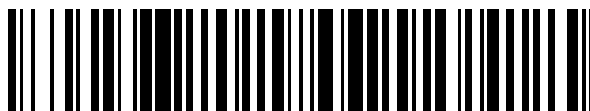


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 816**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2007 E 10196649 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2336782**

54 Título: **Procedimiento para predecir la diabetes de tipo II**

30 Prioridad:

07.09.2006 EP 06120273
24.03.2006 EP 06111705

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

18.11.2014

73 Titular/es:

METANOMICS GMBH (100.0%)
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/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 522 816 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

Procedimiento para predecir la diabetes de tipo II

La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una predisposición para la diabetes que comprende determinar al menos un metabolito en una muestra de ensayo de un sujeto que se sospecha que tiene una predisposición para la diabetes y comparar dicho al menos un metabolito con una referencia, de modo que se diagnosticará una predisposición para la diabetes. Además, la presente memoria descriptiva desvela un conjunto de metabolitos, un conjunto de datos que comprenden los valores característicos de los metabolitos y un medio de almacenamiento que comprende dicha conjunto de datos. Además, la presente memoria descriptiva también desvela un sistema que comprende medios para comparar los valores característicos de los metabolitos de una muestra ligados operativamente a un medio de almacenamiento de datos. Además, la presente memoria descriptiva desvela medios diagnósticos que comprenden al menos un metabolito y el uso de dicho al menos un metabolito para la fabricación de medios para diagnosticar una predisposición para la diabetes. Finalmente, la presente memoria descriptiva pertenece a un procedimiento para identificar metabolitos relacionados con la diabetes.

La prevalencia de la diabetes mellitus ha alcanzado aproximadamente el 6 % en el mundo industrializado y en el 2030 se incrementará hasta 366 millones de personas afectadas en todo el mundo. La razón más frecuente (tipo), (aproximadamente el 90 %) de la diabetes en el mundo está representado por la diabetes de tipo 2, que tiene una patogénesis multifactorial. La secuencia patológica de la diabetes de tipo 2 entraña numerosos elementos. Se cree que es preceptivo tener una predisposición genética que actualmente es poco conocida. Si el fenotipo diabético ocurre después, está influenciado por numerosos factores ambientales que comparten una habilidad para estresar el sistema de la homeostasis de la glucosa, bien causando o bien empeorando la resistencia a la insulina o alterando la secreción de la insulina. Por supuesto, numerosas hormonas participan en la regulación del metabolismo de la glucosa, pero la hormona clave es la insulina. La normoglucemia se mantiene por la interacción equilibrada entre la acción de la insulina y la secreción de la insulina. La insulina que se produce en las células β -pancreáticas es capaz de regular muy rápido a las distintas demandas de glucosa. El motivo principal de la diabetes de tipo 2 es un incremento de la resistencia a la insulina. Por lo tanto, la acción de la insulina normalmente disminuye, pero inicialmente el sistema es capaz de compensar esto por medio de un incremento de la función de las células- β . En este instante quizá se pueda medir solamente una alteración de la glucosa en ayunas o una alteración de la tolerancia a la glucosa en la PTGO (prueba de la tolerancia a la glucosa oral). Pero a lo largo del tiempo la célula se sobre estresará por el incremento de la resistencia a insulina y la toxicidad de la glucosa y se podría diagnosticar una diabetes de tipo 2.

Además de los problemas médicos directos por los niveles altos o bajos de glucosa en sangre, la principal carga médica y socioeconómica de la enfermedad está causada por las complicaciones asociadas. Las devastadoras complicaciones de la diabetes mellitus son en su mayoría enfermedades macrovasculares y microvasculares como la insuficiencia renal crónica, retinopatía, neuropatía periférica y autónoma, o infarto de miocardio. Por lo tanto, la morbilidad cardiovascular en pacientes con diabetes de tipo 2 es de dos a cuatro veces mayor que en personas no diabéticas (Stumvoll y col., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, Lancet 2005).

A la luz de este mecanismo, la terapia de la diabetes está basada actualmente en controlar los niveles de glucosa en sangre y reducir un nivel elevado de glucosa en sangre a un nivel normal por medio de la administración de insulina exógena. Para este fin, la insulina exógena se inyecta en la sangre. Como alternativa, los niveles de glucosa en la sangre pueden regularse con dietas nutricionales y con la exclusión de factores de riesgo en el estilo de vida, tales como tabaquismo, falta de ejercicio, niveles elevados de colesterol, y peso corporal inestable.

El comité de expertos de la ADA (American Diabetes Association) reconoció un grupo intermedio de sujetos cuyos niveles de glucosa, a pesar de no cumplir con los criterios para la diabetes, son no obstante demasiado altos para considerarlos normales. Este grupo se define por tener niveles de glucosa en plasma en ayunas (GPA) >100 mg/dl (5,6 mmol/l), pero <126 mg/dl (7,0 mmol/l) o valores a las 2 h de la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) de >140 mg/dl (7,8 mmol/l), pero <200 mg/dl (11,1 mmol/l). Por lo tanto las categorías de los valores de GPA son las siguientes:

- GPA <100 mg/dl (5,6 mmol/l) = glucosa normal en ayunas;
- GPA 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l) = GAA (glucosa alterada en ayunas);
- GPA >126 mg/dl (7,0 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico se debe confirmar, tal como se describe a continuación).

Las correspondientes categorías cuando se usa la PTGO son las siguientes:

- 2-h después de la carga de glucosa <140 mg/dl (7,8 mmol/l) = tolerancia a la glucosa normal.
- 2-h después de la carga de glucosa 140-199 mg/dl (7,8 -11,1 mmol/l) = TGA (tolerancia a glucosa alterada)
- 2-h después de la carga de glucosa >200 mg/dl (11,1 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico se

debe confirmar, tal como se describe a continuación).

Diagnóstico de la Diabetes mellitus de tipo 2:

1. Síntomas de diabetes más concentración casual de glucosa en plasma >200 mg/dl (11,1 mmol/l). Casual se define como cualquier hora del día independientemente del tiempo transcurrido desde la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia, y pérdida de peso inexplicable. Como alternativa: 2. GPA >126 mg/dl (7,0 mmol/l). En ayunas se define como sin ingesta calórica durante al menos 8 h. Como alternativa: 3. 2-h después de la carga de glucosa >200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante una PTGO. El ensayo se debería realizar tal como describe la OMS, usando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

En ausencia de hiperglucemia inequívoca, estos criterios deberían confirmarse repitiendo el ensayo en un día distinto. La tercera medida (PTGO) no se recomienda para el uso rutinario clínico (American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2006). Sin embargo, un incremento en los niveles de azúcar en sangre o una disminución de la insulina disponible son más bien desarrollos corriente abajo en el desarrollo y la progresión de la diabetes. No se dispone aún de medidas diagnósticas alternativas o medidas diagnósticas que podrían incluso identificar individuos de riesgo antes de la aparición temprana de la enfermedad o al menos en el estado temprano de la enfermedad.

Taylor y col. (Ann Clin Biochem 24(3):293 (1987)) desvelan la determinación de los ácidos grasos en los eritrocitos de pacientes normales frente a los de diabetes mellitus por medio de cromatografía de gases-líquida. Rodríguez y col. (Prostaglandins Leukotrienes and essential Fatty Acids 71(5): 303 (2004)) analizaron el efecto de la diabetes mellitus de tipo 2 en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos en plasma por medio de cromatografía de gases. Jellum y col. (Clin Chem 18(8): 800 (1972)) desvelan un sistema para el análisis de los múltiples componentes de los materiales biológicos que incluye la cromatografía líquida de gases, proponiendo a la glucosa, al ácido beta-hidroxobutírico y ácido acetoacético como marcadores para la diabetes mellitus. Thorand y col. (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 26(2):398 (2006)) desvelan que los niveles en plasma de la E-selectina soluble y de la molécula 1 de adhesión intercelular soluble son indicadores de diabetes mellitus de tipo 2.

Por consiguiente, el problema técnico subyacente en la presente invención puede verse como la provisión de medios y procedimientos para diagnosticar eficaz y fiablemente la diabetes de tipo 2. El problema técnico se resuelve por medio de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y que se describen en el presente documento a continuación.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una predisposición para la diabetes que comprende:

- (a) determinar al menos un metabolito en una muestra de ensayo de un sujeto que se sospecha que padece diabetes o que tiene una predisposición para ello, siendo dicho al menos un metabolito ácido tricosanóico (C20:1); y
- (b) comparar los resultados de la determinación de la etapa (a) con una referencia, de modo que se diagnosticará una predisposición para la diabetes de tipo 2.

Además, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para diagnosticar una predisposición para la diabetes que comprende:

- (a) determinar al menos un metabolito en una muestra de ensayo de un sujeto sospechoso de padecer diabetes o de tener predisposición para ello, siendo dicho al menos un metabolito seleccionado del grupo que consiste en: criptoxantina, ácido 2-hidroxipalmítico, triacilglicerido (C16:0,C18:1,C18:2), ácido gondoico, ácido tricosanóico, 5-Oxoprolina; y
- (b) comparar los resultados de la determinación de la etapa (a) con una referencia, de modo que se pueda diagnosticar una predisposición para la diabetes.

Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para la predisposición para las enfermedades citadas en el presente documento. Sin embargo, más preferentemente, se determinará un grupo de biomarcadores que incluye o consiste en los biomarcadores de uno de los grupos anteriormente mencionados por el procedimiento de la presente invención. Un grupo de marcadores consiste, preferentemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferentemente, hasta todos los biomarcadores anteriormente mencionados.

La expresión "procedimiento para diagnosticar" tal como se cita de acuerdo con la presente invención significa que el procedimiento puede consistir esencialmente en las etapas anteriormente mencionadas o puede incluir etapas adicionales. Sin embargo, se entenderá que el procedimiento, en una realización preferente, es un procedimiento que se lleva a cabo *in vitro*, es decir no se practica en el organismo del ser humano o del animal. Diagnosticar, tal como se usa en el presente documento, se refiere a evaluar la probabilidad de acuerdo con la cual un sujeto padece una enfermedad.

