

Ejemplo 2

45 Inmunoensayo para la cuantificación de pro-neurotensina humana

La tecnología usada fue un inmunoensayo con luminiscencia en un tubo con revestimiento de tipo sándwich, basado en un marcaje con éster de acridinio.

Compuesto marcado (indicador): 100 µg (100 µl) de AM (1 mg/ml en PBS, pH 7,4, se mezcló con 10 µl de éster de NHS y acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (documento EP 0353971) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. El AM marcado se purificó mediante HPLC de filtración en gel con Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). El AM purificado se diluyó en (300 mmol/l de fosfato potásico, 100 mmol/l de NaCl, 10 mmol/l de Na-EDTA, 5 g/l de albúmina de suero bovino, pH 7,0). La concentración final fue de aprox. 800.000 unidades relativas de luz (URL) del compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por 200 µl. La quimioluminiscencia del éster de acridinio se midió usando un aparato AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

Fase sólida: Se revistieron (18 h a temperatura ambiente) tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) con AFS (1,5 µg de AFS/0,3 ml de 100 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de TRIS/HCl, pH 7,8). Después de bloquearlos con un 5% de albumina de suero bovino, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4 y se secaron a vacío.

Calibración:

El ensayo se calibró mediante el uso de diluciones de suero humano que contenían pro-NT. Se diluyó una mezcla de sueros humanos con una inmunorreactividad elevada de pro-NT (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Alemania) con suero de caballo (Biochrom AG, Alemania) (patrones de ensayo).

Los patrones se calibraron mediante el uso del calibrador humano de pro-NT (ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania). De manera alternativa, el ensayo se puede calibrar mediante pro-NT 1-117 sintética o recombinante o los fragmentos de la misma (véase también Ernst *et al.*, 2006).

Inmunoensayo de pro-NT:

Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos revestidos de AFS, y, después de añadir AM marcado (200 µl), los tubos se incubaron durante 16-22 h a 18-25 °C. El indicador sin unir se eliminó lavando 5 veces (1 ml cada una) con una disolución de lavado (PBS 20 mM, pH 7,4, 0,1 % de Triton X-100).

El AM unido al tubo se midió usando el aparato AutoLumat LB 953.

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

Ejemplo 3

Estudio poblacional

El estudio de Dieta y Cáncer de Malmö (MDC) es una cohorte epidemiológica prospectiva basada en una población de 28.449 hombres (nacidos en 1923-1945) y mujeres (nacidas en 1923-1950) de la ciudad de Malmö en el sur de Suecia que se sometieron a exámenes iniciales entre 1991 y 1996 (Minisimposio: The Malmo Diet and Cancer Study. Design, biological bank and biomarker programme. J Intern Med 233, 39-79 (1993)). A partir de esta cohorte, se seleccionaron aleatoriamente 6.103 personas para participar en la Cohorte Cardiovascular de MDC (MDC-CC), que se diseñó para investigar la epidemiología de la arteriopatía carotídea, entre 1991 y 1994 (Persson *et al.* 2008. Atherosclerosis 200: 191-198). Las muestras de plasma en ayunas en el examen inicial estuvieron disponibles para el análisis de pro-neurotensina (pro-NT), y se midió con éxito en un total de 4.632 participantes en la MDC-CC. De estos, estuvieron disponibles los datos completos para el IMC en 4.626, para la circunferencia de la cintura en 4.625 y para el grado estimado de resistencia a la insulina mediante el uso de la determinación del modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (concentración de glucosa en sangre en ayunas x concentración de insulina en plasma en ayunas / 22,5) (Matthews *et al.* 1985. Diabetologia 28: 412-419) en 4.468 participantes. El IMC se definió como el peso corporal en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros, y la obesidad como un IMC ≥ 30 kg/m². La obesidad abdominal se definió como una circunferencia de la cintura de ≥ 94 cm en hombres y ≥ 80 cm en mujeres, según la definición de la Federación Internacional de Diabetes (Alberti *et al.* 2006. Diabet Med 23: 469-489). La resistencia a la insulina se consideró presente en los sujetos que pertenecen al 25% superior de los valores de HOMA-IR en la MDC-CC. La "obesidad de nuevo inicio" se define como el desarrollo de obesidad en los participantes en MDC-CC no obesos que se reexaminaron y a los que se diagnosticó la obesidad después de un tiempo de seguimiento medio de $16,5 \pm 1,5$ años.

