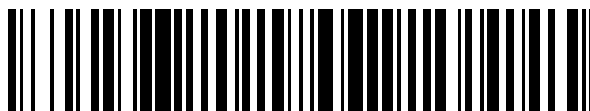


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 818**

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 10196650 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2339346**

54 Título: **Procedimientos de predicción de diabetes 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 2 522 818 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

## Procedimientos de predicción de diabetes Tipo II

La presente memoria divulga un procedimiento para diagnosticar una predisposición a la diabetes que comprende determinar al menos un metabolito en una muestra de ensayo de un sujeto del que se sospecha que tiene una predisposición a la diabetes y comparar dicho al menos un metabolito con una referencia, mediante lo cual se diagnosticará una predisposición a la diabetes. Asimismo, la presente memoria divulga un conjunto de metabolitos, una recopilación de datos que comprende valores característicos de los metabolitos y un medio de almacenamiento que comprende dicha recopilación de datos. Además, la presente memoria divulga también un sistema que comprende medios para comparar valores característicos de los metabolitos de una muestra operativamente enlazados a un medio de almacenamiento de datos. La presente memoria divulga igualmente medios de diagnóstico que comprenden al menos un metabolito y el uso de dicho al menos un metabolito para la fabricación de medios de diagnóstico para diagnosticar una predisposición a la diabetes. Por último, la presente memoria divulga un procedimiento para la identificación de metabolitos relacionados con la diabetes.

La prevalencia de la diabetes mellitus ha llegado a aproximadamente el 6 % en el mundo industrializado y aumentará hasta 366 millones de personas afectadas en 2030 a nivel mundial. La razón más frecuente (tipo), (aproximadamente el 90 %) de la diabetes en el mundo representa la diabetes tipo 2, que tiene una patogenia multifactorial. La secuencia patológica para la diabetes tipo 2 implica muchos elementos. Se considera obligatorio tener una predisposición genética que actualmente apenas es comprendida.

Si se produce el fenotipo de la diabetes, está influido entonces por muchos factores medioambientales que comparten la capacidad de estresar el sistema de homeostasis de la glucosa, ya sea al originar o empeorar la resistencia a la insulina o ya sea al afectar a la secreción de insulina. Muchas hormonas, por supuesto, intervienen 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 insulina. La insulina es producida por las células  $\beta$  pancreáticas que son capaces de regularse muy rápidamente a diferentes demandas de glucosa. La razón principal para la diabetes tipo 2 es un aumento de la resistencia a la insulina. Por tanto, la acción de la insulina disminuye normalmente pero inicialmente el sistema es capaz de compensar esto mediante el aumento de la función de las células  $\beta$ . En este momento quizás se podría medir solamente una glucemia basal alterada o una tolerancia a la glucosa alterada en la OGTT (prueba de tolerancia a la glucosa oral). Pero a lo largo del tiempo las células  $\beta$  se sobre-estresarán por el aumento de la resistencia a la insulina y la toxicidad de la glucosa y podría diagnosticarse una diabetes tipo 2.

Aparte de los problemas médicos directos por el alto o bajo azúcar en sangre, la principal carga médica y socio-económica de la enfermedad es causada por las complicaciones asociadas. Las complicaciones devastadoras de la diabetes mellitus son en su mayoría enfermedades macrovasculares y microvasculares como la insuficiencia renal crónica, la retinopatía, la neuropatía periférica y autónoma o el infarto de miocardio. Por tanto, la morbilidad cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2 es de dos a cuatro veces mayor que la de las 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 se basa actualmente en la supervisión de los niveles de azúcar en sangre y la reducción de un nivel elevado de azúcar en sangre a un nivel normal mediante la administración de insulina exógena. Para este fin, se inyecta insulina exógena en la sangre. De modo alternativo, los niveles de glucosa en la sangre pueden ser regulados mediante dietas nutricionales y la exclusión de los factores de riesgo del estilo de vida, tales como fumar, falta de ejercicio, altos niveles de colesterol, y un peso corporal inestable.

El Comité Experto de la ADA (Asociación Americana de Diabetes) reconocía un grupo intermedio de sujetos cuyos niveles de glucosa, si bien no cumplían los criterios de la diabetes, eran, sin embargo, demasiado elevados como para ser considerados normales. Este grupo se define como el que tiene niveles de glucemia en ayunas en plasma (FPG) > 100 mg/dl (5,6 mmol/l) pero < 126 mg/dl (7,0 mmol/l) o valores 2-h en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) de > 140 mg/dl (7,8 mmol/l) pero < 200 mg/dl (11,1 mmol/l). Por tanto, las categorías de los valores de FPG son como siguen:

- FPG < 100 mg/dl (5,6 mmol/l) = glucemia basal normal;
- FPG 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l) = IFG (glucemia basal alterada);
- FPG > 126 mg/dl (7,0 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico debe ser confirmado, tal y como se describe más abajo).

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

-2 horas después de la carga de glucosa < 140 mg/dl (7,8 mmol/l) = tolerancia a la glucosa normal

-2 horas después de la carga de glucosa 140-199 mg/dl (7,8 -11,1 mmol/l) = IGT (tolerancia a la glucosa alterada)

-2 horas después de la carga de glucosa > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico debe ser confirmado, tal y como se describe más abajo).

El diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2:

- 5 1. Los síntomas de la diabetes más una concentración de glucosa en plasma casual > 200 mg/dl (11,1 mmol/l). Casual se define como a cualquier hora del día sin tener en cuenta el tiempo desde la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia, y pérdida de peso sin razón aparente. De modo alternativo: 2. FPG > 126 mg/dl (7,0 mmol/l). En ayunas se define como una ingesta no calórica durante al menos 8 h. De modo alternativo: 3. 2 horas después de la carga de glucosa > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante una OGTT. La prueba debe llevarse a cabo tal y 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 deben ser confirmados mediante pruebas repetidas en un día diferente. La tercera medición (OGTT) no se recomienda para uso clínico rutinario.

- 15 (American Diabetes Association, *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, Diabetes Care 2006) Sin embargo, un aumento de los niveles de azúcar en sangre o una disminución de la insulina disponible son los acontecimientos más posteriores en el desarrollo y progresión de la diabetes. Aún no están disponibles mediciones diagnósticas alternativas o mediciones diagnósticas que pudieran incluso identificar individuos en riesgo antes de la aparición temprana de la enfermedad o al menos en un estado temprano de la enfermedad.

- 20 Thomas y col. (2005; *Prostaglandins Leuotrienes and essential Fatty Acids* 72(5): 335) investigaron ácidos grasos en plasma de neonatos nacidos de madres con y sin diabetes gestacional, y encontraron una reducción de ácido gondoico en triglicéridos plasmáticos y ésteres de colesterol plasmáticos de neonatos nacidos de mujeres con diabetes gestacional. Asimismo, Thomas y col. (2004, *Eur J Clin Nutr* 58:1492) informaron de que mujeres con diabetes gestacional tenían niveles reducidos de ácido gondoico en los triglicéridos plasmáticos, los ésteres de colesterol plasmáticos, y los fosfoglicéridos de colina en plasma. Thorand y col. (2007, *Diabetes care* 30(4):878) divulgaron que los niveles en plasma de E-selectina soluble y moléculas de adhesión intercelular solubles son predictores de la diabetes tipo 2.

De acuerdo con lo anterior, el problema técnico que subyace a la presente invención debe verse como la provisión de medios y procedimientos para diagnosticar de un modo eficaz y fiable una predisposición a la diabetes. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y descritas en el presente documento a continuación.

- 30 De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 que comprende:

- (a) la determinación de al menos un metabolito en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto del que se sospecha que tiene una predisposición a la diabetes tipo 2, siendo dicho al menos un metabolito ácido gondoico; y
- 35 (b) la comparación de los resultados de la determinación de la etapa (a) con una referencia, mediante lo cual se diagnosticará una predisposición a la diabetes si dicha muestra de sangre, suero o plasma comprende una cantidad incrementada de ácido gondoico en comparación con una referencia derivada de un sujeto o un grupo conocido por no tener predisposición a la diabetes tipo 2.

- 40 Cada uno de los metabolitos criptoxantina, ácido 2-hidroxi-palmitico, triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18:2), ácido gondoico, ácido tricosanoico, y 5-oxoprolina es un biomarcador adecuado por sí mismo para la predisposición a enfermedades a las que se refiere el presente documento. Sin embargo, más preferiblemente, un grupo de biomarcadores que incluyan o consistan en ácido gondoico se determinará por el procedimiento de la presente invención. Un grupo de biomarcadores consiste, preferiblemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferiblemente, hasta todos los biomarcadores mencionados previamente.