Tal como entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación, a pesar de que preferentemente lo será, puede no ser usualmente acertada para el 100 % de los sujetos a diagnosticar. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse una parte estadísticamente significativa de los sujetos que padecen la enfermedad o que tienen una predisposición para ello. Si una parte es estadísticamente significativa, el experto en la materia puede determinarlo sin más preámbulos usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %. Los valores de p son preferentemente, 0,2, 0,1, 0,05.

El diagnóstico de acuerdo con la presente invención incluye el control, la confirmación y la clasificación de la enfermedad relevante o sus síntomas. El control se refiere a hacer un seguimiento de una enfermedad, o una complicación, ya diagnosticada, por ejemplo analizar la progresión de la enfermedad, la influencia de un tratamiento particular en la progresión de la enfermedad o las complicaciones que surgen durante el periodo de la enfermedad o después del tratamiento satisfactorio de la enfermedad. La confirmación se refiere a afianzar o corroborar un diagnóstico ya realizado usando otros indicadores o marcadores. La clasificación se refiere a asignar el diagnóstico de acuerdo con la fuerza o con el tipo de síntomas en distintas clases, por ejemplo, los tipos de diabetes tal como se expone en cualquier parte la descripción. Específicamente, los sujetos pueden, preferentemente, clasificarse en diferentes grupos de riesgo basándose en los metabolitos y el tipo de regulación, tal como se muestra en las tablas, más adelante. Los metabolitos biomarcadores pueden ser indicativos de sujetos que tienen un riesgo incrementado de diabetes y que se encuentran en el grupo de riesgo de la glucosa en ayunas alterada (GAA), tolerancia a glucosa alterada (TGA) o ambas (GAA&TGA) tal como se indica en las tablas, más adelante. Por lo tanto, preferentemente, el procedimiento de la presente invención es un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene una predisposición para la diabetes o padece de GAA, TGA o GAA &TGA basándose en los metabolitos que se asocian con dicho riesgo incrementado tal como se enumeran en las tablas adjuntas.

El término "diabetes" o la expresión "diabetes mellitus" tal como se usan en el presente documento se refieren a estados patológicos en los que el metabolismo de la glucosa está alterado. Dichas alteraciones producen hiperglucemia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes se puede subdividir en cuatro clases. La diabetes de tipo 1 está causada por una falta de insulina. La insulina la producen las denominadas células de los islotes pancreáticos. Dichas células pueden destruirse por medio de una reacción autoinmunitaria en la diabetes de tipo 1 (Tipo 1a). Además, la diabetes de tipo 1 también incluye una variante idiopática (Tipo 1b). La diabetes de tipo 2 está causada por una resistencia a la insulina. La diabetes de Tipo 3, de acuerdo con la clasificación actual, comprende todos los tipos específicos de diabetes mellitus restantes. Por ejemplo, las células beta pueden tener defectos genéticos que afecten a la producción de insulina, la resistencia a la insulina puede tener una causa genética o el páncreas como tal puede destruirse o alterarse. Además, la desregulación hormonal o los fármacos pueden causar también la diabetes de Tipo 3. La diabetes de Tipo 4 puede ocurrir durante el embarazo. En el contexto de la presente invención, diabetes se refiere a la diabetes de Tipo 2. De acuerdo con la German Society for Diabetes, la diabetes se diagnostica por un nivel de glucosa en plasma que es mayor de 110 mg/dl en ayunas o que es mayor de 220 mg/dl en estado postprandial. Las técnicas diagnósticas adicionales preferidas se divulgan en otras partes de esta memoria descriptiva. Los síntomas adicionales de la diabetes se conocen bien en la técnica y se describen en los libros de texto de medicina convencionales, tales como el Stedman o el Pschyreml.

El término "predisposición" tal como se usa en el presente documento significa que el sujeto no ha desarrollado aún la enfermedad o ninguno de los síntomas de la enfermedad anteriormente mencionados u otros criterios diagnósticos pero, no obstante, desarrollará la enfermedad dentro de una ventana temporal definida en el futuro (ventana predictiva) con una determinada probabilidad. La ventana predictiva es un intervalo en el que el sujeto desarrollará la enfermedad o afección de acuerdo con la probabilidad prevista. La ventana predictiva puede ser la esperanza de vida completa del sujeto tras el análisis por el procedimiento de la presente invención. Preferentemente, sin embargo, la ventana predictiva es un intervalo de un mes, seis meses o uno, dos, tres, cuatro, cinco o diez años después de que se obtenga la muestra a analizar por el procedimiento de la invención. La probabilidad para desarrollar las enfermedades citadas en el presente documento será significativamente mayor para un sujeto que tiene una predisposición mayor que la probabilidad estadística de aparición de diabetes mellitus dentro de una cohorte dada de sujetos. Preferentemente, para un sujeto individual, la probabilidad asociada con una predisposición para desarrollar diabetes es al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % o al menos 1,5-veces, 2-veces, 3-veces, 4-veces, 5-veces o 10-veces en comparación con la probabilidad media para un sujeto de una cohorte dada para desarrollar diabetes. Una cohorte de sujetos tal como se cita en el presente documento significa una variedad de sujetos individuales que son de la misma especie y que preferentemente, tienen los mismos antecedentes genéticos o grupo étnico y, más preferentemente, también la misma edad y el mismo género.

La expresión "al menos un metabolito" tal como se usa en el presente documento se refiere a un solo metabolito o a una pluralidad de metabolitos, es decir, preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 3,000, 5,000 o

10.000 metabolitos. Se entenderá que "metabolito", tal como se usa en el presente documento, puede ser de al 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 distintas en las que para cada metabolito, pueden estar presentes de al menos una molécula hasta una pluralidad de moléculas. Un metabolito de acuerdo con la presente invención incluye

5 todas las clases de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos, incluyendo aquellos que están constituidos por material biológico, tales como organismos. Preferentemente, el metabolito de acuerdo con la presente invención es un compuesto de molécula pequeña. Más preferentemente, en caso de contemplarse una pluralidad de metabolitos, dicha pluralidad de metabolitos representan un metaboloma, es decir, el conjunto de metabolitos que comprende un organismo, un órgano, un tejido o una célula en un momento específico y en condiciones específicas.

10 Los metabolitos son compuestos de molécula pequeña, tales como sustratos para enzimas de rutas metabólicas, productos intermedios de dichas rutas o los productos obtenidos a través de una ruta metabólica. Las rutas metabólicas se conocen bien en la técnica y pueden variar entre especies. Preferentemente, dichas rutas incluyen al menos el ciclo del ácido cítrico, la cadena respiratoria, la fotosíntesis, la fotorrespiración, la glucólisis, la gluconeogénesis, la ruta de las hexosas monofosfato, la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, la producción y β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, las rutas de biosíntesis de aminoácidos, las rutas de degradación de proteínas, tales como la degradación

15 proteosómica, las rutas de degradación de aminoácidos, la biosíntesis o la degradación de: lípidos, policétidos (incluyendo, por ejemplo, flavonoides e isoflavonoides), isoprenoides (incluyendo, por ejemplo, terpenos, esteroides, esteroides, carotenoides, xantófilas), carbohidratos, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, bencenoides, indoles, compuestos de azufre tipo indol, porfirinas, antocianinas, hormonas, vitaminas, cofactores, tales como grupos prostéticos o transportadores de electrones, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y moléculas relacionadas tales como ARNt, microARN (miARN) o ARNm. Por consiguiente, los metabolitos de compuestos de moléculas pequeñas están compuestos preferentemente de las siguientes clases de compuestos: alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, compuestos aromáticos, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, iminas, amidas, cianidas, aminoácidos, péptidos, tioles, tioésteres, ésteres de fosfato, ésteres de sulfato, tioéteres, sulfóxidos, éteres, o

20 combinaciones o derivados de los compuestos anteriormente mencionados. Las moléculas pequeñas en los metabolitos pueden ser metabolitos primarios que se requieren para la función normal de las células, la función de los órganos o el crecimiento, desarrollo o salud animal. Además, los metabolitos de moléculas pequeñas también comprenden metabolitos secundarios que tienen una función ecológica esencial, por ejemplo, metabolitos que permiten a un organismo adaptarse a su ambiente. Además, los metabolitos no se limitan a dichos metabolitos primarios y secundarios, y además incluyen compuestos artificiales de moléculas pequeñas. Dichos compuestos artificiales de moléculas pequeñas proceden de moléculas pequeñas proporcionadas de forma exógena, que se administran o las capta un organismo pero que no son metabolitos primarios o secundarios como se define anteriormente. Por ejemplo, los compuestos artificiales de moléculas pequeñas pueden ser productos metabólicos que se obtienen a partir de fármacos por rutas metabólicas del animal. Además, los metabolitos incluyen adicionalmente péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, tales como ARN o ADN. Más preferentemente, un metabolito tiene un peso molecular de 50 Da (Dalton) a 30.000 Da, más preferentemente menor de 30,000 Da, menor de 20,000 Da, menor de 15,000 Da, menor de 10,000 Da, menor de 8,000 Da, menor de 7,000 Da, menor de 6,000 Da, menor de 5,000 Da, menor de 4,000 Da, menor de 3,000 Da, menor de 2,000 Da, menor de 1,000 Da, menor de 500 Da, menor de 300 Da, menor de 200 Da, menor de 100 Da. Sin embargo, preferentemente, un metabolito tiene un peso molecular de al menos 50 Da. Mas preferentemente, un metabolito de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de 50 Da hasta 1,500 Da.

Se entenderá que además del metabolito anteriormente mencionado, también se puede determinar un metabolito adicional o un grupo de metabolitos adicionales por el procedimiento de la presente invención. Dicho metabolito o grupo adicional de estos puede incluir metabolitos que se sabe que están asociados con diabetes. Preferentemente, dicho metabolito adicional es Glucosa.

45 Otros metabolitos preferidos a determinar conjuntamente, es decir, simultáneamente o consecutivamente, con los metabolitos o grupos de metabolitos anteriormente mencionados, son metabolitos seleccionados del grupo que consiste en:

- (i) un ácido graso saturado de cadena larga, preferentemente, Ácido lignocérico (C24:0), Ácido melísico (C30:0), o Ácido tricosanoico (C23:0),
- 50 (ii) un ácido graso poliinsaturado, preferentemente, Ácido docohexanoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), Ácido eicosapentanoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), Ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), Ácido linoleico (C18:cis2) o Ácido linolénico(C18:cis[9,12,15]3),
- (iii) un aminoácido, preferentemente, Lisina, Alanina, Treonina, Triptófano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina,
- 55 (iv) un antioxidante, preferentemente, Ácido ascórbico, Coenzima Q10, o Alfa-tocoferol,
- (v) un metabolito del ciclo del ácido cítrico, preferentemente, Piruvato, Citrato, o Malato,
- (vi) un metabolito del ciclo de la urea, preferentemente, Urea, Citrulina, Succinato u Ornitina,
- (vii) Manosa, Ácido alfa-cetoisocaprónico, Glicerol, fracción lipídica, o Ácido 3-hidroxi-butírico,

(viii) glucosa.