Se midió la pro-NT en las muestras plasmáticas en ayunas almacenadas que se congelaron a -80 °C inmediatamente en el examen inicial de la MDC-CC mediante el uso de un inmunoensayo de tipo sándwich quimioluminométrico reciente para detectar un fragmento precursor de pro-NT (pro-NT 1-117) como se describió previamente (Ernst *et al.* 2006. Peptides 27: 1787-1793). Los análisis de la glucosa en sangre y la insulina en plasma se llevaron a cabo en el momento del examen inicial en el Departamento de Química Clínica, Hospital Universitario de Malmö, que está asociado a un sistema nacional de normalización y control de calidad (Enhorning *et al.* 2010. Circulation 121: 2102-2108). De los 4.626 sujetos con datos iniciales de IMC y pro-NT, se reexaminaron 2.900 sujetos con una medida nueva del IMC después de un seguimiento medio de $16,5 \pm 1,5$ años. En los análisis de obesidad nueva, se excluyeron los sujetos que fueron obesos ya en el examen inicial, lo que dejó un total de 2.606 sujetos no obesos para el análisis de pro-NT con respecto a la obesidad nueva. Todos los participantes proporcionaron un consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Lund, Suecia.

Análisis estadísticos

5 Todos los sujetos en el examen inicial de MDC-CC se dividieron en cuartiles ascendientes según su valor de pro-NT en ayunas. En los análisis transversales, se relacionó el cuartil inicial de pro-NT con el resultado dicotómico de obesidad, obesidad abdominal y resistencia a la insulina mediante el uso de modelos de regresión logística ajustados por edad y sexo. En los análisis de obesidad nueva, se relacionó el cuartil inicial de pro-NT con el resultado dicotómico de obesidad nueva mediante el uso de la regresión logística ajustada con respecto a la edad inicial, sexo e IMC. Los datos se presentan como las razones de probabilidad (intervalos de confianza del 95%), y los sujetos que pertenecen al cuartil más bajo de pro-NT se definieron como el grupo de referencia (razón de probabilidades =1). "P para la tendencia" indica el valor de P para la tendencia lineal en los cuartiles 1-4.

10 Resultados del estudio

15 Se midieron los niveles de pro-NT en plasma en ayunas de 4.632 sujetos de mediana edad de la Cohorte Cardiovascular del Estudio de Dieta y Cáncer de Malmö poblacional (Tabla 1). La probabilidad ajustada por edad y sexo de tener obesidad, obesidad abdominal y resistencia a la insulina se incrementó significativamente a lo largo de los cuartiles de pro-NT (Tabla 2). Entre los sujetos no obesos, el riesgo de desarrollar obesidad durante un tiempo de seguimiento medio de $16,5 \pm 1,5$ años se incrementó gradualmente con los cuartiles de pro-NT, independientemente del índice de masa corporal inicial, la edad y el sexo. Las concentraciones medianas de pro-NT fueron de 60,1 pmol/L (intervalo 3,3-75,9 pmol/L) en el cuartil 1, 89,3 pmol/L (intervalo 75,9-105 pmol/L) en el cuartil 2, 123 pmol/L (intervalo 105-149 pmol/L) en el cuartil 3 y 190 pmol/L (intervalo 149-1155 pmol/L) en el cuartil 4. Los sujetos no obesos en el cuartil superior de los niveles iniciales de pro-NT tuvieron más del doble (R.P. 2,06) (intervalo de confianza del 95% de 1,38 - 3,06) de riesgo de desarrollar obesidad en comparación con los sujetos en el cuartil más bajo (Tabla 2).

