



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 454**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/62** (2006.01)

**G01N 33/66** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/70** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

**G01N 33/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07727168 .2**

96 Fecha de presentación : **21.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2008108**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Medios y método para predecir diabetes tipo II.**

30 Prioridad: **24.03.2006 EP 06111705**  
**07.09.2006 EP 06120273**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.05.2011**

73 Titular/es: **METANOMICS GmbH**  
**Tegeler Weg 33**  
**10589 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Bethan, Bianca;**  
**Busch, Kristina;**  
**Wiemer, Jan;**  
**Gipmans, Martijn;**  
**Leibold, Edgar;**  
**Spranger, Jochen;**  
**Bobbert, Thomas y**  
**Pfeiffer, Andreas Friedrich Hermann**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 358 454 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

Medios y método para predecir diabetes tipo ii.

La presente invención se relaciona con un método para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 que comprende determinar criptoxantina, ácido 2-hidroxi-palmitico, triacilglicérido (C16:0, C18:1, C18:2), ácido gondoico, ácido tricosanoico, 5-oxoprolina en una muestra de plasma, suero o sangre de prueba de un sujeto que se sospecha tiene una predisposición a la diabetes tipo 2 y comparar dichos metabolitos con una referencia, por lo cual se diagnostica una predisposición a la diabetes tipo 2.

La prevalencia de la diabetes mellitus ha alcanzado aproximadamente 6% en el mundo industrializado y aumentará hasta 366 millones de personas afectadas en 2030 a nivel mundial. La razón más frecuente (tipo), (aproximadamente 90 %) para diabetes en el mundo se explica por la diabetes tipo 2, que tiene una patogenia multifactorial. La secuencia patológica para la diabetes tipo 2 implica muchos elementos. Se considera que es obligatorio tener una predisposición genética que es en la actualidad poco entendida. Si luego ocurre el fenotipo de la diabetes se influncia por muchos factores ambientales que comparten una capacidad de estresar el sistema de homeostasis de la glucosa, ya sea al originar o empeorar la resistencia a la insulina o alterar la secreción de insulina. Por supuesto muchas hormonas participan en la regulación de metabolismo de glucosa, pero la hormona clave es la insulina. Se mantiene la normoglicemia por la interacción equilibrada entre la acción de insulina y la secreción de insulina. Se produce la insulina por la célula  $\beta$  pancreática que es capaz de regular muy rápido a diferentes demandas de glucosa. La principal razón para la diabetes tipo 2 es una resistencia al aumento de insulina. Por lo tanto, la acción de la insulina normalmente disminuye pero inicialmente el sistema es capaz de compensar esto al incrementar la función de la célula  $\beta$ . En este momento solo tal vez se puede medir una tolerancia a la glucosa deteriorada o alteración de la glucosa en ayuno en el OGTT. Pero durante el tiempo la célula  $\beta$  se sobreestresará por la resistencia al aumento de insulina y se puede diagnosticar toxicidad de glucosa y una diabetes tipo 2.

Además de los problemas médicos directos por el alto o bajo azúcar en la sangre la principal carga médica y socioeconómica de la enfermedad se origina por las complicaciones asociadas. Las complicaciones devastadoras de la diabetes mellitus son en su mayoría enfermedades macrovasculares y microvasculares como falla renal crónica, retinopatía, neuropatía periférica y autonómica o infarto del miocardio. Por lo tanto, la morbilidad cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2 es dos a cuatro veces mayor que aquella de las personas no diabéticas (Stumvoll et al., Tipo 2 diabetes: principles of pathogenia y therapy, Lancet 2005).

A la luz de este mecanismo, la terapia de la diabetes se basa actualmente en el monitoreo de los niveles de azúcar en la sangre y en la reducción de un nivel elevado de azúcar en la sangre en un nivel normal mediante la administración de insulina exógena. Para este fin, se inyecta insulina exógena en la sangre. Alternativamente, se pueden regular los niveles de glucosa en la sangre mediante dietas nutricionales y la exclusión de los factores de riesgo del estilo de vida, tales como fumar, falta de ejercicio, altos niveles de colesterol, y un peso corporal inestable.

El Comité Experto de la ADA (Asociación Americana de Diabetes) reconoce un grupo intermedio de sujetos cuyos niveles de glucosa, aunque no cumplan los criterios diabetes, sin embargo, son demasiado altos para ser considerados normales. Este grupo se define como el que tiene niveles de glucosa en plasma en ayunas (FPG)  $>100$  mg/dl (5.6 mmol/l) pero  $<126$  mg/dl (7.0 mmol/l) o valores 2-h en la prueba de tolerancia a glucosa oral (OGTT) de  $>140$  mg/dl (7.8 mmol/l) pero  $<200$  mg/dl (11.1 mmol/l). Así, las categorías de los valores FPG son como sigue:

- FPG  $<100$  mg/dl (5.6 mmol/l) = glucosa en ayunas normal;
- FPG 100-125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/l) = IFG (glucosa en ayunas deteriorada);
- FPG  $>126$  mg/dl (7.0 mmol/l) = diagnóstico provisional de la diabetes (se debe confirmar el diagnóstico, como se describe adelante). Las categorías correspondientes cuando se utiliza el OGTT son las siguientes:
- glucosa postcarga 2 h  $<140$  mg/dl (7.8 mmol/l) = tolerancia a glucosa normal
- glucosa postcarga 2 h 140-199 mg/dl (7.8 -11.1 mmol/l) = IGT (tolerancia deteriorada de la glucosa)
- glucosa postcarga 2 h  $>200$  mg/dl (11.1 mmol/l) = diagnóstico provisional de la diabetes (se debe confirmar el diagnóstico, como se describe adelante).

Diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2:

1. Síntomas de la diabetes más concentración de glucosa en plasma ocasional  $>200$  mg/dl (11.1 mmol/l). Ocasional se define como cualquier hora del día sin tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia, y pérdida de peso inexplicada. Alternativamente: 2.

FPG >126 mg/dl (7.0 mmol/l). Ayuno se define como la no absorción calórica durante por lo menos 8 h. Alternativamente: 3. glucosa postcarga 2 h >200 mg/dl (11.1 mmol/l) durante un OGTT. Se debe desarrollar la prueba como se describe por WHO, utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

- 5 En la ausencia de hiperglucemia inequívoca, estos criterios se deben confirmar al repetir la prueba en un día diferente. La tercera medición (OGTT) no se recomienda para el uso clínico de rutina. (Asociación Americana de Diabetes, Diagnóstico y Clasificación de Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2006) Sin embargo, un aumento en los niveles de azúcar en la sangre o una disminución en la insulina disponible son los acontecimientos más bajos en el desarrollo y progreso de la diabetes. No están todavía disponibles las mediciones diagnósticas alternativas o mediciones diagnósticas que podrían aún identificar los individuos en riesgo antes de la aparición temprana de la enfermedad o por lo menos en un estado temprano de la enfermedad.

15 De acuerdo con lo anterior, se debe observar el problema técnico subyacente de la presente invención como la provisión de medios y métodos para diagnosticar fiable y eficientemente una predisposición a la diabetes. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y descritas aquí adelante.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se relaciona con un método para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 como se especifica en la reivindicación 1.

20 La expresión "método para diagnosticar" como se refiere de acuerdo con la presente invención significa que el método puede consistir esencialmente de las etapas anteriormente mencionadas o puede incluir etapas adicionales. Sin embargo, se debe entender que el método es un método llevado a cabo in vitro, es decir no practicado en el cuerpo humano o del animal. Diagnosticar como se utiliza aquí se refiere a evaluar la probabilidad de acuerdo con la cual un sujeto tendrá una predisposición para las enfermedades referidas aquí, es decir diabetes. El diagnóstico de una predisposición a veces se puede denominar como pronóstico o predicción de la probabilidad de que un sujeto desarrollará la enfermedad. Como lo entenderán aquellos expertos en la técnica, tal una evaluación, aunque se prefiere, usualmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados. El término, sin embargo, requiere que una porción estadísticamente significativa de sujetos se puedan identificar por tener una predisposición para las enfermedades referidas aquí. Si una porción es estadísticamente significativa se puede determinar sin más trámite por la persona experta en la técnica utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%. Los valores p son, preferiblemente, 0.2, 0.1, 0.05.

35 Diagnosticar de acuerdo con la presente invención incluye el monitoreo, confirmación, y clasificación de la predisposición para la enfermedad en cuestión o sus síntomas. El monitoreo se relaciona con no perder de vista una predisposición ya diagnosticada (de la enfermedad), o una complicación, por ejemplo analizar el progreso de la enfermedad, la influencia de un tratamiento particular en el progreso de la enfermedad o complicaciones que surgen durante el periodo de la enfermedad o después de tratamiento exitoso de la enfermedad y no de la predisposición. La confirmación se relaciona con fortalecer o concretar un diagnóstico ya desarrollado utilizando otros indicadores o marcadores. La clasificación se relaciona con la asignación del diagnóstico de acuerdo con la fuerza o tipo de síntomas en diferentes clases, por ejemplo los tipos de diabetes como se establece en otros lugares en la descripción s.o. Específicamente, los sujetos preferiblemente, se pueden clasificar para diferentes grupos de riesgo con base en los metabolitos y la clase de regulación como se muestra en las Tablas, adelante. Los biomarcadores de metabolito pueden ser indicadores para los sujetos que tienen un riesgo incrementado para la diabetes tipo 2 y que caen en el grupo de riesgo de alteración de la glucosa en ayuno (IFG), tolerancia deteriorada de la glucosa (IGT) o ambos (IFG&IGT) como se indica en las Tablas, adelante. Así, preferiblemente, el método de la presente invención es un método para diagnosticar si un sujeto tiene una predisposición a la diabetes tipo 2 o sufre de IFG, IGT o IFG&IGT con base en los metabolitos que se asocian con el dicho riesgo incrementado como se enumera en las Tablas acompañantes.