Un "ácido saturado de cadena larga" tal como se cita de acuerdo con la presente invención incluye, preferentemente, ácidos grasos de C18 a C30 en los que los números "18" y "30" indican el número de átomos de carbono de la cadena del ácido graso. Más preferentemente, se refiere a ácidos grasos de C20 a C30, y, más preferentemente a Ácido lignocérico (C24:0), Ácido melísico (C30:0), o Ácido tricosanóico (C23:0).

Un "ácido graso poliinsaturado" tal como se usa en el presente documento significa un ácido graso que comprende más de un enlace de carbono insaturado. Los ácidos grasos poliinsaturados preferentemente contemplados en la presente invención, son ácidos grasos poliinsaturados de C18 a C22, y, más preferentemente, Ácido docohexanoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), Ácido eicosapentanoico (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" tal como se usa en el presente documento incluye los aminoácidos de origen natural así como los derivados de estos. Los aminoácidos de origen natural se conocen bien en la técnica y se describen en los libros de texto de bioquímica convencionales. Más preferentemente, el término se refiere a Lisina, Alanina, Treonina, Triptófano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina.

El término "antioxidante" tal como se usa en el presente documento incluye compuestos que son capaces de prevenir la oxidación en un sujeto. Preferentemente, el término se refiere a metabolitos de origen natural que pueden servir como coenzimas en la célula de un sujeto o que son vitaminas incluyendo aquellas que necesitan administrarse exógenamente. Más preferentemente, un antioxidante de acuerdo con la presente invención es Ácido ascórbico, Coenzima Q10, o Alfa-tocoferol.

Las expresiones "un metabolito del ciclo del ácido cítrico" o "un metabolito del ciclo de la urea" se refiere a los productos, productos intermedios y reactantes que se sintetizan o se usan como sustratos en las cascadas de conversión bioquímica bien conocidas anteriormente mencionadas. Aquellos productos, productos intermedios o reactantes se describen en los libros de texto de bioquímica convencionales y son muy conocidos por los expertos en la materia. Preferentemente, el Piruvato, Citrato, o Malato son un metabolito del ciclo del ácido cítrico. La Urea, Citrulina, Succinato, u Omítina son, preferentemente, un metabolito del ciclo de la urea tal como se cita en el presente documento.

Preferentemente, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se determina un grupo de biomarcadores. Más preferentemente, dicho grupo consiste en biomarcadores de los distintos grupos de metabolitos especificados anteriormente de (i) a (vii). Más preferentemente, se determinará al menos un metabolito de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o de todos los grupos anteriormente mencionados de (i) a (vii). Se ha encontrado que los miembros de las clases de metabolitos anteriormente mencionadas proporcionan biomarcadores de apoyo para diagnosticar la diabetes ° o una predisposición para la diabetes. Además, una combinación de las clases de metabolitos anteriormente mencionadas proporciona resultados fiables e incluso mucho mejores.

También, preferentemente, además de los metabolitos de apoyo o grupos de metabolitos de apoyo anteriormente mencionados, se determina al menos un metabolito de apoyo seleccionado de cualquiera de los siguientes grupos que consisten en: ácido 3-hidroxibutírico, alanina, ácido alfa-cetioisocaproico, alfa-tocoferol, arginina, ácido ascórbico, aspargina, beta-caroteno, colesteno, citrato, citrulina, creatinina, ácido eicosapentaenóico (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, mioinositol, ornitina, ácido palmítico, fosfolípidos, sulfato de pregnenolona, ácido esteárico, succinato, ácido treónico, treonina, triacilglicéridos, triptofano, ácido úrico, y valina.

Más preferentemente, el al menos un metabolito de apoyo se selecciona del grupo que consiste en: triptófano, alanina, leucina, ácido palmítico, se selecciona del grupo de: triptófano, alanina, leucina, ácido palmítico, ácido eicosatrienóico, glicerofosfolípidos, isoleucina, ácido eicosatrienóico, triptófano, ácido lignocérico, ácido linoléico, serina, tirosina, ácido linoléico, sulfato de pregnenolona, aspartato, ácido araquidónico, y succinato. Más preferentemente, en dicho caso el sujeto un varón.

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

Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador de apoyo adecuado por sí mismo para las enfermedades citadas en el presente documento. Sin embargo, más preferentemente, el procedimiento de la presente invención determinará un grupo de biomarcadores de apoyo que incluye o que consiste en los biomarcadores de uno de los grupos anteriormente mencionados. Un grupo de biomarcadores consiste, preferentemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferentemente, hasta todos los biomarcadores de apoyo anteriormente mencionados.

Preferentemente, los metabolitos de apoyo citados en el presente documento, se compararán también con los resultados de referencia adecuados tal como se especifica en otras partes del presente documento. El resultado de dicha comparación respaldará adicionalmente el hallazgo en cuanto a si el sujeto padecerá o no diabetes de tipo 2. Los resultados de referencia preferentes, valores para cambios de las cantidades relativas e indicaciones para el tipo de regulación se encontrarán más adelante en los ejemplos adjuntos.

La expresión "muestra de ensayo" tal como se usa en el presente documento se refiere a muestras que se usarán para el diagnóstico de la diabetes de tipo 2 por el procedimiento de la presente invención. Dicha muestra de ensayo es una muestra biológica. Las muestras de fuentes biológicas (es decir, muestras biológicas) usualmente comprenden una variedad de metabolitos. Las muestras biológicas que se usarán en el procedimiento de la presente invención son muestras de fluidos biológicos, es decir sangre, plasma o suero. Esto también incluye las muestras que comprenden compartimentos subcelulares u orgánulos, tales como la mitocondria, el aparato de Golgi o los peroxisomas. Las muestras biológicas proceden de un sujeto tal como se especifica en otras partes del presente documento. Las técnicas para obtener los distintos tipos de muestras biológicas anteriormente mencionados se conocen bien en la materia. Por ejemplo, las muestras de sangre se pueden obtener por extracción de sangre, mientras que las muestras de tejidos o de órganos se obtendrán, por ejemplo, por biopsia.

Las muestras anteriormente mencionadas, preferentemente, se tratan previamente antes de usarlas para el procedimiento de la presente invención. Tal como se describe en más detalle a continuación, dicho tratamiento previo puede incluir tratamientos requeridos para liberar o separar los compuestos o eliminar el exceso de materiales o residuos. Las técnicas adecuadas comprenden centrifugación, extracción, fraccionamiento, purificación y/o enriquecimiento de compuestos. Además, se llevan a cabo otros tratamientos previos a fin de proporcionar los compuestos en una forma o concentración adecuada para el análisis del compuesto. Por ejemplo, si en el procedimiento de la presente invención se usa cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas, será necesario derivatizar los compuestos antes de realizar dicha cromatografía de gases. Los tratamientos previos adecuados y necesarios dependen de los medios usados para llevar a cabo el procedimiento de la invención y son bien conocidos por el experto en la materia. Las muestras previamente tratadas, tal como se describe anteriormente, también quedan incluidas en el término "muestra", como se usa de acuerdo con la presente invención.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente a mamíferos tales como ratones, ratas, ovejas, perros, gatos, caballos, monos, o vacas y, también preferentemente, a seres humanos. Otros animales que pueden ser diagnosticados aplicando el procedimiento de la presente invención son aves o reptiles. Un sujeto que se sospecha que padecer diabetes de tipo 2, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que muestra, preferentemente, síntomas o signos clínicos o parámetros indicativos de diabetes. Sin embargo, el término también se refiere a un sujeto aparentemente sano, es decir, un sujeto que no muestra ninguno de los síntomas, signos clínicos o parámetros anteriormente mencionados. Aparentemente los sujetos sanos se pueden investigar por el procedimiento de la presente invención como una medida de cuidado preventivo o para fines de exploración de la población.

La expresión "determinar dicho al menos un metabolito", como se usa en el presente documento, se refiere a determinar al menos un rasgo característico del al menos un metabolito comprendido por la muestra citada en el presente documento. Los rasgos característicos de acuerdo con la presente invención son rasgos que caracterizan las propiedades físicas y/o químicas incluyendo las propiedades bioquímicas de un metabolito. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, peso molecular, viscosidad, densidad, carga eléctrica, momento angular intrínseco, actividad óptica, color, fluorescencia, quimioluminiscencia, composición elemental, estructura química, capacidad de reaccionar con otros compuestos, capacidad de suscitar una respuesta en un sistema biológico de lectura (por ejemplo, inducción de un gen indicador) y similares. Los valores para dichas propiedades pueden servir como rasgos característicos y se pueden determinar por técnicas que se conocen bien en la materia. Además, el rasgo característico puede ser cualquier rasgo procedente de los valores de las propiedades físicas y/o químicas de un metabolito mediante operaciones estándar, por ejemplo, cálculos matemáticos, tales como la multiplicación, división o cálculos logarítmicos. Más preferentemente, el al menos un rasgo característico permite la determinación y/o la identificación química de dicho al menos un metabolito.

El al menos un metabolito comprendido por una muestra de ensayo puede determinarse de acuerdo con la presente invención cuantitativamente o cualitativamente. Para la determinación cualitativa, la presencia o ausencia del metabolito se determinará por una técnica adecuada. Además, la determinación cualitativa puede, preferentemente, incluir la determinación de la estructura química o composición del metabolito. Para la determinación cuantitativa, bien se determinará la cantidad precisa del al menos un metabolito presente en la muestra o bien se determinará la cantidad relativa del al menos un metabolito, preferentemente, basándose en el valor determinado de el/los rasgo(s) característico(s) citados anteriormente en el presente documento. La cantidad relativa se puede determinar en un caso donde la cantidad precisa de un metabolito no puede o no debe determinarse. En dicho caso, se puede determinar si la cantidad en la que el metabolito está presente aumenta o disminuye con respecto a una segunda muestra que comprende dicho metabolito en una segunda cantidad. Analizar cuantitativamente un metabolito, por lo tanto, también

incluye lo que a veces se cita como un análisis semicuantitativo de un metabolito.