20 Mediante el uso de las mismas variables en la ecuación, se investigaron subgrupos diferentes para la predicción de la obesidad de nueva aparición (Tabla 3), y se excluyeron los sujetos que tuvieron en el examen inicial diabetes mellitus (DM) y glucosa alterada en ayunas (GAA), tensión arterial elevada / terapia antihipertensiva (TAH), síndrome metabólico (SiMe), TFGe < 60 (ml/min/1,73 m²), herencia de cáncer, cáncer prevalente, fumadores, respectivamente. Los sujetos no obesos en el cuartil más alto de nivel de pro-NT sin ninguna de las afecciones mencionadas anteriormente mostraron de nuevo más del doble de riesgo de desarrollar obesidad en comparación con los sujetos del cuartil más bajo de pro-NT (Tabla 3). Los sujetos no obesos sin ninguna de estas afecciones (sujetos super-sanos) en el cuartil más alto del nivel de pro-NT incluso mostraron un riesgo tres veces incrementado de desarrollar obesidad en comparación con los sujetos en el cuartil más bajo de pro-NT.

30 Ejemplo 4

Concentraciones de PNT antes y después de un ensayo de ingestión de grasa oral ("ensayo de nata")

35 Se seleccionó un total de 54 pacientes, 19 sujetos de control sanos y 35 pacientes con un diagnóstico de insuficiencia cardíaca. Los sujetos ayunaron durante al menos 10 horas e ingirieron una disolución bebible enriquecida en grasa normalizada (nata que contenía un 30% de grasa). Se tomaron muestras de sangre al inicio y 1, 2 y 3 horas tras la ingestión de nata. La pro-Neurotensina se midió con el inmunoensayo descrito anteriormente. La pro-NT inicial se definió como el 100%, y los niveles en los tres puntos temporales diferentes se relacionaron con ella. La pro-NT se incrementó significativamente 1 hora tras la ingestión de nata en los controles sanos y los pacientes con IC, y disminuyó tras 2 y 3 horas, pero sin alcanzar el nivel inicial (Fig. 2). Además, la concentración relativa de pro-NT fue significativamente diferente entre los controles sanos y los pacientes con IC en los tres puntos temporales ($p < 0,05$).

40 Tabla 1

Características clínicas de la Cohorte Cardiovascular de Dieta y Cáncer de Malmö (MDC-CC)

Característica	Valor	N
Edad (años)	$57,7 \pm 6,0$	4.626
Sexo femenino, n (%)	2661 (57,5)	4.626
Índice de Masa Corporal (kg/m ²)	$25,8 \pm 3,9$	4.626
Circunferencia de la cintura (cm)	$84,0 \pm 12,9$	4.625
Glucemia en ayunas (mM)	$5,2 \pm 1,4$	4.468
Concentración de insulina en ayunas (mU/L)	7,0 (4,0-9,0)	4.468
HOMA-IR	1,5 (0,9-2,2)	4.468

Los datos se proporcionan como la media \pm desviación estándar para las variables distribuidas normalmente, y como la mediana y el intervalo intercuartil para la concentración de insulina en ayunas. Los datos categóricos se presentan como números (porcentajes). "N" indica el número con datos completos; por tanto, incluidos en los análisis. "HOMA-IR" representa la evaluación del modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina (concentración de insulina en plasma en ayunas x concentración de glucosa en sangre en ayunas / 22,5)

5

Tabla 2

Concentración en plasma en ayunas de pro-neurotensina (pro-NT) con respecto a la prevalencia de la obesidad y la resistencia a la insulina y con respecto a la incidencia de obesidad de nueva aparición durante el seguimiento a largo plazo en la Cohorte Cardiovascular de Dieta y Cáncer de Malmö