50 El término "diabetes" o "diabetes mellitus" como se utiliza aquí se refiere a condiciones de enfermedad en las que se deteriora el metabolismo de glucosa. Dicho deterioro resultar en hiperglucemia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO), la diabetes se puede subdividir en cuatro clases. La diabetes tipo 1 se origina por una carencia de insulina. La insulina es producida por las denominadas células de los islotes pancreáticos. Dichas células se pueden destruir por una reacción autoinmune en la diabetes tipo 1 (Tipo 1 a). Más aún, la diabetes tipo 1 también abarca una variante idiopática (Tipo 1b). La diabetes tipo 2 se origina por una resistencia a la insulina. La diabetes tipo 3, de acuerdo con la clasificación actual, comprende todos los otros tipos específicos de la diabetes mellitus. Por ejemplo, las células beta pueden tener defectos genéticos que afectan la producción de insulina, la resistencia a la insulina puede ser originada genéticamente o el páncreas como tal se puede destruir o deteriorar. Más aún, la desregulación de hormonas o fármacos también pueden originar diabetes tipo 3. La diabetes tipo 4

puede ocurrir durante el embarazo. La diabetes como se utiliza de acuerdo con esta invención se refiere a diabetes tipo 2. De acuerdo con la Sociedad Alemana para Diabetes, se diagnostica la diabetes ya sea mediante un nivel de glucosa en plasma que es mayor de 110 mg/dl en el estado de ayuno o ser mayor de 220 mg/dl postprandial. Se describen técnicas de diagnóstico preferidas adicionales en otro lugar en esta especificación. Los síntomas adicionales de la diabetes son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto de medicina, tales como Stedman o Pschyrembl.

El término “predisposición” como se utiliza aquí significa que un sujeto todavía no ha desarrollado la enfermedad o cualquiera de los síntomas de la enfermedad mencionados anteriormente u otro criterio de diagnóstico pero, no obstante, desarrollará la enfermedad dentro de una ventana de tiempo definido en el futuro (ventana de predicción) con una cierta probabilidad. La ventana de predicción es un intervalo en el que el sujeto desarrollará la enfermedad o afección de acuerdo con la probabilidad predicha. La ventana de predicción puede ser la duración de vida restante completa del sujeto luego de análisis mediante el método de la presente invención. Preferiblemente, sin embargo, la ventana de predicción es un intervalo de un mes, seis meses o uno, dos, tres, cuatro, cinco o diez años después de que se ha obtenido la muestra analizada mediante el método de la presente invención. La probabilidad de desarrollar las enfermedades referidas aquí será significativamente mayor para un sujeto que tiene una predisposición que aquella probabilidad de aparición estadística de la diabetes mellitus dentro de una cohorte dada de sujetos. Preferiblemente, para un sujeto individual la probabilidad asociada con una predisposición para desarrollar diabetes se incrementa por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% o 100% o por lo menos 1.5-veces, 2-veces, 3-veces, 4-veces, 5-veces o 10-veces en comparación con la probabilidad promedio para un sujeto de una cohorte dada para desarrollar diabetes. Una cohorte de sujetos como se refiere aquí significa una pluralidad de sujetos individuales que son de la misma especie y, preferiblemente, tienen los mismos antecedentes genéticos o grupo étnico y, más preferiblemente, también tienen la misma edad y género.

Se debe entender que “metabolito” como se utiliza aquí puede ser por lo menos una molécula de dicho metabolito hasta una pluralidad de moléculas del metabolito y que una pluralidad de metabolitos significa una pluralidad de moléculas químicamente diferentes en donde para cada metabolito puede estar presente por lo menos una molécula hasta una pluralidad de moléculas. Un metabolito de acuerdo con la presente invención abarca todas las clases de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos que incluyen aquellos que están comprendidos por el material biológico tal como organismos. Preferiblemente, el metabolito de acuerdo con la presente invención es un compuesto de molécula pequeña. Más preferiblemente, se prevé en el caso de una pluralidad de metabolitos, dicha pluralidad de metabolitos representa un metaboloma, es decir la colección de metabolitos que está comprendida por un organismo, un órgano, un tejido o una célula en un tiempo específico y bajo condiciones específicas.

Los metabolitos son compuestos de molécula pequeña, tales como sustratos para enzimas de rutas metabólicas, intermedios de tales rutas o los productos obtenidos mediante una ruta metabólica. Las rutas metabólicas son bien conocidas en la técnica y pueden variar entre especies. Preferiblemente, dichas rutas incluyen por lo menos ciclo de ácido cítrico, cadena respiratoria, fotosíntesis, fotorespiración, glucólisis, gluconeogenia, ruta de monofosfato de hexosa, ruta de fosfato de pentosa oxidativa, producción y  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, Ciclo de Urea, rutas de biosíntesis de aminoácido, rutas de degradación de proteína tales como degradación proteosómica, rutas que degradan aminoácido, biosíntesis o degradación de: lípidos, policétidos (que incluyen por ejemplo flavonoides e isoflavonoides), isoprenoides (que incluyen por ejemplo terpenos, esteroides, carotenoides, xantofilos), carbohidratos, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, bencenoides, indoles, compuestos indol-azufre, porfirinas, antocianos, hormonas, vitaminas, cofactores tales como grupos prostéticos o portadores de electrón, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y moléculas relacionada tales como tARNs, microARNs (miARN) o mARNs. De acuerdo con lo anterior, los metabolitos de compuesto de molécula pequeña se componen preferiblemente de las siguientes clases de compuestos: alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, compuestos aromáticos, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, iminas, amidas, cianuros, aminoácidos, péptidos, tioles, tioésteres, ésteres de fosfato, ésteres de sulfato, tioéteres, sulfóxidos, éteres, o combinaciones o derivados de los compuestos mencionados anteriormente. Las moléculas pequeñas entre los metabolitos pueden ser metabolitos primarios que se requieren para función celular normal, función de órgano o crecimiento animal, desarrollo o salud. Más aún, los metabolitos de molécula pequeña comprenden adicionalmente metabolitos secundarios que tienen función ecológica esencial, por ejemplo metabolitos que permiten que un organismo se adapte a su ambiente. Adicionalmente, los metabolitos no se limitan a dichos metabolitos primarios y secundarios y abarcan adicionalmente compuestos de molécula pequeña artificiales. Dichos compuestos de molécula pequeña artificiales se derivan de moléculas pequeñas proporcionadas de forma exógena que se administran o toman por un organismo pero no son metabolitos primarios o secundarios como se definió anteriormente. Por ejemplo, los compuestos de molécula pequeña artificiales pueden ser productos metabólicos obtenidos de fármacos mediante las rutas metabólicas del animal. Más aún, los metabolitos incluyen adicionalmente péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, tales como ARN o ADN. Más preferiblemente, un metabolito tiene un peso molecular de 50 Da (Dalton) a 30,000 Da, más preferiblemente menos de 30,000 Da, menos de 20,000 Da, menos de 15,000 Da, menos de 10,000 Da, menos de 8,000 Da, menos de 7,000 Da, menos de 6,000 Da, menos de 5,000 Da, menos de 4,000 Da, menos de 3,000 Da, menos de 2,000 Da, menos de 1,000 Da, menos de 500 Da, menos de 300 Da, menos de 200 Da, menos de 100 Da. Preferiblemente, un metabolito tiene, sin embargo, un peso molecular

de por lo menos 50 Da. Más preferiblemente, un metabolito de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de 50 Da hasta 1,500 Da.

5 Se entenderá que en adición a los metabolitos o grupos de metabolitos anteriormente mencionados, también se puede determinar un metabolito adicional o un grupo de metabolitos adicionales mediante el método de la presente invención. Dicho metabolito adicional o grupo del mismo puede incluir metabolitos conocidos por estar asociados con la diabetes o predisposición a la diabetes. Preferiblemente, dicho metabolito adicional es Glucosa.

Otros metabolitos preferidos a ser determinados juntos, es decir ya sea de forma simultánea o de forma consecutiva, con los metabolitos o grupos de metabolitos mencionados anteriormente son metabolitos seleccionados del grupo que consiste de:

10 (i) un ácido graso saturado de cadena larga, preferiblemente, ácido Lignocérico (C24:0), ácido Melísico (C30:0), o ácido tricosanoico (C23:0),

(ii) un ácido graso poli- insaturado, preferiblemente, ácido Docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido Eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido Araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido Linoleico (C18:cis[9,12]2), o ácido Linolénico (C18:cis[9,12,15]3),

15 (iii) un aminoácido, preferiblemente, Lisina, Alanina, Treonina, Triptofano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina,

(iv) un antioxidante, preferiblemente, ácido Ascórbico, Coenzima Q10, o alfa-Tocoferol,

(v) un metabolito del Ciclo de Ácido Cítrico, preferiblemente, Piruvato, Citrato, o Malato,

(vi) un metabolito del Ciclo de Urea, preferiblemente, Urea, Citrulina, Succinato, u Ornitina,

20 (vii) Manosa, ácido alfa-Cetoisocaproico, Glicerol, fracción de lípido, o ácido 3-Hidroxitbutírico,

(viii) glucosa.