- 45 La expresión "procedimiento para diagnosticar" al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención significa que el procedimiento puede consistir esencialmente en las etapas mencionadas anteriormente o puede incluir etapas adicionales. Sin embargo, se ha de entender que el procedimiento, en una realización preferida, es un procedimiento llevado a cabo *in vitro*, es decir, no practicado en el cuerpo humano o animal. Diagnosticar tal y como se usa en el presente documento se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto tendrá una predisposición a las enfermedades a las que se refiere el presente documento, es decir, la diabetes. El diagnóstico de una predisposición puede ser denominado algunas veces pronóstico o predicción de la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad. Como entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación, si bien se prefiere, puede no ser normalmente correcta para el 100 % de los sujetos a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que una porción estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que tiene una predisposición a las enfermedades a las que se refiere el presente documento. Si una porción es estadísticamente significativa puede ser determinada sin otro particular por la persona experta en la materia usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación del

valor p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Detalles sobre esto se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%, al menos del 60 %, al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 %, al menos del 95 %. Los valores p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

- 5 Diagnosticar de acuerdo con la presente invención incluye la supervisión, la confirmación, y la clasificación de la predisposición a la enfermedad relevante o sus síntomas. La supervisión se refiere a hacer el seguimiento de una predisposición (a la enfermedad) ya diagnosticada o una complicación, por ejemplo, a analizar la progresión de la enfermedad, la influencia de un tratamiento particular sobre la progresión de la enfermedad o las complicaciones que aparecen durante el periodo de enfermedad o después de un tratamiento exitoso de la enfermedad *bezieht sich* 10 *alles* de la enfermedad und nicht predisposición. La confirmación se refiere a la consolidación o la corroboración de un diagnóstico ya efectuado usando otros indicadores o marcadores. La clasificación se refiere a asignar el diagnóstico de acuerdo con la fuerza o el tipo de síntomas en diferentes clases, por ejemplo los tipos de diabetes, tal y como se describe en otros lugares de la descripción, véase más arriba. Específicamente, los sujetos pueden ser clasificados, preferiblemente, para diferentes grupos de riesgo basados en los metabolitos y el tipo de regulación tal 15 y como se muestra en las Tablas dadas a continuación. Los biomarcadores metabolitos pueden ser indicativos para los sujetos que tienen un mayor riesgo de diabetes y caen en el grupo de riesgo de glucemia basal alterada (IFG), tolerancia a la glucosa alterada (IGT) o ambos (IFG&IGT) tal y como se indica en las Tablas, a continuación. Por tanto, preferiblemente, el procedimiento de la presente invención es un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene una predisposición a la diabetes o sufre de IFG, IGT o IFG&IGT basado en los metabolitos que están siendo asociados con dicho mayor riesgo tal y como se listan en las Tablas adjuntas. 20

El término "diabetes" o "diabetes mellitus" tal y como se usa en el presente documento se refiere a condiciones de enfermedad en las que el metabolismo de la glucosa está alterado. Dicha alteración da como resultado la hiperglucemia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes se puede subdividir en 25 cuatro clases. La diabetes Tipo 1 es causada por una falta de insulina. La insulina es producida por las así llamadas células de los islotes pancreáticos. Dichas células pueden ser destruidas por una reacción autoinmune en la diabetes Tipo 1 (Tipo 1a). Asimismo, la diabetes Tipo 1 también engloba una variante idiopática (Tipo 1b). La diabetes Tipo 2 es causada por una resistencia a la insulina. La diabetes Tipo 3, de acuerdo con la clasificación actual, comprende todos los otros tipos específicos de la diabetes mellitus. Por ejemplo, las células beta pueden tener defectos genéticos que afectan a la producción de insulina, la resistencia a la insulina puede ser originada 30 genéticamente o el páncreas, como tal, puede estar destruido o alterado. Asimismo, la desregulación hormonal o los fármacos pueden causar también la diabetes Tipo 3. La diabetes Tipo 4 puede ocurrir durante el embarazo. Preferiblemente, diabetes, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la diabetes tipo 2. De acuerdo con la Sociedad Alemana para la Diabetes, la diabetes se diagnostica por un nivel de glucosa en plasma superior a 110 mg/dl en estado de ayunas o bien superior a 220 mg/dl postprandial. Además, las técnicas de diagnóstico preferidas se divulgan en otros lugares en la presente memoria. Asimismo, los síntomas de la diabetes son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto habituales de medicina, tales como *Stedman* o *Pschyrembl*. 35

El término "predisposición" tal y como se usa en el presente documento significa que un sujeto no ha desarrollado aún la enfermedad o ninguno de los síntomas de la enfermedad anteriormente mencionados u otros criterios de diagnóstico pero, no obstante, desarrollará la enfermedad en un periodo de tiempo definido en el futuro (periodo predictivo) con una cierta probabilidad. El periodo predictivo es un intervalo en el que el sujeto desarrollará la enfermedad o condición de acuerdo con la probabilidad predicha. El periodo predictivo puede ser toda la vida restante del sujeto sometido a análisis mediante el procedimiento de la presente invención. Preferiblemente, sin embargo, el periodo predictivo es un intervalo de un mes, seis meses o uno, dos, tres, cuatro, cinco o diez años tras haber sido obtenida la muestra a analizar mediante el procedimiento de la presente invención. La probabilidad de desarrollar las enfermedades a las que se refiere el presente documento será significativamente mayor para un sujeto que tiene una predisposición que la probabilidad de aparición estadística de la diabetes mellitus en una cohorte dada de sujetos. Preferiblemente, para un sujeto individual la probabilidad asociada a una predisposición a desarrollar la diabetes es al menos del 30 %, al menos del 40 %, al menos del 50 %, al menos del 60 %, al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 % o del 100 % o al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces mayor comparada con la probabilidad media para un sujeto de una cohorte dada de desarrollar la diabetes. Una cohorte de sujetos a los que se refiere el presente documento significa una pluralidad de sujetos individuales que son de la misma especie y, preferiblemente, tienen la misma dotación genética o son del mismo grupo étnico y, más preferiblemente, también de la misma edad y género. 40 45 50

El término "al menos un metabolito" tal y como se usa en el presente documento se refiere a un solo metabolito o a una pluralidad de metabolitos, es decir, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 o 10.000 metabolitos. Se ha de entender que "metabolito" tal y como se usa en el presente documento puede ser 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 diferentes en donde para cada metabolito puede estar presente desde al menos una molécula hasta una pluralidad de moléculas. Un metabolito de acuerdo con la presente invención engloba todas las clases de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos que incluyen aquellos comprendidos en un material biológico tales como organismos. Preferiblemente, el metabolito de 55 60

acuerdo con la presente invención es un compuesto de molécula pequeña. Más preferiblemente, en caso de que se prevea una pluralidad de metabolitos, dicha pluralidad de metabolitos representa un metaboloma, es decir, el conjunto de metabolitos comprendidos por un organismo, un órgano, un tejido o una célula en un tiempo específico y en condiciones específicas.

5 Los metabolitos están compuestos por moléculas pequeñas, tales como sustratos para enzimas de las rutas metabólicas, intermedios de dichas rutas o los productos obtenidos mediante una ruta metabólica. Las rutas metabólicas son bien conocidas en el estado de la técnica y pueden variar entre especies. Preferiblemente, dichas rutas incluyen al menos el ciclo del ácido cítrico, la cadena respiratoria, la fotosíntesis, la fotorrespiración, la glucólisis, la glucogenogénesis, la ruta del monofosfato de hexosa, la ruta del fosfato de pentosa oxidativa, la producción y  $\beta$ -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 proteosómica, las rutas de degradación de aminoácidos, la biosíntesis o la degradación de: lípidos, policétidos (que incluyen por ejemplo flavonoides e isoflavonoides), isoprenoides (que incluyen, por ejemplo, terpenos, esteroides, carotenoides, xantófilas), carbohidratos, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, bencenoides, indoles, compuestos de indol-azufre, porfirinas, antocianos, hormonas, vitaminas, cofactores tales como grupos prostéticos o portadores de electrones, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y moléculas relacionadas tales como ARNt, microARN (miARN) o ARNm. De acuerdo con lo anterior, los metabolitos compuestos por moléculas pequeñas están compuestos preferiblemente por las siguientes clases de compuestos: alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, compuestos aromáticos, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, iminas, amidas, cianuros, aminoácidos, péptidos, tioles, tioésteres, ésteres de fosfato, ésteres de sulfato, tioéteres, sulfóxidos, éteres, o combinaciones o derivados de los compuestos mencionados anteriormente. Las moléculas pequeñas entre los metabolitos pueden ser metabolitos primarios que se requieren para la función celular normal, la función de los órganos o el crecimiento animal, el desarrollo o la salud. Asimismo, los metabolitos de molécula pequeña comprenden además metabolitos secundarios que tienen una función ecológica esencial, por ejemplo metabolitos que permiten a un organismo adaptarse a su entorno. Igualmente, los metabolitos no están limitados a dichos metabolitos primarios y secundarios y engloban, además, compuestos de molécula pequeña artificiales. Dichos compuestos de molécula pequeña artificiales se derivan de molécula pequeña proporcionadas de forma exógena que son administradas a un organismo o tomadas por un organismo pero que no son metabolitos primarios o secundarios tal y como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, compuestos de molécula pequeña artificiales pueden ser productos metabólicos obtenidos a partir de fármacos mediante las rutas metabólicas del animal. Asimismo, los metabolitos incluyen además péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, tales como ARN o ADN. Más preferiblemente, un metabolito tiene un peso molecular de 50 Da (Dalton) a 30.000 Da, más preferiblemente de menos de 30.000 Da, de menos de 20.000 Da, de menos de 15.000 Da, de menos de 10.000 Da, de menos de 8.000 Da, de menos de 7.000 Da, de menos de 6.000 Da, de menos de 5.000 Da, de menos de 4.000 Da, de menos de 3.000 Da, de menos de 2.000 Da, de menos de 1.000 Da, de menos de 500 Da, de menos de 300 Da, de menos de 200 Da, de menos de 100 Da. Preferiblemente, un metabolito tiene, sin embargo, un peso molecular de al menos 50 Da. Más preferiblemente, un metabolito de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de 50 Da hasta 1.500 Da.

40 Se entenderá que, además de los metabolitos o grupos de los metabolitos mencionados anteriormente, se puede determinar también un metabolito adicional o un grupo de metabolitos adicionales mediante el procedimiento de la presente invención. Dicho metabolito o grupo de los mismos adicional puede incluir metabolitos conocidos por estar asociados a la diabetes o la predisposición a la diabetes. Preferiblemente, dicho metabolito adicional es la Glucosa.

45 Otros metabolitos preferidos que se determinará conjuntamente, es decir, tanto simultáneamente como consecutivamente, con los metabolitos o grupos de los metabolitos mencionados anteriormente son metabolitos seleccionados de entre el grupo que consiste en:

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

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

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

(iv) un antioxidante, preferiblemente, Ácido ascórbico, Coenzima Q10, o alfa-Tocoferol,

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

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

(vii) Manosa, ácido alfa-Cetoisocaproico, Glicerol, fracción lipídica, o ácido 3-Hidroxibutírico,

(viii) glucosa.