Además, determinar, tal como se usa en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, preferentemente, incluye usar una etapa de separación del compuesto antes de la etapa de análisis anteriormente citada. Preferentemente, dicha etapa de separación del compuesto produce una separación resuelta en el tiempo de los metabolitos comprendidos por la muestra. Por tanto, las técnicas adecuadas para la separación que se usarán preferentemente de acuerdo con la presente invención, incluyen todas las técnicas de separación cromatográficas tales como cromatografía líquida (CL), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina, cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de afinidad. Estas técnicas se conocen bien en la materia y se pueden aplicar sin más preámbulos por el experto en la materia. Más preferentemente, la CL y/o la CG son técnicas cromatográficas a considerar por el procedimiento de la presente invención. Los dispositivos adecuados para dicha determinación de metabolitos se conocen bien en la técnica. Preferentemente, se usa la espectrometría de masas, en particular la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (EM-CG), espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (EM-CL), espectrometría de masas de infusión directa o espectrometría de masas de resonancia de ion ciclotrón con Transformada de Fourier (EM-RIC-TF), espectrometría de masas con electroforesis capilar (EM-EC), espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (EM-CLAR), espectrometría de masas cuadrupolar, cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente, tal como EM-EM o EM-EM-EM, espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (EM-PAI), espectrometría de masas en condiciones pirolíticas (EM-Pi), espectrometría de masas de movilidad iónica o espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TDV). Más preferentemente, se usan la EM-CL y/o la EM-CG tal como se describe en más detalle a continuación. Dichas técnicas se desvelan, por ejemplo, en Nissen, *Journal of Chromatography A*, 703, 1995: 37-57, US. 4.540.884 o US. 5.397.894, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Como una alternativa o además de las técnicas de espectrometría de masas, se pueden usar las siguientes técnicas para la determinación de compuestos: resonancia magnética nuclear (RMN), imagen por resonancia magnética (IRM), análisis de infrarrojos con transformada de Fourier (IRTF), espectroscopía de ultravioleta (UV), índice de refracción (IR), detección fluorescente, detección radioquímica, detección electroquímica, dispersión de luz (DL), espectroscopía dispersiva de Raman o detección por ionización de llama (DIL). Estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia y se pueden aplicar sin más preámbulos. El procedimiento de la presente invención deberá asistirse, preferentemente, por automatización. Por ejemplo, el procesamiento o tratamiento previo de la muestra puede automatizarse mediante robótica. El procesamiento y la comparación de datos, se asiste, preferentemente, mediante programas informáticos y bases de datos adecuados. La automatización, tal como se describe anteriormente en el presente documento, permite usar el procedimiento de la presente invención en estrategias de alto rendimiento.

Además, el al menos un metabolito también puede determinarse mediante un ensayo químico o biológico específico. Dicho ensayo comprenderá medios que permitan detectar específicamente el al menos un metabolito en la muestra. Preferentemente, dichos medios pueden reconocer específicamente la estructura química del metabolito o pueden identificar específicamente el metabolito basándose en su capacidad para reaccionar con otros compuestos o su capacidad para suscitar una respuesta en un sistema biológico de lectura (por ejemplo, inducción de un gen indicador). Los medios que son capaces de reconocer específicamente la estructura química de un metabolito son, preferentemente, anticuerpos u otras proteínas que interaccionan específicamente con estructuras químicas, tales como receptores o enzimas. Los anticuerpos específicos, por ejemplo, pueden obtenerse usando el metabolito como antígeno por procedimientos que se conocen bien en la técnica. Los anticuerpos, tales como los que se citan en el presente documento, incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de estos, tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que pueden unirse al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que presentan una especificidad antigénica deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo humano aceptor. Además, se incluyen los anticuerpos monocatenarios. Las secuencias donantes incluirán usualmente al menos los restos de aminoácidos de unión antigénica del donante, pero también pueden comprender otros restos de aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos se pueden preparar por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Las proteínas adecuadas que pueden reconocer específicamente el metabolito son, preferentemente, enzimas que están involucradas en la conversión metabólica de dicho metabolito. Dichas enzimas pueden usar el metabolito como sustrato o bien pueden convertir un sustrato en el metabolito. Además, dichos anticuerpos pueden usarse como una base para generar oligopéptidos que reconozcan específicamente al metabolito. Estos oligopéptidos comprenderán, por ejemplo, los dominios de unión o bolsillos de la enzima para dicho metabolito. Los ensayos adecuados basados en anticuerpos y/o enzimas pueden ser inmunoensayos RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), ensayos inmunoenzimáticos de tipo sándwich, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia (ECLIA) de tipo sándwich, fluoroinmunoensayo de disociación potenciado por lántánidos (DELFLIA) o inmunoensayos de fase sólida. Además el metabolito también puede identificarse en base a su capacidad para reaccionar con otros compuestos, es decir, mediante una reacción química específica. Las reacciones adecuadas se conocen bien en la técnica e incluyen, preferentemente, reacciones enzimáticas, (por ejemplo, para manosa, Pitkanen

E, Pitkanen O, Uotila L.; Eur J Clin Chem Clin Biochem. Octubre 1997; 35(10):761-6); o ácido ascórbico (Winnie Lee, Susan M. Roberts y Robert F. Labbe; Clinical Chemistry 43: 154-157, 1997), procedimientos enzimáticos espectrofotométricos (BN La Du, RR Howell, PJ Michael y EK Sober; Pediatrics, enero 1963, 39-46, Vol 31, N° 1), procedimientos espectrofluorimétricos (Sumi T, Umeda Y, Kishi Y, Takahashi K, Kakimoto F.; Clin Chim Acta. Diciembre 1976 1; 73(2):233-9) y de fluorescencia; de quimioluminiscencia (J.J. Thiele, H.J. Freisleben, J. Fuchs y F.R. Ochsendorf; Human Reproduction, Vol. 10, N°. 1, págs. 110-115, 1995)). Se pueden usar otros procedimientos de detección, tales como electroforesis capilar (Hubert A. Carchon y Jaak Jaeken; Clinical Chemistry 47: 1319-1321, 2001) y procedimientos colorimétricos (Kyaw A; Clin Chim Acta. junio 1978; 86(2):153-7). Además, el metabolito se puede determinar en una muestra debido a su capacidad de suscitar una respuesta en un sistema biológico de lectura. La respuesta biológica se detectará una como lectura indicando la presencia y/o la cantidad del metabolito comprendido por la muestra. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la inducción de la expresión génica o una respuesta fenotípica de una célula o un organismo.

Además, se entenderá que, dependiendo de la técnica que se use para determinar el dicho al menos un metabolito, el analito que se detectará podría ser un derivado del metabolito de origen fisiológico, es decir, el metabolito presente en un sujeto. Dichos analitos pueden generarse como resultado de preparación de muestras o de medios de detección. Los compuestos citados en el presente documento se consideran analitos. Sin embargo, tal como se expone anteriormente, estos analitos representarán los metabolitos de modo cualitativo y cuantitativo. Además, se entenderá que para una pluralidad de metabolitos, el metabolito será idéntico al analito. El término "referencia" se refiere a resultados, es decir, datos de los rasgos característicos del al menos un metabolito, que pueden correlacionarse con la diabetes de tipo 2. Dichos resultados de referencia se obtienen, preferentemente, de una muestra de un sujeto que se sabe que padece diabetes de tipo 2. Los resultados de referencia se pueden obtener aplicando el procedimiento de la presente invención. Como alternativa, pero no obstante también preferentemente, los resultados de referencia se pueden obtener de una muestra de un sujeto que se sabe que no padece diabetes de tipo 2, es decir, un sujeto sano con respecto a la diabetes y, preferentemente, también otras enfermedades. Además, la referencia, también preferentemente, podría ser una referencia calculada, más preferentemente la media o la mediana, para la cantidad relativa o absoluta de un metabolito de una población de individuos que comprenden al sujeto a investigar. Las cantidades absolutas o relativas de los metabolitos de dichos individuos de la población se pueden determinar tal como se especifica en otras partes del presente documento. Como calcular un valor de referencia adecuado, preferentemente, la media o la mediana, se conoce bien en la técnica. La población de sujetos anteriormente citada comprenderá una pluralidad de sujetos, preferentemente, al menos de 5, 10, 50, 100, 1,000 o 10,000 sujetos. Se entenderá que el sujeto a diagnosticar por el procedimiento de la presente invención y los sujetos de dicha pluralidad de sujetos, son de la misma especie.

Más preferentemente, los resultados de referencia, es decir, los valores para al menos uno de los rasgos característicos del al menos un metabolito, se almacenarán en medios de almacenamiento de datos adecuado tales como una base de datos y estarán, por lo tanto, también disponibles para diagnósticos futuros. Esto también permite diagnosticar de modo eficaz la predisposición para una enfermedad porque los resultados de referencia adecuados se pueden identificar en la base de datos una vez se ha confirmado (en el futuro) que el sujeto del cual se obtuvo la muestra de referencia desarrolla (en efecto) diabetes. Los resultados de referencia preferidos que se asocian con la diabetes o con la predisposición para la misma en seres humanos son aquellos que se muestran en las Tablas de los ejemplos acompañantes.

El término "comparar" se refiere a la evaluar si los resultados de la determinación descritos anteriormente en más detalle en el presente documento, es decir, los resultados de la determinación cualitativa o cuantitativa del al menos un metabolito, son idénticos o similares a los resultados de referencia o difieren de los mismos.

En el caso de que los resultados de referencia se obtengan de un sujeto que se sabe que tiene una predisposición para la diabetes, dicha predisposición se puede diagnosticar basándose en el grado de identidad o similitud entre los resultados del ensayo obtenidos a partir de la muestra de ensayo y los resultados de referencia anteriormente mencionados, es decir, basándose en una composición idéntica o similar cualitativa o cuantitativa con respecto a, el al menos un metabolito. Los resultados de la muestra de ensayo y los resultados de referencia son idénticos, si los valores para los rasgos característicos y, en el caso de la 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. Dicha referencia es, preferentemente, no significativa y se caracterizará porque los valores de intensidad están dentro de al menos el intervalo entre el 1er y el 99º percentil, el 5º y el 95º percentil, el 10º y el 90º percentil, el 20º y el 80º percentil, el 30º y el 70º percentil, el 40º y el 60º percentil del valor de referencia, el 50º, 60º, 70º, 80º, 90º o el 95º percentil del valor de referencia.