25 Un "ácido graso saturado de cadena larga" como se refiere de acuerdo con la presente invención abarca, preferiblemente, ácidos grasos C18 a C30 en donde los números "18" y "30" indican el número de átomos de carbono en la cadena de ácido graso. Más preferiblemente, se relaciona con ácidos grasos C20 a C30, y, más preferiblemente con ácido Lignocérico (C24:0), ácido Melísico (C30:0), o ácido tricosanoico (C23:0).

30 Un "ácido graso poli- insaturado" como se utiliza aquí significa un ácido graso que comprende más de un enlace de carbono insaturado. Los ácidos grasos poli- insaturados preferiblemente previstos por la presente invención son ácidos grasos poli insaturados C18 a C22, y, más preferiblemente, ácido Docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido Eicosapentaenoico (C20:cis [5,8,11,14,17]5), ácido Araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido Linoleico (C18:cis[9,12]2), o ácido Linolénico (C18:cis [9,12,15]3).

El término "aminoácido" como se utiliza abarca los aminoácidos de ocurrencia natural así como también derivados de los mismos. Los aminoácidos de ocurrencia natural son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto de bioquímica estándar. Más preferiblemente, el término se relaciona con Lisina, Alanina, Treonina, Triptofano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina.

35 El término "antioxidante" como se utiliza abarca compuestos que son capaces de evitar la oxidación en un sujeto. Preferiblemente, el término se relaciona con metabolitos de ocurrencia natural que pueden servir como coenzimas en la célula de un sujeto o que son vitaminas que incluyen aquellas que necesitan ser suministradas de forma exógena. Más preferiblemente, un antioxidante de acuerdo con la presente invención es ácido Ascórbico, Coenzima Q10, o alfa-Tocoferol.

40 El término "un metabolito del Ciclo de Ácido Cítrico" o "un metabolito del Ciclo de Urea" se relaciona con los productos, intermedios y reactivos que se sintetizan o utilizan como sustratos en las cascadas de conversión bioquímica bien conocidas mencionadas anteriormente. Esos productos, intermedios o reactivos se describen en los libros de texto de bioquímica estándar y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Preferiblemente, Piruvato, Citrato, o Malato son un metabolito del Ciclo de Ácido Cítrico. Urea, Citrulina, Succinato, u Ornitina son, 45 preferiblemente, un metabolito del Ciclo de Urea referido aquí.

Preferiblemente, un grupo de biomarcadores se determina de acuerdo con el método de la presente invención. Más preferiblemente, dicho grupo consiste de biomarcadores de diferentes grupos de metabolito especificados

anteriormente bajo (i) a (vii). Más preferiblemente, se determina por lo menos un metabolito de por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis o todos los grupos anteriormente mencionados (i) a (vii). Se ha encontrado que los miembros de las clases de metabolito mencionadas anteriormente proporcionan biomarcadores de apoyo para diagnosticar diabetes o una predisposición a la diabetes. Más aún, una combinación de las clases de metabolitos mencionadas anteriormente proporciona aún resultados más superiores y fiables.

También preferiblemente, en adición a los metabolitos de apoyo o grupos de metabolitos de apoyo mencionados anteriormente se determina por lo menos un metabolito de apoyo seleccionado de cualquiera de los grupos que consisten de: ácido 3-hidroxibutírico, alanina, ácido alfa-cetioisocaproico, alfa- tocoferol, arginina, ácido ascórbico, aspargina, beta-caroteno, colestenol, citrato, citrulina, creatinina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), folato, glucosa, glucosa-1-fosfato, glutamato, glutamina, ácido glicérico, glicerol-3-fosfato, glicina, isoleucina, lactato, leucina, malato, manosa, metionina, mio- inositol, ornitina, ácido palmítico, fosfolípidos, sulfato de pregnenolona, ácido esteárico, succinato, ácido treónico, treonina, triacilglicéridos, triptofano, ácido úrico, y valina.

Más preferiblemente, por lo menos un metabolito de apoyo se selecciona del grupo que consiste de: triptofano, alanina, leucina, ácido palmítico, ácido eicosatrienoico, glicerofosfolípidos, isoleucina, ácido eicosatrienoico, triptofano, ácido lignocérico, ácido linoleico, serina, tirosina, ácido linoleico, sulfato de pregnenolona, aspartato, ácido araquidónico, y succinato. Más preferiblemente, el sujeto en dicho caso es un macho.

Más preferiblemente, por lo menos un metabolito de apoyo se selecciona del grupo que consiste de: alanina, ácido palmítico, isoleucina, ácido eicosatrienoico, ácido úrico, ácido esteárico, y serina. Más preferiblemente, el sujeto en dicho caso es una hembra.

Cada uno dichos metabolitos es un biomarcador de apoyo adecuado por si mismo para la predisposición de las enfermedades referidas aquí. Sin embargo, más preferiblemente, un grupo de biomarcadores de apoyo que incluyen o consisten de los biomarcadores de uno de los grupos anteriormente mencionados se determina mediante el método de la presente invención. Un grupo de biomarcadores consiste, preferiblemente, de por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro y, preferiblemente, hasta todos los biomarcadores de apoyo mencionados anteriormente.

Los metabolitos de apoyo referidos antes preferiblemente, también serán comparados con los resultados de referencia adecuados como se especifica en otro lugar aquí. El resultado de dicha comparación será de apoyo adicional a la conclusión de si el sujeto tendrá o no tendrá una predisposición para las enfermedades referidas aquí. Los resultados de referencia preferidos, valores para cambio de las cantidades relativas e indicaciones para la clase de regulación se encuentran en los Ejemplos acompañantes, adelante.

El término "muestra de prueba" como se utiliza aquí se refiere aquí se refiere a muestras que se utilizan para el diagnóstico de una predisposición a la diabetes tipo 2 mediante el método de la presente invención. Dicha muestra de prueba es una muestra biológica. Las muestras biológicas que se utilizan en el método de la presente invención son sangre, plasma, o suero.

Las muestras anteriormente mencionadas son, preferiblemente, pre-tratadas antes de que se utilicen para el método de la presente invención. Como se describe en más detalle adelante, dicho pre- tratamiento puede incluir tratamientos requeridos para liberar o separar los compuestos o para remover material excesivo o residuos. Las técnicas adecuadas comprenden centrifugación, extracción, fraccionamiento, purificación y/o enriquecimiento de compuestos. Más aún, se llevan a cabo otros pre- tratamientos con el fin de proporcionar los compuestos en una forma o concentración adecuada para análisis de compuestos. Por ejemplo, si se utiliza cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa en el método de la presente invención, se requerirá derivar los compuestos antes de la dicha cromatografía de gas. Los pre-tratamientos adecuados y necesarios dependerán de los medios utilizados para llevar a cabo el método de la invención y son bien conocidos por la persona experta en la técnica. Las muestras pre- tratadas como se describe anteriormente también están comprendidas por el término "muestra" como se utiliza de acuerdo con la presente invención.

El término "sujeto" como se utiliza aquí se relaciona con animales, preferiblemente con mamíferos tales como ratones, ratas, ovejas, perros, gatos, caballos, monos, o vacas y, también preferiblemente, con humanos. Otros animales que se pueden diagnosticar aplicando el método de la presente invención son pájaros o reptiles. Un sujeto que se sospecha sufre de diabetes o que tiene una predisposición a la misma como se utiliza aquí se refiere a un sujeto que muestra, preferiblemente, síntomas o signos clínicos o parámetros indicativos de diabetes tipo 2. Sin embargo, el término también se relaciona con un sujeto aparentemente saludable, es decir un sujeto que no exhibe ninguno de los síntomas, signos clínicos o parámetros mencionados anteriormente. Se pueden investigar sujetos aparentemente saludables mediante el método de la presente invención como una medida de cuidado preventivo o para propósitos de separación de la población.

El término “determinar” como se utiliza aquí se refiere a determinar por lo menos un rasgo característico de los metabolitos comprendidos por las muestras referidas aquí. Los rasgos característicos de acuerdo con la presente invención con rasgos que caracterizan las propiedades físicas y químicas que incluyen propiedades bioquímicas de un metabolito. Tales propiedades incluyen, por ejemplo, peso molecular, viscosidad, densidad, carga eléctrica, giro, actividad óptica, color, fluorescencia, quimioluminiscencia, composición elemental, estructura química, capacidad para reaccionar con otros compuestos, capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador) y similares. Los valores para dichas propiedades pueden servir como rasgos característicos y se pueden determinar mediante técnicas bien conocidas en el arte. Más aún, el rasgo característico puede ser cualquier rasgo que se deriva de los valores de las propiedades físicas y/o químicas de un metabolito mediante operaciones estándar, por ejemplo, cálculos matemáticos tales como multiplicación, división o cálculo logarítmico. Más preferiblemente, por lo menos un rasgo característico permite la determinación y/o identificación química de dicho por lo menos un metabolito.