	N / N casos	Razón de probabilidades (intervalo de confianza del 95%)				P para la tendencia
		Cuartil 1 de pro-NT	Cuartil 2 de pro-NT	Cuartil 3 de pro-NT	Cuartil 4 de pro-NT	
Obesidad prevalente	4626 / 604	1,0 (ref)	1,00 (0,78-1,29)	1,13 (0,88-1,45)	1,34 (1,05-1,70)	0,01
Obesidad abdominal prevalente	4625 / 1769	1,0 (ref)	1,07 (0,90-1,27)	1,23 (1,04-1,46)	1,30 (1,09-1,54)	0,001
Resistencia a la insulina prevalente	4468 / 1140	1,0 (ref)	1,30 (1,06-1,59)	1,43 (1,17-1,74)	1,70 (1,39-2,06)	<0,0001
Obesidad de nueva aparición	2606 / 335	1,0 (ref)	1,44 (0,95-2,10)	1,83 (1,21-2,65)	2,06 (1,38-3,06)	<0,01

10 "N / N casos" indica el "número total de sujetos en el análisis / número de casos con la enfermedad en cuestión". "Pro-NT" indica la concentración en plasma en ayunas de pro-neurotensina en el examen inicial de MDC-CC. "Cuartiles 1-4 de pro-NT" define los cuartiles de la población de MDC-CC (más bajo a más alto) de pro-NT. Los datos se presentan como las razones de probabilidad (intervalos de confianza del 95%), y los sujetos que pertenecen al cuartil más bajo de pro-NT se definieron como el grupo de referencia (razón de probabilidades =1). "P para la tendencia" indica el valor de P para la tendencia lineal en los cuartiles 1-4. Prevalente significa que los sujetos ya tenían la "enfermedad en cuestión" inicialmente, mientras los sujetos con obesidad prevalente se excluyeron del análisis de predicción de riesgo de obesidad de nueva aparición.

15

Tabla 3

20 Concentración en plasma en ayunas de pro-neurotensina (pro-NT) con respecto a la incidencia de la obesidad de nueva aparición en los diferentes subgrupos de pacientes durante el seguimiento a largo plazo en la Cohorte Cardiovascular de Dieta y Cáncer de Malmö

	N/N casos	Razón de probabilidades (intervalo de confianza del 95%)				P para la tendencia
		Cuartil 1 de pro-NT	Cuartil 2 de pro-NT	Cuartil 3 de pro-NT	Cuartil 4 de pro-NT	
todos	2606 / 335	1,0 (ref)	1,44 (0,95-2,10)	1,83 (1,21-2,65)	2,06 (1,38-3,06)	<0,01
Hombres	1080 / 137	1,0 (ref)	1,43 (0,79-2,59)	1,36 (0,75-2,48)	2,36 (1,29-4,30)	0,044
Mujeres	1526 / 198	1,0 (ref)	1,45 (0,85-2,46)	2,23 (1,32-3,75)	1,88 (1,09-3,21)	0,019
Sin cáncer hereditario	1456 / 197	1,0 (ref)	1,65 (0,99-2,77)	1,68 (0,99-2,85)	2,37 (1,41-3,97)	0,014
Sin cáncer prevalente	2362/301	1,0 (ref)	1,36 (0,89-2,06)	1,96 (1,29-2,95)	2,1 (1,38-3,19)	0,001