Un "ácido graso saturado de cadena larga" al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención engloba, preferiblemente, ácidos grasos C18 a C30 en los que los números "18" y "30" indican el número de átomos de carbono en la cadena de ácido graso. Más preferiblemente, se refiere a ácidos grasos C20 a C30, y, más preferiblemente al ácido Lignocérico (C24:0), al ácido Melísico (C30:0), o al ácido Tricosanoico (C23:0).

- 5 Un "ácido graso poliinsaturado" tal y como se usa en el presente documento significa un ácido graso que comprende más de un enlace de carbono insaturado. Ácidos grasos poliinsaturados preferiblemente previstos por la presente invención son ácidos grasos poliinsaturados C18 a C22, y, más preferiblemente, ácido Docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido Eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido Araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido Linoleico (C18:cis[9,12]2), o ácido Linolénico (C18:cis[9,12,15]3).
- 10 El término "aminoácido" tal y como se usa en el presente documento engloba los aminoácidos de origen natural así como derivados de los mismos. Los aminoácidos de origen natural son bien conocidos en el estado de la técnica y se describen en libros de texto habituales de bioquímica. Más preferiblemente, el término se refiere a Lisina, Alanina, Treonina, Triptófano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina.
- 15 El término "antioxidante" tal y como se usa en el presente documento engloba compuestos que son capaces de prevenir la oxidación en un sujeto. Preferiblemente, el término se refiere un metabolito de origen natural que pueden servir como coenzimas en las células de un sujeto o que son vitaminas que incluyen aquellas que necesitan ser suministradas de forma exógena. Más preferiblemente, un antioxidante de acuerdo con la presente invención es el ácido Ascórbico, la Coenzima Q10, o el alfa-Tocoferol.
- 20 La expresión "un metabolito del Ciclo del Ácido Cítrico" o "un metabolito del Ciclo de la Urea" se refiere a los productos, intermedios y reactantes que se sintetizan o se usan como sustratos en las bien conocidas cascadas de conversión bioquímica mencionadas anteriormente. Esos productos, intermedios o reactantes se describen en los libros de texto habituales de bioquímica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Preferiblemente, el Piruvato, el Citrato, o el Malato son un metabolito del Ciclo del Ácido Cítrico. La Urea, la Citrulina, el Succinato, o la Ornitina son, preferiblemente, un metabolito del Ciclo de la Urea a los que se refiere el presente documento.

Preferiblemente, se determina un grupo de biomarcadores de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Más preferiblemente, dicho grupo consiste en biomarcadores de los diferentes grupos de metabolitos especificados anteriormente como (i) a (vii). Más preferiblemente, se ha de determinar al menos un metabolito de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o todos los grupos mencionados anteriormente (i) a (vii). Se ha encontrado que los miembros de las clases de metabolitos mencionadas anteriormente proporcionan biomarcadores de apoyo para diagnosticar la diabetes o una predisposición a la diabetes. Asimismo, una combinación de las clases de metabolitos mencionadas anteriormente proporciona incluso resultados mejores y más fiables.

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

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

Más preferiblemente, el al menos un metabolito de apoyo se selecciona de entre el grupo que consiste en: alanina, ácido palmítico, isoleucina, ácido eicosatrienoico, ácido úrico, ácido esteárico, y serina. Más preferiblemente, el sujeto en dicho caso es un sujeto femenino.

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

55 Los metabolitos de apoyo a los que se ha hecho referencia previamente también se compararán, preferiblemente, con los resultados de referencia adecuados, tal y como se ha especificado en otros lugares en el presente documento. El resultado de dicha comparación, además, será de apoyo para la conclusión de si el sujeto tendrá una

predisposición a las enfermedades a las que se refiere el presente documento o no. Los resultados de referencia preferidos, los valores para los cambios de las cantidades relativas y las indicaciones para el tipo de regulación se encontrarán en los Ejemplos adjuntos, a continuación.

5 El término "muestra de ensayo" tal y como se usa en el presente documento se refiere a muestras que se usarán para el diagnóstico de una predisposición a la diabetes mediante el procedimiento de la presente invención. Dicha muestra de ensayo es una muestra biológica. Las muestras de origen biológico (es decir, muestras biológicas) comprenden normalmente una pluralidad de metabolitos. Las muestras biológicas que se usarán en el procedimiento de la presente invención son muestras de los fluidos biológicos sangre, plasma, o suero. Esto también engloba  
10 muestras que comprenden compartimentos u orgánulos subcelulares, tales como las mitocondrias, el aparato de Golgi o los peroxisomas. Las muestras biológicas se derivan de un sujeto tal y como se ha especificado en otros lugares en el presente documento. Las técnicas para obtener los diferentes tipos de muestras biológicas mencionados anteriormente son bien conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las muestras de sangre se pueden obtener mediante extracción de sangre.

15 Preferiblemente, las muestras mencionadas anteriormente son tratadas previamente antes de ser usadas para el procedimiento de la presente invención. Tal y como se describe con más detalle a continuación, dicho tratamiento previo puede incluir tratamientos requeridos para la liberación o la separación de los compuestos o para la eliminación de material excesivo o residuos. Las técnicas adecuadas comprenden centrifugación, extracción, fraccionamiento, purificación y/o enriquecimiento de los compuestos. Asimismo, se llevan a cabo otros tratamientos previos para proporcionar los compuestos en una forma o concentración adecuada para el análisis de compuestos.

20 Por ejemplo, si se usa la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el procedimiento de la presente invención, será necesario derivatizar los compuestos antes de dicha cromatografía de gases. Los tratamientos previos necesarios y adecuados dependen de los medios usados para llevar a cabo el procedimiento de la invención y son bien conocidos por la persona experta en la materia. Las muestras tratadas previamente, tal y como se describe anteriormente, están comprendidas también en el término "muestra", tal y como se usa de acuerdo  
25 con la presente invención.

El término "sujeto" tal y como se usa en el presente documento se refiere a animales, preferiblemente a mamíferos tales como ratones, ratas, ovejas, perros, gatos, caballos, monos, o vacas y, también preferiblemente, a humanos. Otros animales que pueden ser diagnosticados aplicando el procedimiento de la presente invención son pájaros o reptiles. Un sujeto del que se sospecha que sufre diabetes o que tiene una predisposición a la misma, tal y como se  
30 usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que muestra, preferiblemente, síntomas o signos clínicos o parámetros indicativos de la diabetes. Sin embargo, el término también se refiere a un sujeto aparentemente sano, es decir, un sujeto que no exhibe ninguno de los síntomas, signos clínicos o parámetros mencionados anteriormente. Los sujetos aparentemente sanos pueden ser investigados mediante el procedimiento de la presente invención como una medida de cuidado preventivo o con fines de cribado de la población.

35 La expresión "determinar dicho al menos un metabolito" tal y como se usa en el presente documento se refiere que se determinará al menos un rasgo característico del al menos un metabolito comprendido en la muestra a las que se refiere el presente documento. Los rasgos característicos de acuerdo con la presente invención son cualidades que caracterizan las propiedades físicas y/o químicas incluyendo las propiedades bioquímicas de un metabolito. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, el peso molecular, viscosidad, densidad, carga eléctrica, giro, actividad óptica, color, fluorescencia, quimioluminiscencia, composición elemental, estructura química, capacidad para reaccionar con  
40 otros compuestos, capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador) y similares. Los valores para dichas propiedades pueden servir como rasgos característicos y puede determinarse mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Asimismo, el rasgo característico puede ser cualquier rasgo que se derive de los valores de las propiedades físicas y/o químicas de un metabolito mediante operaciones estándar, por ejemplo, cálculos matemáticos tales como multiplicación, división o cálculo logarítmico. Más preferiblemente, el al menos un rasgo característico permite la determinación y/o  
45 la identificación química del dicho al menos un metabolito.

El al menos un metabolito comprendido en una muestra de ensayo puede ser determinado de acuerdo con la presente invención cuantitativamente o cualitativamente. Para la determinación cualitativa, la presencia o ausencia  
50 del metabolito se determinará mediante una técnica adecuada. Asimismo, la determinación cualitativa puede incluir, preferiblemente, la determinación de la estructura química o la composición del metabolito. Para la determinación cuantitativa, se determinará la cantidad exacta del al menos un metabolito presente en la muestra o se determinará la cantidad relativa del al menos un metabolito, preferiblemente, basadas en el valor determinado para el rasgo o rasgos característicos a los que se refiere previamente el presente documento. La cantidad relativa puede ser  
55 determinada en el caso en que la cantidad exacta de un metabolito no se pueda o no se deba determinar. En dicho caso, puede determinarse 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 tanto, también incluye lo que algunas veces se denomina análisis semicuantitativo de un metabolito.