Los metabolitos comprendidos por una muestra de prueba se pueden determinar de acuerdo con la presente invención cuantitativa o cualitativamente. Para la determinación cualitativa, la presencia o ausencia del metabolito se determinará mediante una técnica adecuada. Más aún, la determinación cualitativa puede, preferiblemente, incluir la determinación de la estructura química o composición del metabolito. Para la determinación cuantitativa, se determinará la cantidad precisa de los metabolitos presentes en la muestra o se determinará la cantidad relativa de los metabolitos, preferiblemente, con base en el valor determinado para los rasgos característicos referidos aquí anteriormente. Se puede determinar la cantidad relativa en el caso en el que no se pueda determinar la cantidad precisa de un metabolito. En dicho caso, se puede determinar si la cantidad en que el metabolito está presente se aumenta o disminuye con respecto a una muestra que comprende dicho metabolito en una segunda cantidad. Analizar cuantitativamente un metabolito, así, también incluye lo que algunas veces se denomina como análisis semi-cuantitativo de un metabolito.

Más aún, determinar como se utiliza en el método de acuerdo con la presente invención, preferiblemente, incluye utilizar una etapa de separación de compuesto antes de la etapa de análisis referida anteriormente. Preferiblemente, dicha etapa de separación de compuesto produce una separación resuelta una vez de los metabolitos comprendidos por la muestra. Técnicas adecuadas para la separación que se utilizan preferiblemente de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, incluyen todas las técnicas de separación cromatográfica tales como cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), cromatografía de gas (GC), cromatografía de capa delgada, cromatografía de gas o exclusión de tamaño. Estas técnicas son bien conocidas en el arte y pueden ser aplicadas por la persona experta en la técnica sin más. Más preferiblemente, LC y/o GC son técnicas cromatográficas que se prevén mediante el método de la presente invención. Los dispositivos adecuados para tal determinación de metabolitos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, se utiliza espectrometría de masa en particular espectrometría de masa- cromatografía de gas (GC-MS), espectrometría de masa- cromatografía líquida (LC-MS), espectrometría de masa de directa o espectrometría de masa de resonancia de ciclotrones iónicos por transformada de Fourier (FT-ICR-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masa (CE-MS), espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC-MS), espectrometría de masa cuadrupolo, cualquier espectrometría de masa acoplada secuencialmente, tal como MS-MS o MS-MS-MS, espectrometría de masa de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS), espectrometría de masa-pirólisis (Py-MS), espectrometría de masa-movilidad de ión o espectrometría de masa de tiempo de vuelo (TOF). Más preferiblemente, se utilizan LC-MS y/o GC-MS como se describe en detalle adelante. Dichas técnicas se describen en, por ejemplo, Nissen, Journal of Chromatography A, 703, 1995: 37-57, US 4,540,884 o US 5,397,894, el contenido de la descripción por lo tanto se incorpora como referencia. Como una alternativa o en adición a las técnicas de espectrometría de masa, se pueden utilizar las siguientes técnicas para la determinación del compuesto: resonancia magnética nuclear (NMR), formación de imagen por resonancia magnética (MRI), análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia ultra violeta (UV), índice de refracción (RI), detección fluorescente, detección radioquímica, detección electroquímica, dispersión de la luz (LS), espectroscopia de Raman dispersa o detección por ionización de llama (FID). Estas técnicas son bien conocidas por la persona experta en el arte y se pueden aplicar sin más. El método de la presente invención será, preferiblemente, asistido por automatización. Por ejemplo, se puede automatizar el procesamiento de o pre-tratamiento por la robótica. El procesamiento de datos y la comparación, preferiblemente, se asiste por bases de datos y programas para computador adecuados. La automatización como se describe arriba permite utilizar el método de la presente invención en métodos de alto rendimiento.

Más aún, también se pueden determinar los metabolitos mediante un ensayo químico o biológico específico. Dicho ensayo comprenderá medios que permiten detectar específicamente por lo menos un metabolito en la muestra. Preferiblemente, dichos medios son capaces de reconocer específicamente la estructura química del metabolito o son capaces de identificar específicamente el metabolito con base en su capacidad para reaccionar con otros compuestos o su capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador). Los medios que son capaces de reconocer específicamente la estructura química de un metabolito son, preferiblemente, anticuerpos u otras proteínas que interactúan específicamente con las estructura químicas, tales como receptores o enzimas. Los anticuerpos específicos, por ejemplo, se pueden obtener utilizando el metabolito como antígeno mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos como se refiere aquí incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como también fragmentos de los mismos, tal como fragmentos

Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unir el antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos humanizados en donde las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que exhibe una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Más aún, se abarcan anticuerpos de cadena sencilla. Las secuencias donantes incluirán usualmente por lo menos los residuos de aminoácidos que unen antígenos del donante pero pueden comprender otros residuos de aminoácidos estructural y/o funcionalmente importantes del anticuerpo donante también. Tales híbridos se pueden preparar mediante varios métodos bien conocidos en la técnica. Las proteínas adecuadas que son capaces de reconocer específicamente el metabolito son, preferiblemente, las enzimas que están involucradas en la conversión metabólica del dicho metabolito. Dichas enzimas pueden utilizar el metabolito como un sustrato o pueden convertir un sustrato en el metabolito. Más aún, se pueden utilizar dichos anticuerpos como una base para generar oligopéptidos que reconocen específicamente el metabolito. Estos oligopéptidos, por ejemplo, comprenderán los dominios que unen enzima o bolsillos para el dicho metabolito. Los ensayos basados en anticuerpo y/o enzima adecuados pueden ser RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), pruebas inmunes de enzima intercaladas, inmunoensayos intercalados electroquimioluminiscentes (ECLIA), ensayo inmunofluorométrico con lantánidos mejorado por disociación (DELFLIA) o pruebas inmunes de fase sólida. Más aún, también se puede identificar el metabolito con base en su capacidad para reaccionar con otros compuestos, es decir mediante una reacción química específica. Se pueden utilizar las reacciones adecuadas que son bien conocidas en la técnica y, preferiblemente abarcan reacciones enzimáticas (por ejemplo para manosa Pitkanen E, Pitkanen O, Uotila L.; Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997 Oct;35(10):761-6; o ácido ascórbico Winnie Lee, Susan M. Roberts y Robert F. Labbe; Clinical Chemistry 43: 154-157, 1997), métodos espectrofotométricos enzimáticos (BN La Du, RR Howell, PJ Michael y EK Sober; Pediatrics, Jan 1963, 39-46, Vol 31, No. 1), métodos espectrofluorimétricos (Sumi T, Umeda Y, Kishi Y, Takahashi K, Kakimoto F.; Clin Chim Acta. 1976 Dec 1;73(2):233-9) y fluorescencia; quimioluminiscencia (J.J. Thiele, H.J. Freisleben, J. Fuchs y F.R. Ochsendorf; Human Reproduction, Vol. 10, No. 1, pp. 110-115, 1995). Los métodos de detección tales como electroforesis capilar (Hubert A. Carchon y Jaak Jaeken; Clinical Chemistry 47: 1319-1321, 2001) y métodos colorimétricos (Kyaw A; Clin Chim Acta. 1978 Jun; 86(2):153-7). Adicionalmente, se puede determinar el metabolito en una muestra debido a su capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico. La respuesta biológica se detectará como la lectura que indica la presencia y/o la cantidad de los metabolitos comprendidos por la muestra. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la inducción de expresión génica o una respuesta fenotípica de una célula o un organismo.

Adicionalmente, se debe entender que dependiendo de la técnica utilizada para determinar los dichos metabolitos, el analito que será detectado puede ser un derivado del metabolito que ocurre fisiológicamente, es decir el metabolito presente dentro de un sujeto. Se pueden generar tales analitos como un resultado de la preparación de muestra o medios de detección. Los compuestos referidos aquí se consideran que son analitos. Sin embargo, como se estableció anteriormente, estos analitos representarán los metabolitos en una manera cualitativa y cuantitativa. Más aún, se debe entender que para una pluralidad de metabolitos, el metabolito será idéntico al analito.

El término "referencia" se refiere a resultados, es decir los datos de rasgos característicos de los metabolitos, que se pueden correlacionar con una predisposición para la diabetes tipo 2. Se obtienen resultados de referencia a partir de una muestra de un sujeto que se sabe tiene predisposición para la diabetes tipo 2. Se pueden obtener los resultados de referencia al aplicar el método de la presente invención. Alternativamente, se pueden obtener los resultados de referencia a partir de un sujeto que se sabe que no tiene una predisposición para la diabetes tipo 2, es decir que no desarrollará dicha diabetes en el futuro, y, más preferiblemente, otras enfermedades también. Más aún, la referencia, también preferiblemente, puede ser una referencia calculada, más preferiblemente el promedio o mediana, para la cantidad relativa o absoluta de un metabolito de una población de individuos (que comprenden el sujeto que se investiga). Se pueden determinar las cantidades relativas o absolutas de los metabolitos de dichos individuos de la población como se especifica en otro lugar aquí. Se conoce bien en la técnica cómo calcular un valor de referencia adecuado, preferiblemente, el promedio o mediana. La población de sujetos referida arriba comprenderá una pluralidad de sujetos, preferiblemente, por lo menos 5, 10, 50, 100, 1,000 o 10,000 sujetos. Se debe entender que el sujeto que se diagnostica mediante el método de la presente invención y los sujetos de la dicha pluralidad de sujetos son de la misma especie.