TA<140	1631 / 197	1,0 (ref)	1,29 (0,77-2,18)	1,88 (1,13-3,15)	2,03 (1,21-3,39)	0,023
Sin TAH	2269 / 273	1,0 (ref)	1,63 (1,05-2,53)	2,03 (1,31-3,13)	2,12 (1,35-3,35)	0,004
TA<140 / sin TAH	1526 / 175	1,0 (ref)	1,44 (0,83-2,49)	1,99 (1,15-3,42)	2,16 (1,24-3,73)	0,026
No fumador	2001 / 241	1,0 (ref)	1,47 (0,93-2,32)	1,75 (1,12-2,74)	2,26 (1,42-3,61)	0,006
Sin enfermedad cardiaca prevalente	2544 / 326	1,0 (ref)	1,51 (1,00-2,26)	1,95 (1,30-2,90)	2,17 (1,44-3,26)	0,001
TFGe >60	2319/320	1,0 (ref)	1,36 (0,90-2,04)	1,77 (1,18-2,64)	2,22 (1,47-3,35)	0,001
Sin GAA o DM	2152 / 254	1,0 (ref)	1,44 (0,91-2,28)	2,03 (1,30-3,19)	2,46 (1,55-3,90)	<0,001
Sin SiMe	2426 / 302	1,0 (ref)	1,44 (0,96-2,18)	1,92 (1,28-2,89)	2,03 (1,34-3,07)	0,003
Sanos, todos	1155 / 123	1,0 (ref)	1,84 (0,95-3,57)	2,68 (1,41-5,09)	3,17 (1,57-6,37)	0,005
Sanos, mujeres	681 / 74	1,0 (ref)	1,35 (0,56-3,25)	2,96 (1,28-6,86)	3,46 (1,37-8,73)	0,015

"N / N casos" indica el "número total de sujetos en el análisis / número de casos con la enfermedad en cuestión". "Pro-NT" indica la concentración en plasma en ayunas de pro-neurotensina en el examen inicial de MDC-CC. "Cuartiles 1-4 de pro-NT" define los cuartiles de la población de MDC-CC (más bajo a más alto) de pro-NT. Los datos se presentan como las razones de probabilidad (intervalos de confianza del 95%), y los sujetos que pertenecen al cuartil más bajo de pro-NT se definieron como el grupo de referencia (razón de probabilidades =1). "P para la tendencia" indica el valor de P para la tendencia lineal en los cuartiles 1-4.

Herencia de cáncer significa sin cáncer conocido en los antecedentes familiares inicialmente, cáncer no prevalente significa sin diagnóstico de cáncer inicialmente, sin enfermedad cardiaca prevalente significa sin infarto de miocardio, cardiopatía isquémica, ictus, insuficiencia cardiaca (insuficiencia cardiaca aguda o crónica), fibrilación auricular y aleteo auricular inicialmente, TA = tensión arterial, TAH = terapia antihipertensiva, TFGe = tasa de filtración glomerular estimada, GAA = glucosa alterada en ayunas, DM = diabetes mellitus, SiMe = síndrome metabólico.

Tabla 4

Concentración de pro-Neurotensina inicial (en ayunas) y 1, 2 y 3 horas tras la ingestión de nata en sujetos de control sanos y sujetos con insuficiencia cardiaca (IC)

pro-NT [en %]	valor inicial	1 h	2 h	3 h
control	100	173,5	147,0	133,0
IC	100	227,5	201,8	179,3

Los valores de PNT se proporcionan en % respecto del valor inicial, que se definió para ambos grupos como el 100%, respectivamente.

Descripción de las figuras:

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

La Figura 2 muestra el nivel de PNT antes y después de la ingestión de nata en pacientes con insuficiencia cardiaca y un grupo de control.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> sphingotec GmbH

<120> Un método para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto

5 <130> S75040WO

<150> EP 15 156 995.1

<151> 27-02-2015

10 <150> EP 15 164 910.0

<150> 23-04-2015

<160> 12

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 147

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Asp Ser Glu Glu Met Lys Ala Leu Glu Ala Asp Phe Leu Thr
 1 5 10 15

Asn Met His Thr Ser Lys Ile Ser Lys Ala His Val Pro Ser Trp Lys
 20 25 30

Met Thr Leu Leu Asn Val Cys Ser Leu Val Asn Asn Leu Asn Ser Pro
 35 40 45

Ala Glu Glu Thr Gly Glu Val His Glu Glu Glu Leu Val Ala Arg Arg
 50 55 60

Lys Leu Pro Thr Ala Leu Asp Gly Phe Ser Leu Glu Ala Met Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Tyr Gln Leu His Lys Ile Cys His Ser Arg Ala Phe Gln His Trp
 85 90 95