60 Asimismo, determinar tal y como se usa en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, incluye, preferiblemente, usar una etapa de separación de compuestos antes de la etapa de análisis a la que se ha hecho

referencia previamente. Preferiblemente, dicha etapa de separación de compuestos produce una separación resuelta en el tiempo de los metabolitos comprendidos en la muestra. Las técnicas adecuadas para la separación que se usarán preferiblemente de acuerdo con la presente invención, por tanto, incluyen todas las técnicas de separación cromatográfica tales como cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía de capa fina, cromatografía de afinidad o de exclusión molecular. Estas técnicas son bien conocidas en el estado de la técnica y pueden ser aplicadas por la persona experta en la materia sin otro particular. Más preferiblemente, la LC y/o la GC son técnicas cromatográficas que estarán previstas por el procedimiento de la presente invención. Los dispositivos adecuados para dicha determinación de los metabolitos son bien conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, se usa la espectrometría de masas, en particular cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas de infusión directa o transformada de Fourier - ion-ciclotrón-resonancia - espectrometría de masas (FT-ICR-MS), electroforesis capilar - espectrometría de masas (CE-MS), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), espectrometría de masas de cuadrúpulo, cualquiera espectrometría de masas acoplada secuencialmente, tal como MS-MS o MS-MS-MS, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), pirólisis - espectrometría de masas (Py-MS), espectrometría de masas de movilidad iónica o espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). Más preferiblemente, se usan LC-MS y/o GC-MS, tal y como se describe con detalle más abajo. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en los documentos Nissen, *Journal of Chromatography A*, 703, 1995: 37-57, US 4.540.884 o US 5.397.894, el contenido de la descripción de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia. Como alternativa, o además de las técnicas de espectrometría de masas, se pueden usar las siguientes técnicas para la determinación de compuestos: resonancia magnética popular (NMR), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), análisis de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía ultravioleta (UV), índice de refracción (RI), detección fluorescente, detección radioquímica, detección electroquímica, dispersión de la luz (LS), espectroscopía Raman dispersiva o detección por ionización de llama (FID). Estas técnicas son bien conocidas por la persona experta en la materia y pueden ser aplicadas sin otro particular. El procedimiento de la presente invención será asistido, preferiblemente, mediante automatización. Por ejemplo, el procesamiento de la muestra o el tratamiento previo pueden ser automatizados mediante la robótica. El procesamiento de datos y la comparación son asistidos, preferiblemente, mediante bases de datos y programas de ordenador adecuados. La automatización tal y como se describe anteriormente en el presente documento permite usar el procedimiento de la presente invención en planteamientos de alto rendimiento.

Asimismo, el al menos un metabolito puede determinarse también mediante un ensayo químico o biológico específico. Dicho ensayo comprenderá medios que permitan detectar específicamente el al menos un metabolito en la muestra. Preferiblemente, dichos medios son capaces de reconocer específicamente la estructura química del metabolito o son capaces de identificar específicamente el metabolito basados en su capacidad para reaccionar con otros compuestos o su capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador). Medios que son capaces de reconocer específicamente la estructura química de un metabolito son, preferiblemente, anticuerpos u otras proteínas que interactúan específicamente con estructura químicas, tales como receptores o enzimas. Anticuerpos específicos, por ejemplo, se pueden obtener usando el metabolito como antígeno mediante procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. Los anticuerpos como los que se refiere el presente documento incluyen tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)2 que son capaces de unirse al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos humanizados en los que secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donador no humano que exhibe una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Asimismo, están comprendidos los anticuerpos de cadena sencilla. Las secuencias del donador incluirán normalmente al menos los residuos de aminoácido que se unen al antígeno del donador pero pueden comprender también otros residuos de aminoácido estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donador. Dichos híbridos se pueden preparar mediante diversos procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. Las proteínas adecuadas que son capaces de reconocer específicamente el metabolito son, preferiblemente, 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. Asimismo, dichos anticuerpos se pueden usar como base para generar oligopéptidos que reconocen específicamente el metabolito. Estos oligopéptidos comprenderán, por ejemplo, dominios de unión de la enzima o bolsillos para dicho metabolito. Ensayos basados en enzimas y/o anticuerpos adecuados pueden ser RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), pruebas inmunes de enzimas tipo "sandwich", inmunoensayos de electroluminiscencia tipo "sandwich" (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación potenciado por lantánidos (DELFI) o pruebas inmunes de fase sólida. Asimismo, el metabolito puede ser identificado también basándose en su capacidad para reaccionar con otros compuestos, es decir, mediante una reacción química específica. Las reacciones adecuadas son bien conocidas en el estado de la técnica y, preferiblemente engloban reacciones enzimáticas (por ejemplo para manosa Pitkanen E, Pitkanen O, Uotila L.; *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997 Oct;35(10):761-6; o ácido ascórbico Winnie Lee, Susan M. Roberts y Robert F. Labbe; *Clinical Chemistry* 43: 154-157, 1997), procedimientos espectrofotométricos enzimáticos (BN La Du, RR Howell, PJ Michael y EK Sober; *Pediatrics*, Jan 1963, 39-46, Vol 31, No. 1), procedimientos espectrofluorimétricos (Sumi T, Umeda Y, Kishi Y, Takahashi K, Kakimoto F.; *Clin Chim Acta.* 1976 Dec 1;73(2):233-9) y fluorescencia; quimioluminiscencia.



(J.J. Thiele, H.J. Freisleben, J. Fuchs y F.R. Ochsendorf; Human Reproduction, Vol. 10, No. 1, pp. 110-115, 1995). Se pueden usar otros procedimientos de detección tal como la electroforesis capilar (Hubert A. Carchon y Jaak Jaeken; Clinical Chemistry 47: 1319-1321, 2001) y procedimientos colorimétricos (Kyaw A; Clin Chim Acta. 1978 Jun;86(2):153-7). Además, el metabolito puede ser determinado en una muestra debido a su capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico. La respuesta biológica se detectará como la lectura que indica la presencia y/o la cantidad del metabolito comprendido en la muestra. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la inducción de expresión génica o una respuesta fenotípica de una célula o un organismo.

Asimismo, se ha de entender que dependiendo de la técnica usada para determinar dicho al menos un metabolito, el analito que será detectado podría ser un derivado del metabolito que ocurre fisiológicamente, es decir, el metabolito presente en un sujeto. Dichos analitos pueden ser generados como resultado de la preparación de la muestra o los medios de detección. Los compuestos a los que se refiere el presente documento se consideran analitos. Sin embargo, tal y como se describe anteriormente, estos analitos representarán a los metabolitos de una manera cuantitativa y cualitativa. Igualmente, se ha de entender que para una pluralidad de metabolitos, el metabolito será idéntico al analito.

El término "referencia" se refiere a los resultados, es decir, datos de los rasgos característicos del al menos un metabolito, que pueden ser correlacionados con una predisposición a la diabetes. Dichos resultados de referencia se obtienen, preferiblemente, a partir de una muestra de un sujeto conocido por tener predisposición a la diabetes. Los resultados de referencia se pueden obtener aplicando el procedimiento de la presente invención. De modo alternativo, pero no obstante también preferido, los resultados de referencia se pueden obtener a partir de la muestra de un sujeto conocido por no tener una predisposición a la diabetes, es decir, que no desarrollará la diabetes en el futuro, y, más preferiblemente, también otras enfermedades. Además, la referencia, también preferiblemente, podría ser una referencia calculada, más preferiblemente el promedio o la mediana, para la cantidad relativa o absoluta de un metabolito de una población de individuos (que comprende el sujeto a investigar). Las cantidades relativas o absolutas de los metabolitos de dichos individuos de la población pueden determinarse tal y como se ha especificado en otros lugares en el presente documento. Cómo calcular un valor de referencia adecuado, preferiblemente, el promedio o la mediana, es bien conocido en el estado de la técnica. La población de sujetos a la que se ha hecho referencia previamente comprenderá una pluralidad de sujetos, preferiblemente, al menos 5, 10, 50, 100, 1.000 o 10.000 sujetos. Se ha de entender que el sujeto que va a ser diagnosticado mediante el procedimiento de la presente invención y los sujetos de dicha pluralidad de sujetos son de la misma especie.

Más preferiblemente, los resultados de referencia, es decir, los valores para al menos uno de los rasgos característicos del al menos un metabolito, se almacenarán en un medio de almacenamiento de datos adecuado tales como una base de datos y estarán, por tanto, también disponibles para futuros diagnósticos. Esto también permite diagnosticar de un modo eficaz la predisposición a una enfermedad porque los resultados de referencia adecuados pueden ser identificados en la base de datos una vez que se ha confirmado (en el futuro) que el sujeto del que se obtuvo la muestra de referencia correspondiente (de hecho) desarrolló la diabetes. Los resultados de referencia preferidos que están asociados a la diabetes o la predisposición a la misma en humanos son los mostrados en las Tablas de los Ejemplos adjuntos.

El término "comparar" se refiere que se determinará si los resultados de la determinación descrita anteriormente en el presente documento con detalle, 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 caso de que se obtengan los resultados de referencia de un sujeto del que se sabe que tiene una predisposición a la diabetes, dicha predisposición puede ser diagnosticada basada 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 mencionados anteriormente, es decir, basados en una composición cualitativa o cuantitativa idéntica o similar con respecto del 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. Tal diferencia es, preferiblemente, no significativa y se caracterizará porque los valores para la intensidad están dentro de al menos el intervalo entre el percentil 1 y el percentil 99, el percentil 5 y el percentil 95, el percentil 10 y el percentil 90, el percentil 20 y el percentil 80, el percentil 30 y el percentil 70, el percentil 40 y el percentil 60, del valor de referencia. El percentil 50, 60, 70, 80, 90 o 95 del valor de referencia.