Más preferiblemente, los resultados de referencia, es decir los valores para por lo menos uno de los rasgos característicos de los metabolitos, se almacenarán en un medio de almacenamiento de datos adecuado tal como una base de datos y están, así, también disponibles para diagnósticos futuros. Esto también permite diagnosticar eficientemente la predisposición para una enfermedad porque se puede identificar la referencia adecuada en las bases de datos una vez que se ha confirmado (en el futuro) que el sujeto del que se obtiene la muestra de referencia correspondiente (de hecho) desarrolla diabetes. Los resultados de referencia preferidos que se asocian con la diabetes o la predisposición a la misma en humanos son aquellos mostrados en las Tablas de los Ejemplos acompañantes.

El término "comparar" se refiere a evaluar si los resultados de la determinación descrita anteriormente en detalle, es decir los resultados de la determinación cualitativa o cuantitativa de los metabolitos, son idénticos a los resultados de referencia o difieren de los mismos.



En el caso de los resultados de referencia que se obtienen de un sujeto que se sabe tiene una predisposición a la diabetes tipo 2, se puede diagnosticar la dicha predisposición con base en el grado de identidad entre los resultados de prueba obtenidos a partir de la muestra de prueba y los resultados de referencia mencionados anteriormente, es decir con base en una composición cualitativa o cuantitativa con respecto a los metabolitos. Los resultados de la muestra de prueba y los resultados de referencia son idénticos, si los valores para los rasgos característicos y, en el caso de determinación cuantitativa, los valores de intensidad son idénticos. Dichos resultados son similares, si los valores de los rasgos característicos son idénticos pero los valores de intensidad son diferentes. Tal una diferencia es, preferiblemente, no significativa y se caracterizará porque los valores para la intensidad están dentro de por lo menos el intervalo entre el 1<sup>ro</sup> y 99<sup>avo</sup> percentil, 5<sup>avo</sup> y 95<sup>avo</sup> percentil, 10<sup>avo</sup> y 90<sup>avo</sup> percentil, 20<sup>avo</sup> y 80<sup>avo</sup> percentil, 30<sup>avo</sup> y 70<sup>avo</sup> percentil, 40<sup>avo</sup> y 60<sup>avo</sup> percentil del valor de referencia el 50<sup>avo</sup>, 60<sup>avo</sup>, 70<sup>avo</sup>, 80<sup>avo</sup>, 90<sup>avo</sup> o 95<sup>avo</sup> percentil del valor de referencia.

En el caso de los resultados de referencia que se obtienen de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe tienen una predisposición a la diabetes tipo 2, se puede diagnosticar la dicha predisposición con base en las diferencias entre los resultados de prueba obtenidos de la muestra de prueba y los resultados de referencia mencionados anteriormente, es decir las diferencias en la composición cualitativa o cuantitativa con respecto a por lo menos un metabolito. La muestra aplica si se utiliza una referencia calculada como se especificó anteriormente. La diferencia puede ser un aumento en la cantidad absoluta o relativa de un metabolito (algunas veces referido como regulación por aumento del metabolito; ver también los Ejemplos) o una disminución en cualquiera de dichas cantidades o la ausencia de una cantidad detectable del metabolito (algunas veces referido como regulación por aumento del metabolito; ver también los Ejemplos). Preferiblemente, la diferencia en la cantidad relativa o absoluta es significativa, es decir fuera del intervalo entre 45<sup>avo</sup> y 55<sup>avo</sup> percentil, 40<sup>avo</sup> y 60<sup>avo</sup> percentil, 30<sup>avo</sup> y 70<sup>avo</sup> percentil, 20<sup>avo</sup> y 80<sup>avo</sup> percentil, 10<sup>avo</sup> y 90<sup>avo</sup> percentil, 5<sup>avo</sup> y 95<sup>avo</sup> percentil, 1<sup>ro</sup> y 99<sup>avo</sup> percentil del valor de referencia. Para los metabolitos específicos referidos en esta especificación en otro lugar, los valores preferidos para los cambios en las cantidades relativas (es decir "veces" de cambios) o la clase de cambio (es decir regulación "por aumento" o "disminución" que resulta en una mayor o menor cantidad relativa y/o absoluta) se indican en las Tablas acompañantes, adelante. Si se indica en dichas tablas que un metabolito dado es "regulado por aumento" en un sujeto, se incrementará la cantidad relativa y/o absoluta, si es "regulado por disminución", se reducirá la cantidad relativa y/o absoluta del metabolito. Más aún, las "veces" de cambio indica el grado de aumento o disminución, por ejemplo, un aumento de 2 veces significa que la cantidad es dos veces la cantidad del metabolito comparada con aquella de la referencia.

Así, el método de la presente invención en una realización incluye una referencia que se deriva de un sujeto o un grupo que se conoce tiene predisposición para la diabetes tipo 2. Los resultados idénticos para la muestra de prueba y la dicha referencia (es decir cantidades relativas o absolutas similares de los metabolitos) son indicadoras de una predisposición a la diabetes tipo 2 en ese caso. En otra realización del método de la presente invención, la referencia se deriva de un sujeto o un grupo que se sabe no tiene predisposición para la diabetes tipo 2 o es una referencia calculada. La ausencia de los metabolitos o una cantidad que, preferiblemente significativamente, difiere en la muestra de prueba en comparación con la muestra de referencia (es decir se observa una diferencia significativa en la cantidad absoluta o relativa) es indicadora de una predisposición a la diabetes tipo 2 en tal un caso.

La comparación, preferiblemente, se asiste mediante automatización. Por ejemplo, se puede utilizar un programa de computador adecuado que comprende algoritmo para la comparación de dos conjuntos de datos diferentes (por ejemplo, conjuntos de datos que comprenden los valores del rasgo característico (s)). Tales programas de computador y algoritmos son bien conocidos en la técnica. A pesar de todo lo anterior, también se puede llevar a cabo una comparación manualmente.

Se pueden implementar los métodos anteriormente mencionados para la determinación de los metabolitos en un dispositivo. Un dispositivo como se utiliza comprenderá por lo menos los medios anteriormente mencionados. Más aún, el dispositivo, preferiblemente, comprende adicionalmente medios para la comparación y evaluación de los rasgos característicos detectados de por lo menos un metabolito y, también preferiblemente, la intensidad de señal determinada. Los medios del dispositivo, preferiblemente, se ligan operativamente a cada uno. Cómo ligar los medios en una forma de operación dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican los medios para determinar cualitativa o cuantitativamente de forma automática el metabolito, los datos obtenidos mediante dichos medios que operan automáticamente se pueden procesar mediante, por ejemplo, un programa de computador con el fin de facilitar el diagnóstico. Preferiblemente, los medios están comprendidos mediante un único dispositivo en tal un caso. Dicho dispositivo pueden de acuerdo con lo anterior incluir una unidad de análisis para los metabolitos y una unidad de computador para el procesamiento de los datos resultantes para el diagnóstico. Alternativamente, cuando se utilizan medios tales como bandas de prueba para determinar los metabolitos, los medios para diagnosticar pueden comprender bandas de control o tablas que asignan los datos de resultados determinados para los datos de resultados conocidos para estar acompañados con una predisposición a la diabetes o aquellos que son indicadores para un sujeto sin tal una predisposición como se discutió anteriormente. Los dispositivos preferidos son aquellos que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un médico

especializado, por ejemplo, bandas de prueba o dispositivos electrónicos que solamente requieren cargar con una muestra.