En caso de que los resultados de referencia se obtengan de un sujeto o de un grupo que se sabe que no tiene una predisposición para la diabetes, dicha predisposición se puede diagnosticar basándose en las diferencias entre los resultados de ensayo obtenidos a partir de la muestra de ensayo y los resultados de referencia anteriormente mencionados, es decir, las diferencias en la composición cualitativa o cuantitativa con respecto al el al menos un

- metabolito. Se aplica lo mismo si se usa una referencia calculada tal como se especifica anteriormente. La diferencia puede ser un incremento en la cantidad absoluta o relativa de un metabolito (a veces citado como regulación incrementada del metabolito, véanse también los ejemplos) o una disminución en cualquiera de dichas cantidades o la ausencia de una cantidad detectable del metabolito (a veces citado como regulación incrementada del metabolito, véanse también los ejemplos). Preferentemente, la diferencia en la cantidad relativa o absoluta es significativa, es decir, fuera del intervalo entre el 45° y el 55° percentil, el 40° y el 60° percentil, el 30° y el 70° percentil, el 20° y el 80° percentil, el 10° y el 90° percentil, el 5° y el 95° percentil, 1° y 99° percentil del valor de referencia. Para los metabolitos específicos citados en otras partes de esta memoria descriptiva, los valores preferidos para los cambios en las cantidades relativas (es decir, "multiplicidades") o el tipo de cambio (es decir, regulación "incrementada" o "disminuida" que tiene como resultado una cantidad relativa y/o absoluta mayor o menor) se indican en las tablas acompañantes indicadas más adelante. Si en dichas tablas se indica que un metabolito determinado está "regulado de forma incrementada" en un sujeto, la cantidad relativa y/o absoluta se incrementará, si está "regulado de forma disminuida", la cantidad relativa y/o absoluta del metabolito disminuirá. Además, la "multiplicidad" indica el grado de incremento o disminución, por ejemplo, una multiplicidad de 2 significa que la cantidad es dos veces la cantidad del metabolito comparada con la referencia.
- Por tanto, el procedimiento de la presente invención, en una realización preferida, incluye una referencia procedente de un sujeto o de un grupo de sujetos que se sabe que tiene predisposición para la diabetes. Más preferentemente, en este caso resultados idénticos o similares para la muestra de ensayo y dicha referencia (es decir, cantidades relativas o absolutas del al menos un metabolito) son indicativos de una predisposición para la diabetes. En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, la referencia procede de un sujeto o de un grupo de sujetos que se sabe que no tiene predisposición para la diabetes o es una referencia calculada. Más preferentemente, en ese caso, la ausencia del al menos un metabolito o una cantidad que difiere, preferentemente de modo significativo, en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de referencia (es decir, se observa una diferencia significativa en la cantidad absoluta o relativa) es indicativa de una predisposición para la diabetes.
- La comparación está, preferentemente, asistida por automatización. Por ejemplo, un programa informático adecuado que comprende un algoritmo para la comparación de dos conjuntos de datos distintos (por ejemplo, se pueden usar los conjuntos de datos que comprenden los valores del rasgo, o rasgos, característicos). Dichos programas informáticos y algoritmos se conocen bien en la técnica. A pesar de lo anterior, también se puede llevar a cabo una comparación manualmente.
- Los procedimientos anteriormente mencionados para la determinación del al menos un metabolito se pueden implementar en un dispositivo. Un dispositivo, tal como se usa en el presente documento, comprenderá al menos los medios anteriormente mencionados. Además, el dispositivo, también comprende preferentemente medios para la comparación y la evaluación del rasgo o rasgos característicos del al menos un metabolito y, también preferentemente, la intensidad de señal determinada. Los medios del dispositivo están, preferentemente, relacionados operativamente entre sí. Cómo relacionar los medios de un modo operativo dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para determinar cuantitativamente o cualitativamente el metabolito de forma automática, los datos obtenidos por dichos medios que operan automáticamente se pueden procesar, por ejemplo, a través de un programa informático para facilitar el diagnóstico. Preferentemente, en dicho caso, los medios están constituidos por un solo dispositivo. Por consiguiente, dicho dispositivo puede incluir una unidad para analizar los metabolitos y una unidad informática para procesar los datos resultantes para el diagnóstico. Como alternativa, cuando se usan medios, tales como tiras reactivas, para determinar los metabolitos, los medios para el diagnóstico deben comprender tiras o tablas de control que asignen los datos de los resultados determinados a los datos de los resultados que se sabe que vienen acompañados de diabetes o los que son indicativos de un sujeto sano, tal como se comentó anteriormente. Los dispositivos preferidos son los que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un médico especializado, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que solamente requieren cargar una muestra.
- Como alternativa, los procedimientos para la determinación del al menos un metabolito se pueden implementar en un sistema que comprende varios dispositivos que están, preferentemente, relacionados operativamente entre sí. Específicamente, los medios deben estar asociados de manera que permitan llevar a cabo el procedimiento de la presente invención tal como se describe con detalle anteriormente. Por lo tanto, relacionado operativamente, tal como se usa en el presente documento, preferentemente, significa relacionado funcionalmente. Dependiendo de los medios a usar por el sistema de la presente divulgación, dichos medios pueden estar relacionados funcionalmente mediante la conexión de cada medio entre sí por medios que permitan transportar datos entre dichos medios, por ejemplo, cables de fibra óptica, y otros cables para el transporte de datos a alta resolución. No obstante, la transferencia inalámbrica de datos entre los medios también contempla la presente invención, por ejemplo, por medio de una LAN (*Local Area Network*, red de área local) (LAN inalámbrica (*Wireless*), W-LAN). Un sistema preferido comprende medios para realizar la determinación de metabolitos. Los medios para realizar la determinación de metabolitos, tal como se usan en el presente documento, incluyen medios para separar metabolitos, tales como dispositivos cromatográficos, y medios para la determinación de metabolitos, tales como los dispositivos de espectrometría de masas. Los dispositivos adecuados se han descrito con detalle anteriormente. Los medios preferidos para la separación de compuestos para usarlos en el

sistema de la presente divulgación incluyen dispositivos cromatográficos, más preferentemente dispositivos para cromatografía líquida, CLAR, y/o cromatografía de gases. Los dispositivos preferidos para la determinación de compuestos comprenden dispositivos de espectrometría de masas, más preferentemente, EM-CG, EM-CL, espectrometría de masas de infusión directa, EM-RIC-TF, EM-EC, EM-CLAR, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas acoplada secuencialmente (incluyendo EM-EM o EM-EM-EM), EM-PAI, EM-Pi o TDV. Los medios de separación y determinación están, preferentemente, acoplados entre sí. Más preferentemente, en el sistema de la presente divulgación, se usa EM-CL y/o EM-CG tal como se describe con detalle en otras partes de la memoria descriptiva. Además se comprenderán medios para comparar y/o analizar los resultados obtenidos a partir de los medios de determinación de metabolitos. Los medios para comparar y/o analizar los resultados pueden comprender al menos una base de datos y un programa informático implementado para la comparación de los resultados. Las realizaciones preferentes de los sistemas y dispositivos anteriormente mencionados también se describen con detalle más adelante.

De modo ventajoso, de acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que el al menos uno de los metabolitos anteriormente mencionados será un biomarcador adecuado para una predisposición para la diabetes. Aplicar estos metabolitos como biomarcadores permitirá realizar un diagnóstico rápido, fiable y rentable de una predisposición para la diabetes. Además, el procedimiento puede asistirse por automatización tal como se describe en otras partes de esta descripción y, por lo tanto, permite realizar la exploración con alto rendimiento en sujetos que tengan riesgo de padecer diabetes. De este modo, el procedimiento de la presente invención puede asistir a los programas de salud para la prevención de la diabetes y se puede usar para controlar el éxito de las terapias preventivas para la diabetes o tomar otras medidas para la prevención de la diabetes incluyendo dietas nutricionales. Además, los metabolitos o combinaciones de metabolitos que se citan en el presente documento pueden determinarse simultáneamente en un momento y de un modo rentable, mediante las técnicas de perfil metabólico descritas en esta memoria descriptiva. Adicionalmente, el procedimiento de la presente invención permite evaluar el riesgo de un sujeto que es o se está convirtiendo en un miembro de un grupo de riesgo de determinadas diabetes, es decir, GAA, TGA o GAA y TGA. La incidencia descrita de GAA y TGA varía ampliamente entre el 5 y el 26% dependiendo del grupo étnico, de la edad y de la distribución por sexo. Se espera que ambos grupos de riesgo, GAA y TGA se incrementen en el futuro próximo. Para ambos grupos de riesgo, GAA o TGA, se ha notificado una progresión a diabetes incidente del 25 % a los 3-5 años, permaneciendo el 50 % en su estado glucémico anómalo y volviendo el 25 % a niveles normales de glucosa. En observaciones más largas, la mayoría de los individuos con GAA o TGA parecen desarrollar diabetes. Los individuos tanto con GAA como con TGA (GAA y TGA) tienen aproximadamente el doble de la tasa de desarrollo de diabetes en comparación con los sujetos que bien tienen GAA o TGA (Nathan 2007, Diabetes Care 30(3): 753-759).

Las explicaciones e interpretaciones de los términos efectuadas anteriormente se aplican de acuerdo con las otras realizaciones especificadas más adelante en el presente documento.

En una descripción adicional del procedimiento descrito en la presente invención, dicho al menos un metabolito se selecciona del grupo que consiste en: diacilglicérido (C18:1, C18:2) y triacilglicérido (C16:0, C18:2, C18:2).

Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para la predisposición citada en el presente documento. Sin embargo, más preferentemente, un grupo de biomarcadores que incluye biomarcadores de uno de los grupos anteriormente mencionados se determinará por el procedimiento de la presente invención. Un grupo de biomarcadores consiste, preferentemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferentemente, hasta todos los biomarcadores anteriormente mencionados. Además, se ha encontrado en el estudio subyacente de la presente invención que los metabolitos de los grupos anteriormente mencionados se adaptan particularmente bien como biomarcadores para una predisposición para la diabetes en varones. Por consiguiente, el sujeto a diagnosticar de acuerdo con la invención es más preferentemente, en el contexto de la realización preferida anteriormente mencionada, un varón.

Tal como se describe anteriormente, en una realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha determinación del al menos un metabolito comprende espectrometría de masas (EM).

La espectrometría de masas, tal como se usa en el presente documento, incluye todas las técnicas que permiten la determinación del peso molecular (es decir, la masa) o una variable de la masa que corresponde a un compuesto, es decir, un metabolito, a determinar de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la espectrometría de masas, tal como se usa en el presente documento, se refiere a EM-CG, EM-CL, espectrometría de masas de infusión directa, EM-RIC-TF, EM-EC, EM-CLAR, espectrometría de masas cuadrupolar, cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente tal como EM-EM o EM-EM-EM, EM-PAI, EM-Pi, TDV o cualquiera de las estrategias combinadas que usen las técnicas anteriormente mencionadas. El experto en la materia sabe bien cómo aplicar estas técnicas. Además en el comercio se dispone de dispositivos adecuados. Más preferentemente, la espectrometría de masas, tal como se usa en el presente documento, se refiere a EM-CL y/o EM-CG, es decir, a espectrometría de masas que está relacionada operativamente con una etapa previa de separación cromatográfica. Más preferentemente, la espectrometría de masas tal como se usa en el presente documento incluye la EM cuadrupolar. Más preferentemente, dicha EM cuadrupolar se

realiza del siguiente modo: a) selección de un cociente de masa/carga (m/z) de un ion creado por ionización en un primer cuadrupolo analítico del espectrómetro de masas, b) fragmentación del ion seleccionado en la etapa a) aplicando un voltaje de aceleración en un cuadrupolo adicional posterior que está cargado con un gas de colisión y que actúa como una cámara de colisión, selección de un cociente de masa/carga de un ion creado por el proceso de fragmentación de la etapa b) en un cuadrupolo adicional posterior, de modo que las etapas a) a c) del procedimiento y el análisis del cociente de masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias como resultado del proceso de ionización se llevan a cabo al menos una vez, de modo que el cuadrupolo se cargue con el gas de colisión pero no se aplique voltaje de aceleración durante el análisis. Los detalles de dicha espectrometría de masas a usar más preferentemente de acuerdo con la presente invención pueden encontrarse en el documento WO 03/073464.

- 5
10 Más preferentemente, dicha espectrometría de masas es EM acoplada a cromatografía líquida (CL) y/o EM acoplada a cromatografía de gases (CG).

La cromatografía líquida tal como se usa en el presente documento 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 por que en una fase móvil los compuestos pasan a través de una fase estacionaria. Cuando los compuestos pasan a través de la fase estacionaria a distintas velocidades estos comienzan a separarse con el tiempo dado que cada compuesto individual tiene su tiempo de retención específico (es decir, el tiempo que necesita el compuesto para pasar a través del sistema). La cromatografía líquida, tal como se usa en el presente documento, también incluye CLAR. En el comercio se dispone de dispositivos para realizar la cromatografía líquida, por ejemplo, en Agilent Technologies, USA. En principio, la cromatografía de gases tal como se aplica de acuerdo con la presente invención, funciona de un modo comparable a la cromatografía líquida. Sin embargo, en lugar de tener los compuestos (es decir, metabolitos) en una fase líquida móvil que pasa a través de la fase estacionaria, los compuestos estarán presentes en un volumen gaseoso. Los compuestos pasan por la columna que puede contener materiales de soporte sólidos como fase estacionaria o las paredes de la cual servirán o estarán recubiertas con la fase estacionaria. De nuevo, cada compuesto tiene un tiempo específico necesario para pasar a través de la columna. Además, en el caso de la cromatografía de gases se contempla preferentemente que los compuestos se derivaticen antes de la cromatografía de gases. Las técnicas adecuadas para la derivatización de compuestos se conocen bien en la técnica. Preferentemente, la derivatización de acuerdo con la presente invención se refiere a metoximación y trimetilsililación, preferentemente, de compuestos polares y transmetilación, metoximación y trimetilsililación, preferentemente, de compuestos no polares (es decir, lipófilos).

Además, la presente memoria descriptiva desvela un conjunto de datos que comprende valores característicos de al menos un metabolito que es indicativo de diabetes o de una predisposición para esta, seleccionándose dicho metabolito de uno cualquiera de los grupos anteriormente citados. La expresión "conjunto de datos" se refiere a un conjunto de datos que pueden agruparse físicamente y/o lógicamente. Por consiguiente, el conjunto de datos puede implementarse en un solo medio de almacenamiento de datos o en medios de almacenamiento de datos físicamente separados que estén relacionados operativamente entre sí. Preferentemente, el conjunto de datos se implementa mediante una base de datos. Por lo tanto, una base de datos, tal como se usa en el presente documento, comprende el conjunto de datos en un medio de almacenamiento adecuado. Además, la base de datos, preferentemente, comprende adicionalmente un sistema de control de la base de datos. El sistema de control de la base de datos es, preferentemente, un sistema de control de bases de datos basado en redes, jerárquico u orientado al objeto. Además, la base de datos puede ser una base de datos federal o integrada. Más preferentemente, la base de datos se implementará como un sistema distribuido (federal), por ejemplo, como un sistema cliente-servidor. Más preferentemente, la base de datos se estructura para permitir que un algoritmo de búsqueda compare un grupo de datos de ensayo con los grupos de datos comprendidos por el conjunto de datos. Específicamente, mediante el uso de dicho algoritmo, con la base de datos se pueden buscar grupos de datos similares o idénticos que sean indicativos de diabetes o de una predisposición para esta (por ejemplo, una búsqueda). Por lo tanto, si en el conjunto de datos puede identificarse un grupo de datos idéntico o similar, el grupo de datos se asociará con diabetes o con una predisposición para esta. En consecuencia, la información que se obtiene a partir del conjunto de datos se puede usar para diagnosticar la diabetes o una predisposición de esta, basándose en un grupo de datos de ensayo obtenido de un sujeto. Más preferentemente, el conjunto de datos comprende valores característicos de todos los metabolitos comprendidos por uno cualquiera de los grupos anteriormente enumerados.

A la luz de lo anterior, la presente memoria descriptiva desvela un medio de almacenamiento de datos que comprende el conjunto de datos anteriormente mencionado.

La expresión "medio de almacenamiento de datos", tal como se usa en el presente documento, incluye medios de almacenamiento de datos que se basan en entidades físicas únicas tales como un CD, un CD-ROM, un disco duro, medios de almacenamiento ópticos, o un disquete. Además, la expresión también incluye medios de almacenamiento de datos que consisten en entidades físicamente separadas que están relacionadas operativamente entre sí, de modo que proporcionan el conjunto de datos anteriormente mencionado, preferentemente, de un modo adecuado para una búsqueda.

La presente memoria descriptiva también desvela un sistema que comprende:

- (a) medios para comparar valores característicos de metabolitos de una muestra relacionada operativamente con
- (b) un medio de almacenamiento de datos tal como se describe anteriormente.

5 El término "sistema" tal como se usa en el presente documento se refiere a distintos medios que están relacionados operativamente entre sí. Dichos medios pueden implementarse en un solo dispositivo o pueden ser dispositivos físicamente separados que están relacionados operativamente entre sí. Los medios para comparar valores característicos de metabolitos funcionan, preferentemente, basándose en un algoritmo para la comparación tal como se menciona anteriormente. El medio de almacenamiento de datos, preferentemente, comprende el conjunto de datos o base de datos anteriormente mencionada, donde cada uno de los conjuntos de datos almacenado es indicativo de una predisposición para la diabetes. Por lo tanto, el sistema desvelado en la presente memoria descriptiva permite identificar si un grupo de datos de ensayo está comprendido por el conjunto de datos almacenado en el medio de almacenamiento de datos. En consecuencia, el sistema de la presente memoria descriptiva puede aplicarse como un medio diagnóstico para diagnosticar una predisposición para la diabetes.

15 En una divulgación preferida del sistema, están comprendidos los medios para determinar valores característicos los metabolitos de una muestra. La expresión "medios para determinar valores característicos de metabolitos" preferentemente se refiere a los dispositivos anteriormente mencionados para la determinación de metabolitos, tales como, dispositivos de espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los metabolitos.

20 Además, la presente memoria descriptiva desvela medios diagnósticos que comprenden medios para la determinación de al menos un metabolito seleccionado de uno cualquiera de los grupos anteriormente citados. La expresión "medios diagnósticos", preferentemente, se refiere a un dispositivo diagnóstico, sistema o ensayo químico o biológico tal como se especifica con detalle en otras partes de la descripción. La expresión "medios para la determinación de al menos un metabolito" se refiere a dispositivos o agentes que pueden reconocer específicamente el metabolito. Los dispositivos adecuados pueden ser dispositivos espectrométricos tales como los de espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los metabolitos. Los agentes adecuados pueden ser compuestos que detectan específicamente los metabolitos. Detección, tal como se usa en el presente documento, puede ser un proceso en dos etapas, es decir, primero el compuesto puede unirse específicamente al metabolito para ser detectado y posteriormente generar una señal detectable, por ejemplo, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales radiactivas y similares. Para la generación de la señal detectable pueden requerirse compuestos adicionales que están todos comprendidos por la expresión "medios de determinación del al menos un metabolito". Los compuestos que se unen específicamente al metabolito se describen con detalle en otras partes de la memoria descriptiva e incluyen, preferentemente, enzimas, anticuerpos, ligandos, receptores u otras moléculas biológicas o químicas que se unen específicamente a los metabolitos.

35 Además, la presente memoria descriptiva desvela una composición diagnóstica que comprende al menos un metabolito que se selecciona de uno cualquiera de los grupos anteriormente citados.