Glu Leu Ile Gln Glu Asp Ile Leu Asp Thr Gly Asn Asp Lys Asn Gly
 100 105 110

Lys Glu Glu Val Ile Lys Arg Lys Ile Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Gln
 115 120 125

Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Asp Ser
 130 135 140

Tyr Tyr Tyr
 145

25 <210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

ES 2 781 084 T3

Ser Asp Ser Glu Glu Glu Met Lys Ala Leu Glu Ala Asp Phe Leu Thr
 1 5 10 15

Asn Met His Thr Ser Lys Ile Ser Lys Ala His Val Pro Ser Trp Lys
 20 25 30

Met Thr Leu Leu Asn Val Cys Ser Leu Val Asn Asn Leu Asn Ser Pro
 35 40 45

Ala Glu Glu Thr Gly Glu Val His Glu Glu Glu Leu Val Ala Arg Arg
 50 55 60

Lys Leu Pro Thr Ala Leu Asp Gly Phe Ser Leu Glu Ala Met Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Tyr Gln Leu His Lys Ile Cys His Ser Arg Ala Phe Gln His Trp
 85 90 95

Glu Leu Ile Gln Glu Asp Ile Leu Asp Thr Gly Asn Asp Lys Asn Gly
 100 105 110

Lys Glu Glu Val Ile Lys Arg Lys Ile Pro Tyr Ile Leu
 115 120 125

<210> 3
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Lys Ile Pro Tyr Ile Leu
 1 5

10 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 4
 Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
 1 5 10

20 <210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 781 084 T3

Ser Asp Ser Glu Glu Glu Met Lys Ala Leu Glu Ala Asp Phe Leu Thr
1 5 10 15

Asn Met His Thr Ser Lys Ile Ser Lys Ala His Val Pro Ser Trp Lys
20 25 30

Met Thr Leu Leu Asn Val Cys Ser Leu Val Asn Asn Leu Asn Ser Pro
35 40 45

Ala Glu Glu Thr Gly Glu Val His Glu Glu Glu Leu Val Ala Arg Arg
50 55 60

Lys Leu Pro Thr Ala Leu Asp Gly Phe Ser Leu Glu Ala Met Leu Thr
65 70 75 80

Ile Tyr Gln Leu His Lys Ile Cys His Ser Arg Ala Phe Gln His Trp
85 90 95

Glu Leu Ile Gln Glu Asp Ile Leu Asp Thr Gly Asn Asp Lys Asn Gly
100 105 110

Lys Glu Glu Val Ile
115

<210> 6
<211> 132
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ser Asp Ser Glu Glu Glu Met Lys Ala Leu Glu Ala Asp Phe Leu Thr
1 5 10 15

Asn Met His Thr Ser Lys Ile Ser Lys Ala His Val Pro Ser Trp Lys
20 25 30

Met Thr Leu Leu Asn Val Cys Ser Leu Val Asn Asn Leu Asn Ser Pro
35 40 45

Ala Glu Glu Thr Gly Glu Val His Glu Glu Glu Leu Val Ala Arg Arg
50 55 60

Lys Leu Pro Thr Ala Leu Asp Gly Phe Ser Leu Glu Ala Met Leu Thr

10

ES 2 781 084 T3

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 9
Lys Ile Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg
1 5 10 15

Arg Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Asp Ser Tyr Tyr Tyr
20 25

10 <210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 10
Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Asp
1 5 10 15

Ser Tyr Tyr Tyr
20

<210> 11
<211> 23
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
His Cys Ser Asp Ser Glu Glu Glu Met Lys Ala Leu Glu Ala Asp Phe
1 5 10 15