Alternativamente, se pueden implementar los métodos para la determinación de los metabolitos en un sistema que comprende varios dispositivos que, preferiblemente, se ligan operablemente con cada uno. Específicamente, los medios se deben ligar en una manera que permita llevar a cabo el método de la presente invención como se describió en detalle anteriormente. Por lo tanto, ligar operativamente, como se utiliza aquí, preferiblemente, significa ligar funcionalmente. Dependiendo de los medios que se utilizan para el sistema de la presente invención, dichos medios se pueden ligar funcionalmente al conectar cada medio con el otro mediante medios que permiten el transporte de datos entre dichos medios, por ejemplo, cables de fibra de vidrio, y otros cables para transporte de datos de alto rendimiento. No obstante, la transferencia de datos inalámbrica entre los medios también se prevé por la presente invención, por ejemplo, a través de LAN (LAN Inalámbrica, W-LAN). Un sistema preferido comprende medios para determinar metabolitos. Los medios para determinar metabolitos, como se utiliza, abarca medios para separar los metabolitos, tales como dispositivos cromatográficos, y medios para determinación de metabolito, tal como espectrometría de dispositivos de masa. Se han descrito dispositivos adecuados en detalle anteriormente. Los medios preferidos para la separación de compuesto que se utilizan en el sistema de la presente invención incluyen dispositivos cromatográficos, más preferiblemente dispositivos para cromatografía líquida, HPLC, y/o cromatografía de gas. Los dispositivos preferidos para la determinación de compuesto comprenden espectrometría de dispositivos de masa, más preferiblemente, GC-MS, LC-MS, espectrometría de masa de infusión directa, FT-ICR-MS, CE-MS, HPLC-MS, espectrometría de masa cuadrupolo, espectrometría de masa acoplada secuencialmente (que incluye MS-MS o MS-MS-MS), ICP-MS, Py-MS o TOF. Los medios de separación y determinación están, preferiblemente, acoplados uno con el otro. Más preferiblemente, se utiliza LC-MS y/o GC-MS en el sistema de la presente invención como se describe en detalle en algún lugar en la especificación. Adicionalmente se comprenderán medios para comparar y/o analizar los resultados obtenidos a partir de los medios para determinación de metabolitos. Los medios para comparar y/o analizar los resultados pueden comprender por lo menos unas bases de datos y un programa de computador implementado para comparación de resultados. Las realizaciones preferidas de los sistemas y dispositivos mencionados anteriormente también se describen en detalle adelante.

De forma ventajosa, se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que los metabolitos anteriormente mencionados serán un biomarcador adecuado para una predisposición a la diabetes tipo 2. La aplicación de estos metabolitos como biomarcadores permite un diagnóstico rápido, confiable y efectivo en costos de una predisposición a la diabetes tipo 2. Más aún, el método puede ser asistido mediante automatización como se describe en algún lugar en esta descripción y, así, permite detección de alto rendimiento para sujetos que están en riesgo de sufrir de diabetes tipo 2. Por lo tanto, el método de la presente invención puede apoyar programas de salud para la prevención de diabetes y se pueden utilizar para monitorear el éxito de las terapias preventivas para la diabetes u otras medidas para la prevención de diabetes que incluyen dietas nutricionales. Más aún, se pueden determinar los metabolitos o combinaciones de metabolitos referidos aquí de forma simultánea en una forma efectiva en tiempo y costo mediante las técnicas de perfiles metabólicos descritas en esta especificación. Adicionalmente, el método de la presente invención permite evaluar el riesgo para un sujeto de ser o de llegar a ser un miembro de un cierto grupo de riesgo de diabetes, es decir IFG, IGT o IFG&IGT. La prevalencia reportada del IFG y IGT varía ampliamente entre 5 y 26 % dependiendo de la distribución del grupo étnico, edad y sexo. Se espera que ambos grupos de riesgos, IFG y IGT aumenten en el futuro cercano. Para ambos, grupos de riesgo IFG o IGT, un 25% del progreso que incide en la diabetes se reporta dentro de 3-5 años, con el 50% restante en su estado glucémico anormal y 25% que se revierte a niveles de glucosa normales. Con más tiempo de observación, la mayoría de los individuos con IFG o IGT aparecen por desarrollar diabetes. Los individuos con ambos IFG y IGT (IFG&IGT) tienen aproximadamente el doble del índice para desarrollar diabetes comparado con sujetos que tienen ya sea IFG o IGT (Nathan 2007, Diabetes Care 30(3): 753-759).

Las explicaciones e interpretaciones de los términos hechas anteriormente aplican de acuerdo con lo anterior a las otras realizaciones específicas aquí adelante.

En una realización preferida del método de la presente invención dicho por lo menos un metabolito se selecciona del grupo que consiste de: diacilglicérido (C18:1,C18:2) y triacilglicérido (C16:0,C18:2,C18:2).

Adicionalmente, se ha encontrado en el estudio subyacente en la presente invención que los metabolitos de los grupos anteriormente mencionados son particularmente bien adecuados como biomarcadores para una predisposición a la diabetes tipo 2 en individuos machos. De acuerdo con lo anterior, el sujeto que se diagnostica de acuerdo con la presente invención está en el contexto con la realización anteriormente mencionada, más preferiblemente un sujeto hembra.

Como se describió anteriormente, en una realización preferida del método de la presente invención, dicha determinación de por lo menos un metabolito comprende espectrometría de masa (MS). La espectrometría de masa como se utiliza abarca todas las técnicas que se permiten para la determinación del peso molecular (es decir la masa) o una variable de masa que corresponde a un compuesto, es decir un metabolito, que se determina de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la espectrometría de masa como se utiliza aquí se relaciona con

GC-MS, LC-MS, espectrometría de masa de infusión directa, FT-ICR-MS, CE-MS, HPLC-MS, espectrometría de masa cuadrupolo, cualquier espectrometría de masa acoplada secuencialmente tal como MS-MS o MS-MS-MS, ICP-MS, Py-MS, TOF o cualesquier métodos combinados utilizando las técnicas anteriormente mencionadas. Cómo aplicar estas técnicas es bien conocido por la persona experta en la técnica. Más aún, los dispositivos adecuados están comercialmente disponibles. Más preferiblemente, la espectrometría de masa como se utiliza aquí se relaciona con LC-MS y/o GC-MS, es decir con la espectrometría de masa que se liga operativamente a una etapa de separación cromatográfica. Más preferiblemente, la espectrometría de masa como se utiliza abarca MS cuadrupolo. Más preferiblemente, dicho cuadrupolo MS se lleva a cabo como sigue: a) selección de un cociente de masa/carga (m/z) de un ión creado mediante ionización en un primer cuadrupolo analítico del espectrómetro de masa, b) fragmentación del ión seleccionada en la etapa a) al aplicar un voltaje de aceleración en un cuadrupolo posterior adicional que está lleno con un gas de colisión y actúa como una cámara de colisión, selección de un cociente de masa/carga de un ión creado mediante el proceso de fragmentación en la etapa b) en un cuadrupolo posterior adicional, por lo cual las etapas a) a c) del método se llevan a cabo por lo menos una vez y el análisis del cociente de masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias como un resultado del proceso de ionización, por lo cual el cuadrupolo se carga con gas de colisión pero no se aplica voltaje de aceleración durante el análisis. Se pueden encontrar los detalles de dicha espectrometría de masa más preferida que se utiliza de acuerdo con la presente invención en la WO 03/073464.

Más preferiblemente, dicha espectrometría de masa es MS- cromatografía líquida (LC) y/o MS- cromatografía de gas (GC). La cromatografía líquida como se utiliza aquí se refiere a todas las técnicas que permiten la separación de compuestos (es decir metabolitos) en fase líquida o supercrítica. La cromatografía líquida se caracteriza porque los compuestos en una fase móvil se pasan a través de la fase estacionaria. Cuando los compuestos pasan a través de la fase estacionaria en diferentes índices ellos se llegan a separar con el tiempo debido a que cada compuesto individual tiene su tiempo de retención específico (es decir el tiempo que es requerido por el compuesto para pasar a través del sistema). La cromatografía líquida como se utiliza también incluye HPLC. Los dispositivos para cromatografía líquida están disponibles comercialmente, por ejemplo de Agilent Technologies, USA. La cromatografía de gas como se aplica de acuerdo con la presente invención, en principio, opera comparable con cromatografía líquida. Sin embargo, en lugar de tener los compuestos (es decir metabolitos) en una fase móvil líquida que se pasa a través de la fase estacionaria, los compuestos se presentarán en un volumen gaseoso. Los compuestos pasan la columna que puede contener materiales de soporte sólido como fase estacionario o las paredes las cuales pueden servir como o se recubren con la fase estacionaria. De nuevo, cada compuesto tiene un tiempo específico que se requiere para pasar a través de la columna. Más aún, en el caso de la cromatografía de gas se prevé preferiblemente que los compuestos se derivan antes de la cromatografía de gas. Las técnicas adecuadas para la derivación son bien conocidas en la técnica. Preferiblemente, la derivación de acuerdo con la presente invención se relaciona con metoximación y trimetilsililación de, preferiblemente, compuestos polares y transmetilación, metoximación y trimetilsililación de, preferiblemente, (es decir lipófilo) compuestos no polares.

Adicionalmente, la presente invención se relaciona con una composición diagnóstica que consiste de criptoxantina, ácido 2-hidroxi-palmitico, triacilglicérido (C16:0, C18:1, C18:2), ácido gondoico, ácido tricosanoico, y 5-oxoprolina.

Los metabolitos servirán como un biomarcador, es decir una molécula indicadora de una condición de riesgo en el sujeto, es decir la predisposición de diabetes. Así, las moléculas de metabolito en sí mismas pueden servir como las composiciones diagnósticas, preferiblemente, luego de visualización o detección mediante los medios referidos aquí. Así, una composición diagnóstica que indica la presencia de un metabolito de acuerdo con la presente invención también puede comprender el dicho biomarcador físicamente, por ejemplo, un complejo de un anticuerpo y el metabolito que se detecta puede servir como la composición diagnóstica. De acuerdo con lo anterior, la composición diagnóstica puede comprender adicionalmente medios para detección de los metabolitos como se especifica en algún lugar en esta descripción. Alternativamente, si se utilizan medios de detección tales como técnicas basadas en MS o NMR, las especies moleculares que sirven como un indicador para la condición de riesgo serán los metabolitos comprendidos por la muestra de prueba a ser investigada. Así, los metabolitos referidos de acuerdo con la presente invención servirán en sí mismos como una composición de diagnóstico debido a su identificación como un biomarcador.