40 El al menos un metabolito de cualquiera de los grupos anteriormente mencionados, servirá como un biomarcador, es decir, una molécula indicadora de un estado de riesgo en el sujeto, es decir, la predisposición de diabetes. Por lo tanto, las propias moléculas de metabolitos pueden servir como composiciones diagnósticas, preferentemente, sobre la visualización o detección por los medios citados en el presente documento. Por lo tanto, una composición diagnóstica que indica la presencia de un metabolito de acuerdo con la presente divulgación también puede comprender dicho marcador físicamente, por ejemplo, un complejo de un anticuerpo y el metabolito a detectar puede servir como la composición diagnóstica. Por consiguiente, la composición diagnóstica puede comprender además medios para la detección de los metabolitos tal como se especifica en otras partes de esta descripción. Como alternativa, si se usan los medios de detección tales como las técnicas basadas en EM o RMN, la especie molecular que sirve como un indicador del estado de riesgo será el al menos un metabolito comprendido por la muestra de ensayo a investigar. Por lo tanto, el al menos un metabolito citado de acuerdo con la presente divulgación servirá en sí mismo como una composición diagnóstica debido a su identificación como un biomarcador.

50 Finalmente, la presente memoria descriptiva desvela el uso de al menos un metabolito o medio para la determinación de este para la fabricación de un dispositivo o una composición para diagnosticar una predisposición para la diabetes, en los que dicho al menos un metabolito se selecciona de uno cualquiera de los grupos anteriormente citados.

Tal como se ya se ha especificado anteriormente, cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador por sí mismo adecuado para una predisposición de las enfermedades citadas en el presente documento. Sin embargo, más preferentemente, el procedimiento de la presente invención determinará un grupo de biomarcadores que incluye uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente. Un grupo de biomarcadores consiste, preferentemente, en al

menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferentemente, hasta todos los biomarcadores anteriormente mencionados.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos que no pretenden restringir o limitar el alcance de esta invención.

5 **Ejemplo 1: Determinación de metabolitos**

Se informó a los voluntarios a cerca de los exámenes planificados. La junta de revisión institucional del Dife (Instituto Alemán de Nutrición Humana) aprobó el protocolo experimental y todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito. Después de esto, se midieron los valores antropométricos y el espesor de la íntima-media. Después de estos exámenes se realizó una prueba de tolerancia de la glucosa oral (PTGO) con 75 g de glucosa. Se extrajeron muestras de sangre a los 0, 30, 60 y 120 minutos. Los voluntarios se clasificaron por criterios de la OMS y de la ADA. Se obtuvo plasma de sangre completa mediante la adición de EDTA como anticoagulante y posterior centrifugación.

Las muestras se prepararon y se sometieron análisis por EMCL y EMCG tal como se describe a continuación:

Las muestras se prepararon del siguiente modo: las proteínas se separaron por precipitación del plasma sanguíneo. Después de la adición de agua y una mezcla de etanol y diclorometano la muestra restante se fraccionó en una fase acuosa, polar y una fase orgánica, lipófila.

Para la transesterificación de los extractos lipídicos, al extracto evaporado se añadió 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. El recipiente se cerró herméticamente y se calentó durante 2 horas a 100 °C, con agitación. La solución se evaporó posteriormente hasta la desecación. El residuo se secó completamente.

La metoximación de los grupos carbonilo se llevó a cabo mediante la reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en pirimidina, 100 µl durante 1,5 horas a 60 °C) en un recipiente herméticamente cerrado. Se añadieron 20 µl de una solución de ácidos grasos impares de cadena lineal (solución de 0,3 mg/ml de cada uno de los ácidos grasos de 7 a 25 átomos de carbono y 0,6 mg/ml de cada uno de los ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) de piridina/tolueno) como estándares de tiempo. Finalmente se realizó la derivatización con 100 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) durante 30 minutos a 60 °C, nuevamente en el recipiente herméticamente cerrado. El volumen final antes de la inyección en la CG fue de 220 µl.

Para la fase polar de la derivatización se realizó del siguiente modo: La metoximación de los grupos carbonilo se llevó 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 herméticamente cerrado. Se añadieron 10 µl de una solución de ácidos grasos impares de cadena lineal (solución de 0,3 mg/µl de cada uno de los ácidos grasos de 7 a 25 átomos de carbono y 0,6 mg/µl de cada uno de los ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) piridina/tolueno) como estándares de tiempo. Finalmente se realizó la derivatización con 50 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) durante 30 minutos a 60 °C, nuevamente en el recipiente herméticamente cerrado. El volumen final antes de la inyección en la CG fue de 110 µl.

El sistema de EM-CG consistió en un sistema Agilent 6890 GC acoplado a un Agilent 5973 MSD. Los inyectores automáticos son CompiPal o GCPal de CTC.

Para el análisis se usaron las columnas de separación capilar comerciales habituales (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) con distintas fases estacionarias de poli-metil-siloxano que contenían del 0 % al 35 % de restos aromáticos, dependiendo de los materiales de la muestra analizada y de las fracciones de la etapa de separación de fases (por ejemplo: DB-1 ms, HP-5ms, DB-XLB, DB-35ms, Agilent Technologies). Se inyectó hasta 1 µl del volumen final sin fraccionar y el programa de temperatura de estufa se inició a 70 °C y terminó a 340 °C con distintas velocidades de calentamiento dependiendo del material de la muestra y de la fracción de la etapa de separación de fases para alcanzar una separación cromatográfica y número de escaneos suficientes en cada pico del analito. Además, se usó BTR (bloqueo de tiempo de retención, de Agilent Technologies) para el análisis y las condiciones habituales estándar para EM-CG, por ejemplo flujo constante con de 1 a 1,7 ml/min. nominales y helio como fase móvil gaseosa, la ionización se realizó por impacto de electrones con 70 eV, escaneando en un intervalo de m/z de 15 a 600 a velocidades de escaneo de 2,5 a 3 escaneos/seg y condiciones de sintonía estándar.

El sistema de EM-CLAR consistía en un sistema Agilent 1100 LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas API 4000 (Applied Biosystem/MDS SC1EX, Toronto, Canadá). El análisis por CLAR se realizó en columnas de separación en fase inversa, disponibles en el comercio, con fases estacionarias C18 (por ejemplo: GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18). Se inyectaron hasta 10 µl del volumen final de la muestra y se realizó la separación con un gradiente de elución usando metanol/agua/ácido fórmico o gradientes de acetonitrilo/agua/ácido

fórmico a una velocidad de flujo de 200 µl/min.

La espectrometría de masas se llevó a cabo mediante ionización por electropulverización en modo positivo para la fracción no polar y en modo negativo para la fracción polar usando el modo de control de reacción múltiple (CRM) y escaneo completo de 100 - 1000 uma.

5 **Ejemplo 2: Evaluación de datos**

Las mediciones de EM de CG y CL de todas las muestras de plasma de la sangre de los sujetos de riesgo (sujetos con alto riesgo de desarrollar diabetes; bien los sujetos "GAA": no diabéticos con GAA incrementada, los sujetos "TGA": no diabéticos con TGA incrementada, o los sujetos "GAA y TGA" no diabéticos con GAA y TGA incrementadas) y de los sujetos de control se realizaron junto con las referencias de plasma agrupadas. Para cada lote de mediciones, se calcularon las proporciones relativas de la señal de los sujetos individuales.

Los metabolitos de riesgo específicos se determinaron mediante el modelado lineal de las proporciones de las señales de metabolito por medio del factor de riesgo ternario (niveles: GAA,TGA,GAA y TGA) corrigiendo los factores de desviación de la edad y el IMC (índice de masa corporal) y también incorporando los dos distintos géneros: en primer lugar se generó un modelo lineal con los factores que se acaban de mencionar, en segundo lugar los efectos estimados se evaluaron por estadística t, en tercer lugar se seleccionaron solamente metabolitos con el valor de p estadístico de $t < 0,05$ en relación a los niveles de los factores de riesgo y las interacciones entre el género y los niveles de los factores de riesgo. Además, se determinó el tipo de regulación para cada metabolito como "incrementada" para proporciones incrementadas >1 del nivel de riesgo respectivo frente al control y "disminuida" para las proporciones disminuidas <1 del nivel de riesgo frente al control.

En las siguientes tablas 1 a 5, se presentan los resultados de la evaluación de los datos. Las tablas 1 y 2 muestran los resultados para los metabolitos que aún no se han notificado para los pacientes con diabetes. Los metabolitos citados en las tablas 3 a 5 ya se han descrito para pacientes con diabetes. Las tablas 1 y 3 enumeran los metabolitos significativos en cuanto al efecto de "riesgo" principal, especificando los niveles significativos de los factores respectivos GAA, TGA, y GAA y TGA (estadística de t). Las tablas 2, 4 y 5 enumeran los metabolitos significativos en cuanto a la interacción del riesgo y el género, es decir, metabolitos que muestran regulación diferencial específica de sexo entre los sujetos de control y los sujetos de riesgo. Los resultados presentados en las tablas se ordenan de acuerdo con su potencial y eficacia como marcadores para la diabetes o una predisposición para esta. También se indica el tipo de regulación observado. Regulación "incrementada" se refiere a un incremento de la cantidad absoluta o relativa del metabolito, mientras que regulación "disminuida" se refiere a una disminución de dicha cantidad absoluta o relativa o incluso la ausencia del metabolito en cantidades detectables. Los metabolitos que están particularmente muy asociados con la diabetes se subdividen en grupos indicados por las líneas divisorias de las tablas. Además, en las tablas se indica el grupo de riesgo, es decir, GAA, TGA o GAA y TGA.