En caso de que los resultados de referencia sean obtenidos de un sujeto o un grupo de sujetos conocidos por no tener una predisposición a la diabetes, dicha predisposición puede ser diagnosticada basada en las diferencias entre los resultados del ensayo obtenidos a partir de la muestra de ensayo y los resultados de referencia mencionados anteriormente, es decir, las diferencias en la composición cualitativa o cuantitativa con respecto del al menos un metabolito. Lo mismo ocurre si se usa una referencia calculada tal y como se ha especificado anteriormente. La diferencia puede ser un aumento de la cantidad absoluta o relativa de un metabolito (algunas veces se denomina regulación por aumento del metabolito; véanse también los Ejemplos) o una disminución de dichas cantidades o la ausencia de una cantidad detectable del metabolito (algunas veces se denomina regulación por aumento del metabolito; véanse también los Ejemplos). Preferiblemente, la diferencia en la cantidad relativa o absoluta es significativa, es decir, fuera del intervalo entre el percentil 45 y el percentil 55, el percentil 40 y el percentil 60, el

percentil 30 y el percentil 70, el percentil 20 y el percentil 80, el percentil 10 y el percentil 90, el percentil 5 y el percentil 95, el percentil 1 y el percentil 99 del valor de referencia. Para metabolitos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria en otros lugares, los valores preferidos para los cambios en las cantidades relativas (es decir, cambios de "número de veces") o el tipo de cambio (es decir, "regulación por aumento o por disminución" que da como resultado una cantidad relativa y/o absoluta mayor o menor) se indican en las Tablas adjuntas, a continuación. Si se indica en dichas las Tablas que un metabolito dado está "regulado por aumento" en un sujeto, la cantidad relativa y/o absoluta aumentará, si está "regulado por disminución", la cantidad relativa y/o absoluta del metabolito disminuirá. Asimismo, el cambio de "número de veces" indica el grado de aumento o disminución, por ejemplo, un aumento de 2 veces significa que la cantidad es el doble de la cantidad del metabolito comparado con la referencia.

Por tanto, el procedimiento de la presente invención en una realización preferida incluye una referencia derivada de un sujeto o un grupo conocido por tener predisposición a la diabetes. Más preferiblemente, resultados idénticos o similares para la muestra de ensayo y dicha referencia (es decir, cantidades relativas o absolutas similares del al menos un metabolito) son indicativos de una predisposición a la diabetes en ese caso. En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, la referencia se deriva de un sujeto o un grupo conocido por no tener predisposición a la diabetes o es una referencia calculada. Más preferiblemente, la ausencia del al menos un metabolito o una cantidad que, preferiblemente de forma significativa, difiere de 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 a la diabetes en tal caso.

La comparación es asistida, preferiblemente, mediante automatización. Por ejemplo, se puede usar un programa de ordenador adecuado que comprende algoritmos para la comparación de dos conjuntos de datos diferentes (por ejemplo, conjuntos de datos que comprenden los valores del rasgo o rasgos característicos). Tales programas de ordenador y algoritmos son bien conocidos en el estado de la técnica. A pesar de lo anterior, también se puede llevar a cabo una comparación de forma manual.

Los procedimientos mencionados anteriormente para la determinación del al menos un metabolito pueden implementarse en un dispositivo. Un dispositivo tal y como se usa en el presente documento comprenderá al menos los medios mencionados anteriormente. Asimismo, el dispositivo preferiblemente comprende, además, medios para la comparación y evaluación del rasgo o rasgos característicos detectados del al menos un metabolito y, también preferiblemente, la intensidad de la señal determinada. Los medios del dispositivo, preferiblemente, están operativamente enlazados entre sí. Cómo enlazar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para determinar cualitativamente o cuantitativamente de modo automático el metabolito, los datos obtenidos mediante dichos medios que operan automáticamente pueden ser procesados mediante, por ejemplo, un programa de ordenador a fin de facilitar el diagnóstico. Preferiblemente, los medios están comprendidos en un único dispositivo en tal caso. Dicho dispositivo puede incluir, de acuerdo con esto, una unidad de análisis para los metabolitos y una unidad de ordenador para procesar los datos resultantes para el diagnóstico. De modo alternativo, cuando se usan medios tales como tiras de ensayo para determinar los metabolitos, los medios para diagnosticar pueden comprender tablas o tiras de control para asignar los datos de resultados determinados a los datos de resultados que son conocidos por ir acompañados de una predisposición a la diabetes o aquellos que son indicativos de un sujeto sin tal predisposición, tal y como se ha discutido previamente. Los dispositivos preferidos son aquellos que pueden ser aplicados sin el conocimiento particular de un médico clínico especializado, por ejemplo, tiras de ensayo o dispositivos electrónicos que simplemente requieren el cargado de una muestra.

De modo alternativo, los procedimientos para la determinación del al menos un metabolito pueden implementarse en un sistema que comprende diversos dispositivos que, preferiblemente, están operativamente enlazados entre sí. Específicamente, los medios deben estar enlazados de tal manera que permita llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, tal y como se describe previamente con detalle. Por tanto, enlazados operativamente, tal y como se usa en el presente documento, preferiblemente significa vinculados funcionalmente. Dependiendo de los medios que se usarán para el sistema divulgado en la presente memoria, dichos medios pueden estar vinculados funcionalmente conectando cada medio con otro mediante medios que permitan el transporte de datos entre dichos medios, por ejemplo, cables de fibra de vidrio, y otros cables para el transporte de datos de alto rendimiento. No obstante, la transferencia de datos inalámbrica entre los medios también está prevista por la presente descripción, por ejemplo, vía LAN (LAN inalámbrica, W-LAN). Un sistema preferido comprende medios para determinar metabolitos. Medios para determinar metabolitos, tal y como se usa en el presente documento, engloban medios para separar metabolitos, tales como dispositivos cromatográficos, y medios para la determinación de metabolitos, tales como dispositivos de espectrometría de masas. Los dispositivos adecuados se han descrito previamente con detalle. Los medios preferidos para la separación de compuestos que se usarán en el sistema divulgado en la presente memoria incluyen dispositivos cromatográficos, más preferiblemente dispositivos para cromatografía líquida, HPLC, y/o cromatografía de gases. Los dispositivos preferidos para la determinación de compuestos comprenden dispositivos de espectrometría de masas, más preferiblemente, GC-MS, LC-MS, espectrometría de masas de infusión directa, FT-ICR-MS, CE-MS, HPLC-MS, espectrometría de masas de cuadrúpolo, espectrometría de masas secuencialmente acoplada (que incluyen MS-MS o MS-MS-MS), ICP-MS, Py-MS o TOF. Los medios de separación y determinación, preferiblemente, están acoplados unos a otros. Más preferiblemente, se usa LC-MS y/o

GC-MS en el sistema divulgado en la presente memoria tal y como se describe con detalle en otros lugares de la memoria. Además, estarán comprendidos los medios para comparar y/o analizar los resultados obtenidos a partir de los medios para la determinación de los metabolitos. Los medios para comparar y/o analizar los resultados pueden comprender al menos una base de datos y un programa de ordenador implementado para la comparación de los resultados. Además, las descripciones de los sistemas y dispositivos mencionados anteriormente se describen también con detalle a continuación.

De forma ventajosa, se ha encontrado que, de acuerdo con la presente invención, el al menos uno de los metabolitos mencionados anteriormente será un biomarcador adecuado para una predisposición a la diabetes. La aplicación de estos metabolitos como biomarcadores permite un diagnóstico de una predisposición a la diabetes rápido, fiable y rentable. Asimismo, el procedimiento puede ser asistido mediante automatización tal y como se describe en otros lugares en esta descripción y, por tanto, permite el cribado de alto rendimiento para los sujetos que están en riesgo de sufrir diabetes. De este modo, el procedimiento de la presente invención puede ayudar a los programas de salud para la prevención de la diabetes y se puede usar para supervisar el éxito de las terapias preventivas de la diabetes u otras medidas para la prevención de la diabetes que incluyen las dietas nutricionales. Asimismo, los metabolitos o combinaciones de los metabolitos a los que se refiere el presente documento pueden determinarse de forma simultánea y de un modo eficaz en cuanto tiempo y costes mediante las técnicas de perfiles metabólicos descritas en la presente memoria. Además, el procedimiento de la presente invención permite determinar el riesgo para un sujeto de ser o llegar a ser miembro de un determinado grupo de riesgo de diabetes, es decir, IFG, IGT o IFG&IGT. La prevalencia comunicada de IFG e IGT varía ampliamente entre un 5 y un 26 % dependiendo de la distribución de sexos, la edad y el grupo étnico. Ambos grupos de riesgo, IFG e IGT se esperan que aumenten en un futuro próximo. Para ambos grupos de riesgo, IFG o IGT, se ha comunicado que un 25 % progresará hacia diabetes incidente en 3-5 años, con un 50 % que permanecerá en su estado glucémico anormal y un 25 % que volverá a los niveles normales de glucosa. Con una observación más larga, la mayoría de individuos con IFG o IGT parece que desarrollarán la diabetes. Los individuos con ambos IFG e IGT (IFG&IGT) tienen aproximadamente una tasa doble de desarrollar la diabetes comparados con los sujetos que tienen IFG o IGT (Nathan 2007, *Diabetes Care* 30(3): 753-759).

Las explicaciones e interpretaciones de los términos previamente efectuadas se aplica, en consecuencia con esto, a las otras realizaciones y descripciones especificadas en el presente documento a continuación.

En una divulgación adicional del procedimiento de la presente memoria, dicho al menos un metabolito se selecciona de entre el grupo que consiste en: diacilglicérido (C18:1,C18:2) y triacilglicérido (C16:0,C18:2,C18:2).

Cada uno de dicho metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para la predisposición a la que se refiere el presente documento. Sin embargo, más preferiblemente, un grupo de biomarcadores que incluyen biomarcadores de uno de los grupos mencionados anteriormente se determinará por el procedimiento divulgado en la presente memoria. Un grupo de biomarcadores consiste, preferiblemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferiblemente, hasta todos los biomarcadores mencionados previamente. Además, se ha encontrado que en el estudio que subyace a la presente descripción que los metabolitos de los grupos mencionados anteriormente son en particular muy adecuados como biomarcadores para una predisposición a la diabetes en individuos de sexo masculino. De acuerdo con esto, el sujeto que va a ser diagnosticado de acuerdo con la presente descripción es, en el contexto de la descripción preferida mencionada anteriormente, más preferiblemente un sujeto de sexo masculino.