Finalmente, la presente invención se relaciona con el uso de los dichos metabolitos para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 como se especifica en la reivindicación 9.

La invención ahora se ilustrará mediante los siguientes Ejemplos que no están destinados a restringir o limitar el alcance de esta invención.

#### **Ejemplo 1:** Determinación de metabolitos.

Se informan a los voluntarios acerca de los exámenes planeados. Se aprueba el protocolo experimental por el Dife (German Institute for Human Nutrition) Institutional Review Board, y todos los sujetos dan el consentimiento informado por escrito. Después se miden los valores antropométricos y el espesor promedio de la íntima. Luego de estos exámenes se desarrolla una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) con 75 g de glucosa. Las muestras

de sangre se toman en 0, 30, 60 y 120 minutos. Se clasifican los voluntarios por los criterios de la WHO y ADA. Se obtiene el plasma de sangre completo mediante la adición de EDTA como anticoagulante y posterior centrifugación.

Se preparan las muestras y se someten a análisis LCMS y GCMS como se describe en lo siguiente:

5 Las muestras se preparan de la siguiente forma: Se separan las proteínas mediante precipitación de plasma de sangre. Después de la adición de agua y una mezcla de etanol y diclorometano se fracciona la muestra restante en una fase acuosa, polar y una fase orgánica, lipófila.

10 Para la trans- metanólisis de los extractos lípidos se agrega una mezcla de 140 µl de cloroformo, 37 µl de ácido clorhídrico (37% en peso de HCl en agua), 320 µl de metanol y 20 µl de tolueno al extracto evaporado. Se sella el vaso herméticamente y se calienta durante 2 horas a 100° C, con agitación. La solución se evapora posteriormente hasta secado. El residuo se seca completamente.

15 La metoximación de los grupos carbonilo se lleva a cabo mediante reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 100 µl durante 1.5 horas a 60° C) en un recipiente sellado herméticamente. Se agregan 20 µl de una solución de ácidos grasos de cadena recta, impares (la solución de cada 0.3 mg/mL de ácidos grasos de 7 a 25 átomos de carbono y cada 0.6 mg/mL de ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) piridina/tolueno) como estándares de tiempo. Finalmente, la derivación con 100 µl de N-metil-N-(trimetilsilil) -2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) se lleva a cabo durante 30 minutos a 60° C, de nuevo en el recipiente sellado herméticamente. El volumen final antes de la inyección de GC es 220 µl.

20 Para la fase polar la derivación se desarrolla en la siguiente forma: La metoximación de los grupos carbonilo se lleva a cabo mediante reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 50 µl durante 1.5 horas a 60° C) en un recipiente sellado herméticamente. 10 µl de una solución de ácidos grasos de cadena recta, impares (la solución de cada 0.3 mg/mL de ácidos grasos de 7 a 25 átomos de carbono y cada 0.6 mg/mL de ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) piridina/tolueno) se agregan como estándares de tiempo. Finalmente, la derivación con 50 µl de N-metil-N-(trimetilsilil) -2,2,2- trifluoroacetamida (MSTFA) se lleva a cabo durante 30 minutos a 60° C, de nuevo en el recipiente sellado herméticamente. El volumen final antes de la inyección de GC es 110 µl.

25 Los sistemas GC-MS consisten de un Agilent 6890 GC acoplado a un Agilent 5973 MSD. Las automuestras son CompiPal o GCPal de CTC.

30 Para el análisis de las columnas de separación capilar comerciales usuales (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) con diferentes fases estacionarias se utiliza poli-metil-siloxano que contienen 0 % hasta 35% de grupos funcionales aromáticos, dependiendo de los materiales de muestra analizados y fracciones de la etapa de separación de fase (por ejemplo: DB-1ms, HP-5ms, DB-XLB, DB-35ms, Agilent Technologies). Se inyecta hasta 1 µL del volumen final sin división y se inicia el programa de temperatura en el horno a 70° C y se finaliza a 340° C con índices de calor diferentes dependiendo del material de muestra y fracción de la fase de etapa de separación con el fin de alcanzar una separación cromatográfica suficiente y número de análisis dentro de cada pico del analito. Adicionalmente se utiliza el RTL (Aseguramiento de Tiempo de Retención, Agilent Technologies) para el análisis y las condiciones estándar GC-MS usuales, por ejemplo el flujo constante con nominal 1 a 1.7 ml/min. y helio como el gas de fase móvil, se hace ionización por impacto de electrón con 70 eV, detección con un rango de m/z de 15 a 600 con índices de análisis de 2.5 a 3 lecturas/seg y condiciones de tono estándar.

35 Los sistemas HPLC-MS consisten de un sistema Agilent 1100 LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplados con un espectrómetro API 4000 Mass (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Canadá). Se desarrolla análisis HPLC sobre columnas de separación de fase inversa disponibles comercialmente con fases estacionarias C18 (por ejemplo: GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18). Hasta 10 µL del volumen de muestra final se inyecta y se desarrolla separación con elusión de gradiente utilizando los gradientes metanol/ agua/ácido fórmico o acetonitrilo/agua/ácido fórmico en un índice de flujo de 200 µL/min. La espectrometría de masa se lleva a cabo mediante ionización por electrorociado en el modo positivo para la fracción no polar y el modo negativo para la fracción polar utilizando un modo que monitorea la reacción múltiple -(MRM) y análisis completo de 100 -1000 amu.

### Ejemplo 2: Evaluación de Datos

50 Las mediciones GC- y LC-MS de todas las muestras de plasma en sangre de sujetos en riesgo (sujetos con alto riesgo de desarrollar diabetes; ya sea "IFG" sujetos sin diabetes con IFG positivo, "IGT" sujetos sin diabetes con IGT positivo, o "IFG&IGT" sujetos sin diabetes con IFG y IGT positivos) y los sujetos de control se conducen junto con referencias de plasma agrupadas. Para cada tanda de medición, se calculan las relaciones de señal relativas de los individuos.

Se determinan metabolitos específicos a riesgo mediante modelamiento lineal de las relaciones de señal de metabolito mediante el factor de riesgo terciario (niveles: IFG,IGT,IFG&IGT) que corrigen para factores que

5 confunden la edad y BMI (índice de masa corporal) y que también se incorporan los dos diferentes géneros: primero se genera un modelo lineal con los factores que se acaban de mencionar, segundo se evalúan los efectos estimados mediante estadísticas t, tercero se seleccionan solo los metabolitos con valor p estadístico  $t < 0.05$  con referencia a los niveles de factor de riesgo y las interacciones entre género y niveles de factor de riesgo. Adicionalmente, se determina el tipo de regulación para cada metabolito como “ascendente” para relaciones incrementadas  $>1$  del nivel de riesgo respectivo versus el control y “descendente” para relaciones reducidas  $<1$  del nivel de riesgo versus control.

10 En las siguientes Tablas 1 a 5, se presentan los resultados de la evaluación de datos. Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados para los metabolitos que todavía no se han reportado para los pacientes de diabetes. Los metabolitos referidos en las Tablas 3 a 5 se han descrito ya para pacientes con diabetes. Las Tablas 1 y 3 enumeran metabolitos significativos con respecto al “riesgo” efecto principal, que especifica los niveles de factores significativos respectivos IFG, IGT, y IFG&IGT (estadísticas t). Las tablas 2, 4 y 5 enumeran metabolitos significativos con respecto a la interacción del riesgo y el género, es decir, los metabolitos muestran regulación diferencial específica a sexo entre los controles y los sujetos en riesgo. Los resultados presentados en las Tablas se clasifican de acuerdo con su potencial y eficacia como biomarcadores para la diabetes o una predisposición a la misma. También se indica la clase de regulación observada. “Aumento” se refiere a un incremento en la cantidad absoluta o relativa del metabolito, mientras que “disminución” se refiere a un descenso en dicha cantidad absoluta o relativa o aún la ausencia del metabolito en cantidades detectables. Los metabolitos que se asocian particular y fuertemente con diabetes se subdividen en los grupos indicados por las líneas divisorias en las Tablas. Más aún, el grupo de riesgo se indica en las Tablas, es decir IFG, IGT o IFG&IGT.