Tabla 1: Resultados totales. Metabolitos que difieren significativamente ($p < 0,05$) entre los grupos de riesgo para la Diabetes mellitus de tipo 2 (GAA, TGA, GAA y TGA) y los controles ("riesgo" de efecto principal significativo, es decir, *mismo tipo de regulación ("incrementada", "disminuida") en varones y en hembras*). Los metabolitos se ordenan por el valor de p. [GAA =Glucosa en ayunas alterada; TGA =Tolerancia a glucosa alterada; GAA y TGA: pacientes que tienen tanto GAA como TGA].

metabolito	regulación	grupo_riesgo
criptoxantina	disminuida	TGA
ácido 2-hidroxi-palmitico	incrementada	GAA
triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18:2)	incrementada	TGA
ácido gondoico	incrementada	TGA
ácido tricosanóico	disminuida	GAA y TGA
5-oxoprolina	incrementada	GAA

5 Tabla 2: Metabolitos que difieren específicamente entre los controles masculinos y los pacientes masculinos de los grupos de riesgo para la Diabetes. Los metabolitos difieren significativamente ($p < 0,05$) con respecto a la interacción riesgo-género, es decir, están regulados de un modo distinto en varones y hembras en cuanto al riesgo para la Diabetes mellitus de tipo 2 (GAA, TGA y GAA y TGA) y controles. Los metabolitos se ordenan por el valor de p. [GAA =Glucosa en ayunas alterada; TGA =Tolerancia a glucosa alterada; GAA y TGA: pacientes que tienen tanto GAA como TGA].

metabolito	reg_masculina	grupo_riesgo
diacilglicérido (C18:1,C18:2)	disminuida	TGA
triacilglicérido (C16:0,C18:2,C18:2)	disminuida	TGA
triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18:2)	disminuida	GAA

10 Tabla 3: Resultados totales. Metabolitos que difieren significativamente ($p < 0,05$) entre los grupos de riesgo para la Diabetes mellitus de tipo 2 (GAA, TGA y GAA y TGA) y controles ("riesgo" de efecto principal significativo, es decir, mismo tipo de regulación ("incrementada", "disminuida") en varones y hembras). Los metabolitos se ordenan por el valor de p. [GAA =Glucosa en ayunas alterada; TGA =Tolerancia a glucosa alterada; GAA y TGA: pacientes que tienen tanto GAA como TGA].

metabolito	regulación	grupo_riesgo
lactato	incrementada	GAA
ácido alfa-cetoisocaprónico	disminuida	TGA
glucosa	incrementada	GAA y TGA
metionina	disminuida	TGA
manosa	incrementada	GAA y TGA
ácido 3-hidroxi-butírico	incrementada	TGA
leucina	incrementada	TGA
ácido úrico	incrementada	GAA
ácido treónico	incrementada	GAA
beta-caroteno	disminuida	GAA y TGA
ácido ascórbico	incrementada	GAA y TGA
glicina	disminuida	TGA
triacilglicéridos	disminuida	GAA
lactato	incrementada	TGA
fosfolípidos	incrementada	TGA
creatinina	disminuida	TGA
glutamato	incrementada	GAA
ácido alfa-cetoisocaprónico	disminuida	GAA y TGA
triacilglicéridos	incrementada	TGA
valina	incrementada	TGA
malato	incrementada	GAA
ácido alfa-cetoisocaprónico	disminuida	GAA
isoleucina	incrementada	TGA
succinato	incrementada	GAA
glucosa-1-fosfato	incrementada	GAA y TGA
valina	incrementada	GAA y TGA
ácido eicosapentaenóico (C20:cis[5,8,11,14,17]5)	disminuida	GAA y TGA

metabolito	(continuación) regulación	grupo_riesgo
fosfolípidos	incrementada	GAA
ácido úrico	incrementada	GAA y TGA
citrato	incrementada	TGA
aspargina	disminuida	GAA y TGA
metionina	disminuida	GAA
glutamina	disminuida	TGA
ácido palmítico	incrementada	TGA
triptófano	disminuida	GAA y TGA
alanina	incrementada	TGA
glutamato	incrementada	TGA
citrulina	disminuida	TGA
colesteno	disminuida	GAA y TGA
treonina	disminuida	TGA
omitina	incrementada	GAA
arginina	disminuida	TGA
manosa	incrementada	GAA
ácido 3-hidroxi-butírico	incrementada	GAA y TGA
glutamina	disminuida	GAA
sulfato de pregnolona	incrementada	GAA y TGA
ácido glicérico	incrementada	TGA
folato	incrementada	GAA
malato	incrementada	TGA
beta-caroteno	disminuida	GAA
leucina	incrementada	GAA
glutamina	disminuida	GAA y TGA
alfa-tocoferol	incrementada	GAA y TGA
mioinositol	incrementada	GAA
ácido esteárico	incrementada	TGA
glicerol-3-fosfato	incrementada	GAA
beta-caroteno	disminuida	TGA

5 Tabla 4: Metabolitos que difieren específicamente entre controles masculinos y los pacientes masculinos de los grupos de riesgo para la Diabetes. Los metabolitos difieren significativamente ($p < 0,05$) en cuanto a la interacción riesgo-género, es decir regulados de un modo distinto en varones y hembras en cuanto al riesgo para la Diabetes mellitus de tipo 2 (GAA, TGA y GAA&TGA) y controles. Los metabolitos se ordenan por el valor de p. [GAA =Glucosa en ayunas alterada; TGA =Tolerancia a glucosa alterada; GAA y TGA: pacientes que tienen tanto GAA como TGA].

metabolito	reg_masculina	grupo_riesgo
triptófano	disminuida	TGA
alanina	disminuida	GAA
leucina	disminuida	TGA
ácido palmítico	disminuida	GAA
ácido eicosatrienóico	disminuida	TGA
glicerofosfolípidos	disminuida	TGA

(continuación)

metabolito	reg_masculina	grupo_riesgo
isoleucina	disminuida	GAA
ácido eicosatrienóico	disminuida	GAA
triptófano	disminuida	GAA
ácido lignocérico	disminuida	TGA
ácido linoléico	disminuida	TGA
serina	incrementada	GAA
tirosina	disminuida	TGA
ácido linoléico	disminuida	GAA
sulfato de pregnenolona	disminuida	TGA
aspartato	incrementada	TGA
ácido araquidónico	disminuida	TGA
succinato	incrementada	GAA y TGA

5 Tabla 5: Metabolitos que difieren específicamente entre los controles femeninos y los pacientes femeninos de los grupos de riesgo para la Diabetes. Los metabolitos difieren significativamente ($p < 0,05$) en cuanto a la interacción riesgo-género, es decir, regulados de un modo distinto en varones y hembras en cuanto al riesgo para la Diabetes mellitus de tipo 2 (GAA, TGA y GAA y TGA) y controles. Los metabolitos se ordenan por el valor de p. [GAA =Glucosa en ayunas alterada; TGA =Tolerancia a glucosa alterada; GAA y TGA: pacientes que tienen tanto GAA como TGA].

metabolito	reg-femenina	grupo_riesgo
alanina	incrementada	GAA
ácido palmítico	incrementada	GAA
isoleucina	incrementada	GAA
ácido eicosatrienóico	incrementada	GAA
ácido úrico	incrementada	GAA
ácido esteárico	incrementada	GAA
serina	disminuida	GAA

REVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico de una predisposición para la diabetes de tipo 2 que comprende:

(a) determinar al menos un metabolito en una muestra de sangre, de suero o de plasma de un sujeto sospechoso de tener una predisposición para la diabetes de tipo 2, siendo dicho al menos un metabolito el ácido tricosanoico; y
 (b) comparar los resultados de ensayo de la determinación de la etapa (a) con una referencia, de tal manera que se diagnostique una predisposición para la diabetes de tipo 2,

(i) en el que dicha referencia procede de un sujeto o de un grupo que se sabe que tiene una predisposición para la diabetes de tipo 2 y por lo que resultados idénticos para la muestra de sangre, de suero o de plasma y la referencia son indicativos de una predisposición para la diabetes de tipo 2, o

(ii) en el que dicha referencia procede de un sujeto o de un grupo que se sabe que no tiene predisposición para la diabetes de tipo 2 y por lo que la ausencia de dicho al menos un metabolito o de una cantidad de este que difiere en la muestra de sangre, de suero o de plasma en comparación con la muestra de referencia es indicativa de una predisposición para la diabetes de tipo 2, o,

(iii) en el que dicha referencia es una referencia calculada para dicho al menos un metabolito en una población de sujetos y por lo que la ausencia de dicho al menos un metabolito o una cantidad de este que difiere en la muestra de sangre, de suero o de plasma en comparación con la muestra de referencia es indicativa de una predisposición para la diabetes de tipo 2.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha determinación de dicho al menos un metabolito comprende espectrometría de masas (EM).

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha espectrometría de masas es EM acoplada a cromatografía líquida (CL) y/o EM acoplada a cromatografía de gases (CG).

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sujeto es un ser humano.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se determina al menos un metabolito adicional seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un ácido graso saturado de cadena larga, preferentemente, Ácido lignocérico (C24:0), Ácido melísico (C30:0),
 (ii) un ácido graso poliinsaturado, preferentemente, Ácido docohexanoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), Ácido eicosapentanoico (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, preferentemente, Lisina, Alanina, Treonina, Triptófano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina,

(iv) un antioxidante, preferentemente, Ácido ascórbico, Coenzima Q10, o Alfa-tocoferol,

(v) un metabolito del ciclo del ácido cítrico, preferentemente, Piruvato, Citrato, o Malato,

(vi) un metabolito del ciclo de la urea, preferentemente, Urea, Citrulina, Succinato, u Ornitina,

(vii) Manosa, Ácido alfa-cetoisocapróico, Glicerol, fracción lipídica, o ácido 3-hidroxi-butírico, y

(viii) glucosa.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se determina al menos un metabolito adicional seleccionado del grupo que consiste en: ácido 3-hidroxi-butírico, alanina, ácido alfa-cetoisocapróico, alfa-tocoferol, arginina, ácido ascórbico, asparagina, beta-caroteno, colesteno, citrato, citrulina, creatinina, ácido eicosapentanoico (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, mioinositol, ornitina, ácido palmítico, fosfolípidos, sulfato de pregnolona, ácido esteárico, succinato, ácido terónico, treonina, triacilglicéridos, triptófano, ácido úrico y valina.

7. El uso de un medio diagnóstico que comprende medios para la determinación específica del ácido tricosanoico para diagnosticar una predisposición para la diabetes de tipo 2 mediante la determinación del ácido tricosanoico como un biomarcador en una muestra de sangre, de suero o de plasma de un sujeto.

8. El uso de una composición diagnóstica que comprende ácido tricosanoico para diagnosticar una predisposición para la diabetes de tipo 2 mediante la determinación del ácido tricosanoico como un biomarcador en una muestra de sangre, de suero o de plasma de un sujeto.

9. El uso de la reivindicación 8, en el que dicha composición diagnóstica comprende adicionalmente medios para la detección específica del Ácido tricosanóico.

10. El uso del ácido tricosanóico como biomarcador en una muestra de sangre, de suero o de plasma para diagnosticar una predisposición para la diabetes de tipo 2 en un sujeto.