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

Espectrometría de masas tal y como se usa en el presente documento, engloba todas las técnicas que permiten la determinación del peso molecular (es decir, la masa) o una masa variable correspondiente a un compuesto, es decir, un metabolito, que se determinará de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, espectrometría de masas, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a GC-MS, LC-MS, espectrometría de masas de infusión directa, FT-ICR-MS, CE-MS, HPLC-MS, espectrometría de masas de cuadrúpolo, cualquiera espectrometría de masas acoplada secuencialmente tales como MS-MS o MS-MS-MS, ICP-MS, Py-MS, TOF o cualquier planteamiento combinado que use las técnicas mencionadas anteriormente. Cómo aplicar estas técnicas es bien conocido por la persona experta en la materia. Asimismo, los dispositivos adecuados están disponibles comercialmente. Más preferiblemente, espectrometría de masas, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a LC-MS y/o GC-MS, es decir, a la espectrometría de masas que está operativamente enlazada con una etapa de separación cromatográfica previa. Más preferiblemente, espectrometría de masas, tal y como se usa en el presente documento, engloba MS de cuadrúpolo. Más preferiblemente, dicha MS de cuadrúpolo se lleva a cabo tal como sigue:

a) selección de un cociente masa/carga ( $m/z$ ) de un ion creado por ionización en un primer cuadrúpolo analítico del espectrómetro de masas, b) fragmentación del ion seleccionado en la etapa a) aplicando un voltaje de aceleración en un cuadrúpolo posterior adicional que está lleno de un gas de colisión y actúa como una cámara de colisión, selección de un cociente masa/carga de un ion creado mediante el proceso de fragmentación de la etapa b) en un cuadrúpolo posterior adicional, donde las etapas a) a c) del procedimiento se llevan a cabo al menos una vez y análisis del cociente masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias como resultado del proceso de ionización, donde el cuadrúpolo se llena con gas de colisión pero no se aplica voltaje de aceleración

durante el análisis. Detalles sobre dicha espectrometría de masas más preferida que se usará de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en el documento WO 03/073464.

Más preferiblemente, dicha espectrometría de masas es cromatografía líquida (LC) MS y/o cromatografía de gases (GC) MS. Cromatografía líquida, tal y 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 porque los compuestos en una fase móvil se pasan a través de la fase estacionaria. Cuando los compuestos pasan a través de la fase estacionaria a diferentes velocidades llegan a separarse en el tiempo ya que cada compuesto individual tiene su tiempo de retención específico (es decir, el tiempo que requiere el compuesto para pasar a través del sistema). Cromatografía líquida, tal y como se usa en el presente documento, también incluye HPLC. Los dispositivos para cromatografía líquida están disponibles comercialmente, por ejemplo de Agilent Technologies, EE.UU. La cromatografía de gases tal y como se aplica de acuerdo con la presente invención, en principio, opera de modo comparable a la cromatografía líquida. Sin embargo, en lugar de tener los compuestos (es decir, los metabolitos) en una fase móvil líquida se pasa a través de la fase estacionaria, los compuestos estarán presentes en un volumen gaseoso. Los compuestos pasan a través de la columna que puede contener materiales de soporte sólidos como fase estacionaria o las paredes de la misma pueden servir como fase estacionaria o están cubiertas con la misma. Nuevamente, cada compuesto tiene un tiempo específico requerido para pasar a través de la columna. Asimismo, en el caso de la cromatografía de gases se contempla preferiblemente que los compuestos están derivatizados antes de la cromatografía de gases. Las técnicas adecuadas para la derivatización son bien conocidas en el estado de la técnica. Preferiblemente, la derivatización de acuerdo con la presente invención se refiere a metoximación y trimetilsililación, preferiblemente, de compuestos polares y transmetilación, metoximación y trimetilsililación, preferiblemente, de compuestos no polares (es decir, lipófilos).

Además, la presente memoria divulga una recopilación de datos que comprende valores característicos de al menos un metabolito que es indicativa de una predisposición a la diabetes, seleccionándose dicho metabolito de entre uno cualquiera de los grupos a los que se hace referencia previamente.

El término "recopilación de datos" se refiere a una colección de datos que pueden ser agrupados físicamente y/o lógicamente de modo conjunto. De acuerdo con esto, la recopilación de datos puede implementarse en un único medio de almacenamiento de datos o en medios de almacenamiento de datos separados físicamente que están operativamente enlazados entre sí. Preferiblemente, la recopilación de datos se implementa por medio de una base de datos. Por tanto, una base de datos, tal y como se usa en el presente documento, comprende la recopilación de datos en un medio de almacenamiento adecuado. Asimismo, las bases de datos, preferiblemente, comprenden además un sistema de gestión de bases de datos. El sistema de gestión de bases de datos es, preferiblemente, un sistema de gestión de bases de datos en red, jerárquico u orientado a objetos. Además, las bases de datos pueden ser una base de datos federal o integrada. Más preferiblemente, la base de datos será implementada como un sistema distribuido (federal), por ejemplo, como un Sistema Cliente-Servidor. Más preferiblemente, la base de datos se estructura de modo que permita un algoritmo de búsqueda para comparar un conjunto de datos de ensayo con los conjuntos de datos comprendidos en la recopilación de datos. Específicamente, usando tal algoritmo, se puede buscar en la base de datos conjuntos de datos similares o idénticos que son indicativos de la diabetes o una predisposición a la misma (por ejemplo una búsqueda de consulta (*query search*)). Por tanto, si se puede identificar un conjunto de datos similares o idéntico en la recopilación de datos, el conjunto de datos de ensayo se asociará a una predisposición a la diabetes. En consecuencia, la información obtenida a partir de la recopilación de datos se pueden usar para diagnosticar una predisposición a la diabetes basándose en un conjunto de datos de ensayo obtenidos de un sujeto. Más preferiblemente, la recopilación de datos comprende valores característicos de todos los metabolitos comprendidos en uno cualquiera de los grupos enumerados previamente.

A la luz de lo anterior, la presente memoria divulga además un medio de almacenamiento de datos que comprende la recopilación de datos mencionada anteriormente.

El término "medio de almacenamiento de datos", tal y como se usa en el presente documento, engloba medios de almacenamiento de datos que están basados en entidades físicas individuales tales como un CD, un CD-ROM, un disco duro, medios de almacenamiento óptico, o un disquete. Igualmente, el término incluye además medios de almacenamiento de datos que consisten en entidades físicamente separadas que están operativamente enlazadas entre sí de tal modo que proporcionan la recopilación de datos mencionada anteriormente, preferiblemente, en un modo adecuado para una búsqueda de consulta (*query search*).

La descripción también se refiere a un sistema que comprende:

- (a) medios para comparar valores característicos de los metabolitos de una muestra operativamente enlazados a
- (b) un medio de almacenamiento de datos tal y como se describe previamente.

El término "sistema", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a diferentes medios que están operativamente enlazados entre sí. Dichos medios pueden implementarse en un único dispositivo o pueden ser dispositivos físicos separados que están operativamente enlazados entre sí. Los medios para comparar valores

característicos de los metabolitos operan, preferiblemente, basados en un algoritmo para la comparación tal y como se menciona anteriormente. El medio de almacenamiento de datos, preferiblemente, comprende la recopilación de datos o la base de datos mencionada anteriormente, siendo cada uno de los conjuntos de datos almacenados indicativo de una predisposición a la diabetes. Por tanto, el sistema divulgado en la presente memoria permite  
5 identificar si un conjunto de datos de ensayo está comprendido en la recopilación de datos almacenada en el medio de almacenamiento de datos. En consecuencia, el sistema de la presente descripción puede aplicarse como un medio de diagnóstico en el diagnóstico de una predisposición a la diabetes.

En una descripción adicional del sistema, están comprendidos los medios para determinar valores característicos de los metabolitos de una muestra.

10 La expresión "medios para determinar valores característicos de los metabolitos" preferiblemente se refiere a los dispositivos mencionados anteriormente para la determinación de los metabolitos tales como dispositivos de espectrometría de masas, dispositivos de NMR o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los metabolitos.

Adicionalmente, la presente memoria divulga un medio de diagnóstico que comprende medios para la determinación de al menos un metabolito seleccionado de entre uno cualquiera de los grupos a los que se hace referencia  
15 anteriormente.

El término "medios de diagnóstico", preferiblemente, se refiere a un dispositivo de diagnóstico, sistema o ensayo biológico o químico, tal y como se ha especificado en otros lugares de la descripción con detalle.

La expresión "medios para la determinación de al menos un metabolito" se refiere a dispositivos o agentes que son capaces de reconocer específicamente el metabolito. Los dispositivos adecuados pueden ser dispositivos  
20 espectrométricos tales como espectrometría de masas, dispositivos de NMR o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los metabolitos. Agentes adecuados pueden ser compuestos que detectan específicamente los metabolitos. La detección, tal y como se usa en el presente documento, puede ser un proceso en dos etapas, es decir, el compuesto inicialmente puede unirse específicamente al metabolito a detectar y posteriormente generar una señal detectable, por ejemplo, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales radiactivas y similares. Para la generación de la señal detectable pueden ser necesarios compuestos  
25 adicionales que están todos comprendidos en el término "medios para la determinación del al menos un metabolito". Compuestos que se unen específicamente al metabolito se divulgan en otros lugares de la memoria con detalle e incluyen, preferiblemente, enzimas, anticuerpos, ligandos, receptores u otras moléculas biológicas o agentes químicos que se unen específicamente a los metabolitos.  
30

Además, la presente memoria divulga una composición de diagnóstico que comprende al menos un metabolito seleccionado de entre uno cualquiera de los grupos a los que se hace referencia anteriormente.