25 Tabla 1: Resultados generales. Los metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de riesgo para la Diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT y IFG&IGT) y controles (“riesgo” efecto principal significativo, es decir el mismo tipo de regulación (“por aumento”, “por disminución”) en machos y hembras.). Metabolitos ordenados por el valor p. [IFG = alteración de la glucosa en ayuno; IGT = Tolerancia deteriorada de la glucosa; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG y IGT]

Tolerancia; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG y IGT]

metabolito	regulación	grupo de riesgo
criptoxantina	disminución	IGT
ácido 2-hidroxi- palmítico	aumento	IFG
triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18: 2)	aumento	IGT
ácido gondoico	aumento	IGT
ácido tricosanoico	disminución	IFG&IGT
5-Oxoprolina	aumento	IFG

30 Tabla 2: Metabolitos que difieren específicamente entre los controles machos y los pacientes hembra de los grupos de riesgo para Diabetes. Los metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la interacción riesgo-género, es decir se regula de forma diferente en machos y hembras con respecto al riesgo para Diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT y IFG&IGT) y controles. Los metabolitos ordenados por valor p. [IFG = alteración de la glucosa en ayuno; IGT = Tolerancia deteriorada de la glucosa; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG y IGT]

metabolito	reg_macho	grupo de riesgo
diacilglicérido (C18:1,C18:2)	disminución	IGT
triacilglicérido (C16:0,C18:2.C18: 2)	disminución	IGT
triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18: 2)	disminución	IFG

Tabla 3: Resultados generales. Los metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de riesgo para Diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT y IFG&IGT) y controles ("riesgo" efecto principal significativo", es decir el mismo tipo de regulación ("por aumento", "por disminución") en machos y hembras.). Los metabolitos ordenados por valor p. [IFG = alteración de la glucosa en ayuno; IGT = Tolerancia deteriorada de la glucosa; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG y IGT]

5

metabolito	regulación	grupo de riesgo
lactato	aumento	IFG
ácido alfa-cetoisocaproico	disminución	IGT
glucosa	aumento	IFG&IGT
metionina	disminución	IGT
manosa	aumento	IFG&IGT
ácido 3-hidroxiбутírico	aumento	IGT
leucina	aumento	IGT
ácido úrico	aumento	IFG
ácido treónico	aumento	IFG
beta-caroteno	disminución	IFG&IGT
ácido ascórbico	aumento	IFG&IGT
glicina	disminución	IGT
triacilglicéridos	disminución	IFG
lactato	aumento	IGT
fosfolípidos	aumento	IGT
creatinina	disminución	IGT
glutamato	aumento	IFG
ácido alfa-cetoisocaproico	disminución	IFG&IGT
triacilglicéridos	aumento	IGT
valina	aumento	IGT
malato	aumento	IFG
ácido alfa-cetoisocaproico	disminución	IFG
isoleucina	aumento	IGT
succinato	aumento	IFG
glucosa-1-fosfato	aumento	IFG&I
valina	aumento	IFG&I

metabolito	regulación	grupo de riesgo
ácido eicosapentaenoico (C20:cis [5,8,11,14,17]5)	disminución	IFG&IG
fosfolípidos	disminución	IFG
ácido úrico	aumento	IFG&I
citrato	aumento	IGT
aspargina	disminución	IFG&I
metionina	disminución	IFG
glutamina	disminución	IGT
ácido palmítico	aumento	IGT
triptofano	disminución	IFG&IG
alanina	aumento	IGT
glutamato	aumento	IGT
citrulina	disminución	IGT
colestenol	disminución	IFG&I
treonina	disminución	IGT
ornitina	aumento	IFG
arginina	disminución	IGT
manosa	aumento	IFG
ácido 3-hidroxi-butírico	aumento	IFG&I
glutamina	disminución	IFG
sulfato de pregnenolona	aumento	IFG&I
ácido glicérico	aumento	IGT
folato	aumento	IFG
malato	aumento	IGT
beta-caroteno	disminución	IFG
leucina	aumento	IFG
glutamina	disminución	IFG&I
alfa- tocoferol	aumento	IFG&IG
mio- inositol	aumento	IFG

metabolito	regulación	grupo de riesgo
ácido esteárico	aumento	IGT
glicerol-3-fosfato	aumento	IFG
beta-caroteno	disminución	IGT

5 Tabla 4: Los metabolitos que difieren específicamente entre los controles machos y pacientes machos de los grupos de riesgo para Diabetes. Los metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la interacción riesgo- género, es decir regular en forma diferente en machos y hembras con respecto al riesgo para Diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT y IFG&IGT) y controles. Los metabolitos ordenados por valor p. [IFG = alteración de la glucosa en ayuno; IGT = Tolerancia deteriorada de la glucosa; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG y IGT]

metabolito	reg_macho	grupo de riesgo
triptofano	disminución	IGT
alanina	disminución	IFG
leucina	disminución	IGT
ácido palmítico	disminución	IFG
ácido eicosatrienoico	disminución	IGT
glicerofosfolípidos	disminución	IGT
isoleucina	disminución	IFG
ácido eicosatrienoico	disminución	IFG
triptofano	disminución	IFG
ácido lignocérico	disminución	IGT
ácido linoleico	disminución	IGT
serina	aumento	IFG
tirosina	disminución	IGT
ácido linoleico	disminución	IFG
sulfato de pregnenolona	Disminución	IGT
aspartato	Aumento	GT
ácido araquidónico	disminución	IGT
succinato	aumento	IFG&IGT

10 Tabla 5: Los metabolitos difieren específicamente entre los controles hembras y pacientes hembras de los grupos de riesgo para Diabetes. Los metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la interacción riesgo- género, se regulan en forma diferente en machos y hembras con respecto al riesgo para Diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT y IFG&IGT) y controles. Los metabolitos ordenados por valor p. [IFG = alteración de la glucosa en ayuno; IGT = Tolerancia deteriorada de la glucosa; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG y IGT]



## ES 2 358 454 T3

metabolito	reg_hembra	grupo de riesgo
alanina	aumento	IFG
ácido palmítico	aumento	IFG
isoleucina	aumento	IFG
ácido eicosatrienoico	aumento	IFG
ácido úrico	aumento	IFG
ácido esteárico	aumento	IFG
serina	disminución	IFG

## REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 que comprende:
  - (a) determinar metabolitos en una muestra de plasma, suero o sangre de prueba de un sujeto que se sospecha tiene una predisposición a la diabetes tipo 2, dichos metabolitos son criptoxantina, ácido 2-hidroxi-palmitico, triacilglicérido (C16: 0,C18:1,C18:2), ácido gondoico, ácido tricosanoico y 5-Oxoprolina; y
  - 5 (b) comparar los resultados de prueba de la determinación en la etapa (a) con una referencia, por lo cual se diagnostica una predisposición a la diabetes tipo 2, en donde
    - i) dicha referencia se deriva de un sujeto que se sabe tiene una predisposición a la diabetes tipo 2 y en donde los resultados idénticos para la muestra de prueba y la referencia son indicadores de una predisposición a la diabetes tipo 2, o
    - 10 ii) dicha referencia se deriva de un sujeto que se sabe no tiene predisposición para la diabetes tipo 2 o es una referencia calculada para los dichos metabolitos en una población de sujetos, y en donde las diferencias en las cantidades respectivas de cada uno de todos los seis metabolitos en la muestra de prueba en comparación con la muestra de referencia son indicadores de una predisposición a la diabetes tipo 2.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un macho.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha determinación comprende espectrometría de masa (MS).
  4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha espectrometría de masa es MS-cromatografía líquida (LC) y/o MS- cromatografía de gas (GC).
  5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho sujeto es un humano.
  - 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde por lo menos se determina un metabolito adicional seleccionado del grupo que consiste de:
    - (i) un ácido graso saturado de cadena larga, preferiblemente, ácido Lignocérico (C24:0), ácido Melísico (C30:0), o ácido tricosanoico (C23:0),
    - 25 (ii) un ácido graso poli- insaturado, preferiblemente, ácido Docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido Eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido Araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido Linoleico (C18:cis[9,12]2), o ácido Linolénico (C18:cis[9,12,15]3),
    - (iii) un aminoácido, preferiblemente, Lisina, Alanina, Treonina, Triptofano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina,
    - (iv) un antioxidante, preferiblemente, ácido Ascórbico, Coenzima Q10, o alfa-Tocoferol,
    - 30 (v) un metabolito del Ciclo de Ácido Cítrico, preferiblemente, Piruvato, Citrato, o Malato,
    - (vi) un metabolito del Ciclo de Urea, preferiblemente, Urea, Citrulina, Succinato, u Ornitina,
    - (vii) Manosa, ácido alfa-Cetioisocaproico, Glicerol, fracción de lípido, o ácido 3-Hidroxi-butírico, y
    - (viii) glucosa.
  7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde por lo menos se determina un metabolito adicional seleccionado del grupo que consiste de: ácido 3-hidroxi-butírico, alanina, ácido alfa-cetioisocaproico, alfa- tocoferol, arginina, ácido ascórbico, aspargina, beta-caroteno, colesteno, citrato, citrulina, creatinina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis [5,8,11,14,17]5), folato, glucosa, glucosa-1-fosfato, glutamato, glutamina, ácido glicérico, glicerol-3-fosfato, glicina, isoleucina, lactato, leucina, malato, manosa, metionina, mio- inositol, ornitina, ácido palmítico, fosfolípidos, sulfato de pregnenolona, ácido esteárico, succinato, ácido treónico, 40 treonina, triacilglicéridos, triptofano, ácido úrico, y valina.
  8. Una composición de diagnóstico que consiste de criptoxantina, ácido 2-hidroxi-palmitico, triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18: 2), ácido gondoico, ácido tricosanoico y 5-Oxoprolina.

9. Uso de criptoxantina, ácido 2-hidroxi-palmitico, triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18:2), ácido gondoico, ácido tricosanoico y 5-Oxoprolina medido en una muestra de sangre, plasma o suero para diagnosticar diabetes tipo 2 en un sujeto.