Leu Thr Asn Met His Asn His
20

25 <210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 12
His Cys Asn Leu Asn Ser Pro Ala Glu Glu Thr Gly Glu Val His Glu
1 5 10 15

Glu Glu Leu Val Ala Asn His
20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad de procesamiento de grasas y/o para predecir el riesgo de obesidad en un sujeto que comprende:
- 5
- determinar mediante un inmunoensayo el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto o
 - determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y
 - correlacionar dicho nivel de pro-neurotensina 1-117 con la actividad de procesamiento de grasas y/o el riesgo de incidencia de obesidad en dicho sujeto, en el que un nivel elevado es indicativo de una actividad de procesamiento de grasas incrementada y/o es predictivo de un riesgo incrementado de obesidad
- 10 y en el que el sujeto no es obeso en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto, y en el que un "nivel elevado" significa un nivel por encima de un cierto nivel umbral.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un sujeto no prediabético (sin GAA).
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que se determina el nivel en ayunas de pro-neurotensina 1-117.
- 15 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto no es diabético con glucemia en ayunas menor de 6,1 mmol/l, pero mayor de 5,4 mmol/l.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto no tiene cáncer.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto no tiene antecedentes de diagnóstico de un evento cardiovascular agudo en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto, en el que dicho evento cardiovascular se selecciona del grupo que comprende infarto de miocardio, ictus, insuficiencia cardíaca aguda y muerte cardiovascular relacionada con infarto de miocardio, ictus o insuficiencia cardíaca aguda.
- 20 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto no tiene síndrome metabólico.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho sujeto es un sujeto con una glucemia en ayunas menor de 5,4 mmol/l.
- 25 9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el riesgo de obesidad es independiente del riesgo de contraer diabetes mellitus y/o síndrome metabólico.
10. Un método según las reivindicaciones 1 a 9, en el que además se determina al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende la edad, sexo, tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, tratamiento antihipertensivo (TAH), circunferencia de la cintura, proporción cintura-cadera, fumador actual, herencia de diabetes y enfermedad cardiovascular (ECV) previa.
- 30 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que 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 anteriormente mencionadas.
- 35 12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho método se lleva a cabo más de una vez para monitorizar el riesgo de incidencia de obesidad.
13. Un método según la reivindicación 12, en el que dicha monitorización se lleva a cabo para evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.
- 40 14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha monitorización se lleva a cabo para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

Figura 1

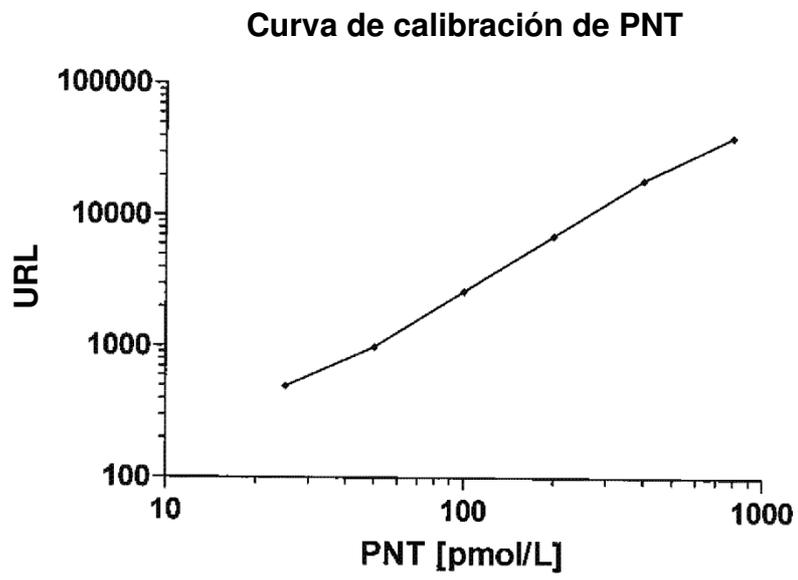


Figura 2