El al menos un metabolito seleccionado de entre cualquiera de los grupos mencionados anteriormente servirá como biomarcador, es decir, una molécula indicadora de una condición de riesgo en el sujeto, es decir, la predisposición a  
35 la diabetes. Por tanto, las moléculas de metabolito por sí mismas pueden servir como composiciones de diagnóstico, preferiblemente, tras la visualización o la detección por los medios a los que se hace referencia en el presente documento. Por tanto, una composición de diagnóstico que indica la presencia de un metabolito de acuerdo con la descripción de la presente solicitud puede comprender también físicamente dicho biomarcador, por ejemplo, un complejo de un anticuerpo y el metabolito a detectar puede servir como composición de diagnóstico. De acuerdo con  
40 esto, la composición de diagnóstico puede comprender, además, medios para la detección de los metabolitos, tal y como se ha especificado en otros lugares en esta descripción. De modo alternativo, si se usan medios de detección tales como las técnicas basadas en MS o NMR, las especies moleculares que sirven como indicador de la condición de riesgo serán el al menos un metabolito comprendido en la muestra de ensayo a investigar. Por tanto, el al menos un metabolito al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención servirá por sí mismo como  
45 composición de diagnóstico debido a su identificación como biomarcador.

Por último, la presente memoria divulga el uso de al menos un metabolito o medios para la determinación del mismo para la fabricación de un dispositivo o una composición de diagnóstico para diagnosticar una predisposición a la diabetes, en el que dicho al menos un metabolito es seleccionado de entre uno cualquiera de los grupos a los que se hace referencia anteriormente.

50 Como ya se ha especificado anteriormente, cada uno de dicho metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para una predisposición de las enfermedades a las que se refiere el presente documento. Sin embargo, más preferiblemente, se determinará por el procedimiento de la presente invención un grupo de biomarcadores que incluyen biomarcadores de uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente. Un grupo de biomarcadores consiste, preferiblemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferiblemente, hasta todos los  
55 biomarcadores mencionados previamente.

Todas las referencias a las que se remite previamente se incorporan en el presente documento por referencia con respecto a su contenido total de la descripción así como su contenido específico de la descripción a los que se hace referencia explícitamente en la descripción anterior.

5 La invención será ilustrada a continuación por los siguientes Ejemplos que no pretenden restringir ni limitar el ámbito de la presente invención.

### Ejemplo 1: Determinación de los metabolitos

10 Se informó a los voluntarios sobre los exámenes planeados. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión del Dife (Instituto alemán de nutrición humana), y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito. Después, se midieron los valores antropométricos y el espesor medio de la íntima. Tras estos exámenes se efectuó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) con 75 g de glucosa. Se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60 y 120 minutos. Los voluntarios fueron clasificados mediante los criterios de la OMS y la ADA. Se obtuvo el plasma a partir de sangre completa mediante la adición de EDTA como anticoagulante y posterior centrifugación.

Se prepararon las muestras y se sometieron a análisis LCMS y GCMS tal y como se describe a continuación:

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

20 Para la transmetanólisis de los extractos lipídicos, 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 al extracto evaporado. El recipiente se selló herméticamente y se calentó durante 2 horas a 100 °C, con agitación. A continuación se evaporó la solución a sequedad. El residuo se secó completamente.

25 La metoximación de los grupos carbonilo se llevó a cabo mediante la reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 100 µl durante 1,5 horas a 60 °C) en un recipiente sellado herméticamente. Se añadieron 20 µl de una solución de ácidos grasos de cadena lineal y número impar (solución de cada 0,3 mg/ml de ácidos grasos con de 7 a 25 átomos de carbono y cada 0,6 mg/ml de ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) de piridina/tolueno) como estándares de tiempo. Finalmente, se efectuó 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 sellado herméticamente. El volumen final antes de la inyección en el GC fue de 220 µl.

30 Para la fase polar, la derivatización se efectuó del siguiente modo: La metoximación de los grupos carbonilo se llevó a cabo mediante la reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 50 µl durante 1,5 horas a 60 °C) en un recipiente sellado herméticamente. Se añadieron 10 µl de una solución de ácidos grasos de cadena lineal y número impar (solución de cada 0,3 mg/ml de ácidos grasos con de 7 a 25 átomos de carbono y cada 0,6 mg/ml de ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3/7 (v/v) de piridina/tolueno) como estándares de tiempo. Finalmente, la derivatización con 50 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) se efectuó durante 30 minutos a 60 °C, nuevamente en el recipiente sellado herméticamente. El volumen final antes de la inyección en el GC fue de 110 µl.

Los sistemas GC-MS consistían en un GC Agilent 6890 acoplado a un MSD Agilent 5973. Los automuestreadores son CompiPal o GCPal de CTC.

40 Para el análisis se usaron columnas de separación capilar comerciales habituales (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) con diferentes fases estacionarias de poli-metil-siloxano que contenían de un 0 % hasta un 35 % de restos aromáticos, dependiendo de los materiales de muestra analizados y las fracciones de la etapa de separación de fases, (por ejemplo: DB-1ms, HP-5ms, DB-XLB, DB-35ms, Agilent Technologies). Se inyectó sin división hasta 1 µl del volumen final y el programa de temperatura en el horno se inició a 70 °C y se finalizó a 340 °C con diferentes velocidades de calentamiento dependiendo del material de muestra y la fracción de la etapa de separación de fases, a fin de conseguir suficiente separación cromatográfica y número de escaneos en cada pico de analito. Además se usó RTL (*Retention Time Locking* o Congelamiento del tiempo de retención, Agilent Technologies) para el análisis y las condiciones de GC-MS estándar habituales, por ejemplo, flujo constante con nominal 1 a 1,7 ml/min y helio como el gas de la fase móvil, la ionización se efectuó mediante impacto de electrones con 70 eV, escaneando en un intervalo m/z de 15 a 600 con velocidades de escaneo de 2,5 a 3 escaneos/segundo y condiciones de ajuste estándar.

50 Los sistemas HPLC-MS consistían en un sistema Agilent 1100 LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas API 4000 (Applied Biosistema/MDS SCIEX, Toronto, Canadá). El análisis de HPLC se efectuó en columnas de separación de fase inversa comercialmente disponibles con fases estacionarias C18 (por ejemplo: GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18). Se inyectaron hasta 10 µl del volumen final de muestra y se efectuó la separación con elución en gradiente usando gradientes de metanol/agua/ácido fórmico o acetonitrilo/agua/ácido fórmico a una velocidad de flujo de 200 µl/min.

55

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 un modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) y un escaneo completo de 100 -1000 uma.

**Ejemplo 2: Evaluación de los datos**

- 5 Las mediciones de GC-y LC-MS de todas las muestras de plasma sanguíneo de sujetos en riesgo (sujetos con alto riesgo de desarrollar la diabetes; ya sean "IFG": sujetos sin diabetes con IFG positivo, o "IGT": sujetos sin diabetes con IGT positivo, o "IFG&IGT": sujetos sin diabetes con IFG e IGT positivos) y sujetos de control se efectuaron conjuntamente con referencias de plasma agrupado. Para cada lote de mediciones, se calcularon las relaciones de señal relativas de los sujetos individuales.
- 10 Los metabolitos específicos del riesgo se determinaron mediante un modelo lineal de las relaciones de señal de los metabolitos por el riesgo del factor ternario (niveles: IFG, IGT, IFG&IGT) corrigiendo para los factores de confusión edad e IMC (índice de masa corporal) y también incorporando los dos géneros diferentes: en primer lugar se generó un modelo lineal con los factores recién mencionados, en segundo lugar se evaluaron los efectos estimados mediante estadística t, en tercer lugar se seleccionaron solamente metabolitos con un valor p de la estadística t < 0,05 referente a los niveles de factor de riesgo y las interacciones entre el género y los niveles de factor de riesgo.
- 15 Además, se determinó el tipo de regulación para cada metabolito como "aumento" para incrementos de las relaciones > 1 del nivel de riesgo respectivo frente al control y "disminución" para reducciones de las relaciones < 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 no han sido comunicados aún para pacientes con diabetes. Los metabolitos a los que se hace referencia en las Tablas 3 a 5 ya se han descrito para pacientes con diabetes. Las Tablas 1 y 3 listan metabolitos significativos con respecto al efecto principal "riesgo", especificando los respectivos niveles de los factores significativos IFG, IGT, e IFG&IGT (estadística t). Las Tablas 2, 4 y 5 listan metabolitos significativos con respecto a la interacción del riesgo y el género, es decir, metabolitos que muestran regulación diferencial específica del sexo entre los sujetos de control y los sujetos en riesgo. Los resultados presentados en las Tablas se clasifican de acuerdo con su potencial y eficacia como biomarcadores para la diabetes o una predisposición a la misma. El tipo de regulación observado se indica también. "Aumento" se refiere a un aumento de la cantidad absoluta o relativa del metabolito, mientras que "disminución" se refiere a una disminución de dicha cantidad absoluta o relativa o incluso la ausencia del metabolito en cantidades detectables. Los metabolitos que están en particular fuertemente asociados con la diabetes se subdividen en grupos indicados por las líneas divisorias en las Tablas. Asimismo, se indica en las Tablas el grupo de riesgo, es decir, IFG, IGT o IFG&IGT.

Tabla 1: Resultados globales. Metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT e IFG&IGT) y los de control (efecto principal "riesgo" significativo, es decir, el mismo tipo de regulación ("aumento, "disminución") en sujetos masculinos y femeninos). Metabolitos clasificados por el valor p. [IFG = Glucemia basal alterada; IGT = Tolerancia a la glucosa alterada; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG e IGT]

metabolito	regulación	grupo_de_riesgo
Criptoxantina	disminución	IGT
ácido 2-hidroxi-palmitico	aumento	IFG
triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18:2)	aumento	IGT
ácido gondoico	aumento	IGT
ácido tricosanoico	disminución	IFG&IGT
5-oxoprolina	aumento	IFG

Tabla 2: Metabolitos que difieren específicamente entre pacientes masculinos de control y pacientes masculinos de los grupos de riesgo para la diabetes. Metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la interacción riesgo-género, es decir, regulados de forma diferente en los sujetos masculinos y femeninos con respecto al riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT e IFG&IGT) y los de control. Metabolitos clasificados por el valor p. [IFG = Glucemia basal alterada; IGT = Tolerancia a la glucosa alterada; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG e IGT]

Metabolito	reg_masculina	grupo_de_riesgo
diacilglicérido (C18:1,C18:2)	disminución	IGT
triacilglicérido (C16:0,C18:2,C18:2)	disminución	IGT

triacilglicérido (C16:0,C18:1,C18:2)      disminución      IFG

Tabla 3: Resultados globales. Metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT e IFG&IGT) y los de control (efecto principal "riesgo" significativo, es decir, el mismo tipo de regulación ("aumento", "disminución") en sujetos masculinos y femeninos). Metabolitos clasificados por el valor p. [IFG = Glucemia basal alterada; IGT = Tolerancia a la glucosa alterada; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG e IGT]

5

<b>Metabolito</b>	<b>regulación</b>	<b>grupo_de_riesgo</b>
lactato	aumento	IFG
ácido alfa-cetoisocaproico	disminución	IGT
glucosa	aumento	IFG&IGT
metionina	disminución	IGT
manosa	aumento	IFG&IGT
ácido 3-hidroxibutírico	aumento	IGT
leucina	aumento	IGT
ácido úrico	aumento	IFG
ácido treónico	aumento	IFG
beta-caroteno	disminución	IFG&IGT
ácido ascórbico	aumento	IFG&IGT
glicina	disminución	IGT
triacilglicéridos	disminución	IFG
lactato	aumento	IGT
fosfolípidos	aumento	IGT
creatinina	disminución	IGT
glutamato	aumento	IFG
ácido alfa-cetoisocaproico	disminución	IFG&IGT
triacilglicéridos	aumento	IGT
valina	aumento	IGT
malato	aumento	IFG
ácido alfa-cetoisocaproico	disminución	IFG
isoleucina	aumento	IGT
succinato	aumento	IFG
glucosa-1-fosfato	aumento	IFG&IGT
valina	aumento	IFG&IGT
ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5)	disminución	IFG&IGT
fosfolípidos	aumento	IFG
ácido úrico	aumento	IFG&IGT
citrato	aumento	IGT



<b>Metabolito</b>	<b>regulación</b>	<b>grupo_de_riesgo</b>
asparagina	disminución	IFG&IGT
metionina	disminución	IFG
glutamina	disminución	IGT
ácido palmítico	aumento	IGT
triptófano	disminución	IFG&IGT
alanina	aumento	IGT
glutamato	aumento	IGT
citrulina	disminución	IGT
colesteno	disminución	IFG&IGT
treonina	disminución	IGT
ornitina	aumento	IFG
arginina	disminución	IGT
manosa	aumento	IFG
ácido 3-hidroxi-butírico	aumento	IFG&IGT
glutamina	disminución	IFG
sulfato de pregnenolona	aumento	IFG&IGT
ácido glicérico	aumento	IGT
folato	aumento	IFG
malato	aumento	IGT
beta-caroteno	disminución	IFG
leucina	aumento	IFG
glutamina	disminución	IFG&IGT
alfa-tocoferol	aumento	IFG&IGT
mio-inositol	aumento	IFG
ácido esteárico	aumento	IGT
glicerol-3-fosfato	aumento	IFG
beta-caroteno	disminución	IGT

Tabla 4: Metabolitos que difieren específicamente entre pacientes masculinos de control y pacientes masculinos de los grupos de riesgo para la diabetes. Metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la interacción riesgo-género, es decir, regulados de forma diferente en los sujetos masculinos y femeninos con respecto al riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT e IFG&IGT) y los de control. Metabolitos clasificados por el valor p. [IFG = Glucemia basal alterada; IGT = Tolerancia a la glucosa alterada; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG e IGT]

5

<b>Metabolito</b>	<b>reg_masculina</b>	<b>grupo_de_riesgo</b>
triptófano	disminución	IGT
alanina	disminución	IFG
leucina	disminución	IGT

<b>Metabolito</b>	<b>reg_masculina</b>	<b>grupo_de_riesgo</b>
ácido palmítico	disminución	IFG
ácido eicosatrienoico	disminución	IGT
glicerofosfolípidos	disminución	IGT
isoleucina	disminución	IFG
ácido eicosatrienoico	disminución	IFG
triptófano	disminución	IFG
ácido lignocérico	disminución	IGT
ácido linoleico	disminución	IGT
serina	aumento	IFG
tirosina	disminución	IGT
ácido linoleico	disminución	IFG
sulfato de pregnenolona	disminución	IGT
aspartato	aumento	IGT
ácido araquidónico	disminución	IGT
succinato	aumento	IFG&IGT

5 Tabla 5: Metabolitos que difieren específicamente entre pacientes femeninos de control y pacientes femeninos de los grupos de riesgo para la diabetes. Metabolitos que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a la interacción riesgo-género, es decir, regulados de forma diferente en los sujetos masculinos y femeninos con respecto al riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (IFG, IGT e IFG&IGT) y los de control. Metabolitos clasificados por el valor p. [IFG = Glucemia basal alterada; IGT = Tolerancia a la glucosa alterada; IFG&IGT: pacientes que tienen ambos IFG e IGT]

<b>Metabolito</b>	<b>reg_femenina</b>	<b>grupo_de_riesgo</b>
alanina	aumento	IFG
ácido palmítico	aumento	IFG
isoleucina	aumento	IFG
ácido eicosatrienoico	aumento	IFG
ácido úrico	aumento	IFG
ácido esteárico	aumento	IFG
serina	disminución	IFG

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 que comprende:
- 5 (a) la determinación de al menos un metabolito que es el ácido gondoico en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto del que se sospecha que tiene una predisposición a la diabetes tipo 2; y  
 (b) la comparación de los resultados del ensayo de la determinación de la etapa (a) con una referencia, por lo que se diagnosticará una predisposición a la diabetes tipo 2 si dicha muestra de sangre, suero o plasma comprende una cantidad incrementada de ácido gondoico en comparación con una referencia derivada de un sujeto o un grupo conocido por no tener predisposición a la diabetes tipo 2.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa b) es: comparación de los resultados del ensayo de la determinación de la etapa (a) con una referencia, por lo que se diagnosticará una predisposición a la diabetes tipo 2, en el que dicha referencia se deriva de un sujeto o un grupo conocido por no tener predisposición a la diabetes tipo 2; y por lo que un aumento en la muestra de sangre, suero o plasma en comparación con la muestra de referencia es indicativo de predisposición a diabetes tipo 2.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha determinación de dicho al menos un metabolito comprende espectrometría de masas (MS).
- 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha espectrometría de masas es cromatografía líquida (LC) MS y/o cromatografía de gases (GC) MS.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto es un ser humano.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se determina al menos un metabolito adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- 25 (i) un ácido graso saturado de cadena larga, preferiblemente, ácido Lignocérico (C24:0), ácido Melísico (C30:0), o ácido Tricosanoico (C23:0),  
 (ii) un ácido graso poliinsaturado, preferiblemente, ácido Docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido Eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido Araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido Linoleico (C18:cis[9,12]2), o ácido Linolénico (C18:cis[9,12,15]3),  
 30 (iii) un aminoácido, preferiblemente, Lisina, Alanina, Treonina, Triptófano, Valina, Isoleucina, Leucina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Fenilalanina, Glicina, Prolina, o Glutamina,  
 (iv) un antioxidante, preferiblemente, Ácido ascórbico, Coenzima Q10, o alfa-Tocoferol,  
 (v) un metabolito del Ciclo del Ácido Cítrico, preferiblemente, Piruvato, Citrato, o Malato,  
 (vi) un metabolito del Ciclo de la Urea, preferiblemente, Urea, Citrulina, Succinato, u Ornitina,  
 35 (vii) Manosa, ácido alfa-Cetoisocaproico, Glicerol, fracción lipídica, o ácido 3-Hidroxi-butírico, y  
 (viii) glucosa,  
 en el que el sujeto es un sujeto masculino en caso de que el al menos un metabolito sea ácido Lignocérico (C24:0), ácido Linoleico (C18:cis[9,12]2), Leucina, Tirosina, o Succinato.
- 40 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se determina al menos un metabolito adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en: ácido 3-hidroxi-butírico, alanina, ácido alfa-cetoisocaproico, alfa-tocoferol, arginina, ácido ascórbico, asparagina, beta-caroteno, colesteno, citrato, citrulina, creatinina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), folato, glucosa, glucosa-1-fosfato, glutamato, glutamina, ácido glicérico, glicerol-3-fosfato, glicina, isoleucina, lactato, leucina, malato, manosa, metionina, mio-inositol, ornitina, ácido palmítico, fosfolípidos, sulfato de pregnenolona, ácido esteárico, succinato, ácido treónico, treonina, triacilglicéridos,  
 45 triptófano, ácido úrico, y valina.
8. Uso de una composición de diagnóstico que comprende ácido gondoico para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2 mediante la determinación del ácido gondoico como biomarcador en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto, en el que se diagnostica una predisposición a la diabetes tipo 2 si dicha muestra de sangre, suero o plasma comprende una cantidad incrementada de ácido gondoico en comparación con una referencia derivada de un sujeto o un grupo conocido por no tener predisposición a la diabetes tipo 2.
- 50 9. Uso del ácido gondoico medido en una muestra de sangre, suero o plasma como biomarcador para diagnosticar una predisposición a la diabetes tipo 2, por lo que se diagnostica una predisposición a la diabetes tipo 2 si dicha muestra de sangre, suero o plasma comprende una cantidad incrementada de ácido gondoico en comparación con una referencia derivada de un sujeto o un grupo conocido por no tener predisposición a la diabetes tipo 2.
- 55