

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 345**

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 10196430 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2330423**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico de diabetes de tipo II**

30 Prioridad:

24.03.2006 EP 06111705
07.09.2006 EP 06120273

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

22.12.2014

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 2 525 345 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico de diabetes de tipo II

5 La presente invención se refiere a un procedimiento, preferiblemente a un procedimiento *ex vivo*, para el diagnóstico de la diabetes o de una predisposición a la misma, que comprende la determinación de al menos un metabolito en una muestra de prueba de un sujeto sospechoso de padecer diabetes, y la comparación de dicho al menos un metabolito con una referencia, mediante lo cual se va a diagnosticar la diabetes o una predisposición a la misma. Además, la presente divulgación engloba a un conjunto de metabolitos, un conjunto de datos que comprende los valores característicos de los metabolitos y un medio de almacenamiento que comprende dicho conjunto de datos. Adicionalmente, la presente divulgación también se refiere a un sistema que comprende un medio para la comparación de los valores característicos de los metabolitos de una muestra conectados operativamente a un medio de almacenamiento de datos. Adicionalmente están englobados por la presente invención los medios diagnósticos que comprenden al menos un metabolito y el uso de dicho al menos un metabolito para la creación de un medio diagnóstico para el diagnóstico de la diabetes. Finalmente, la presente divulgación pertenece a un procedimiento para la identificación de los metabolitos relacionados con la diabetes.

15 La predisposición a la diabetes sacarina ha alcanzado aproximadamente un 6 % en el mundo industrializado, y aumentará hasta 366 millones de personas afectadas en todo el mundo en 2030. La razón más frecuente (tipo), (aproximadamente el 90 %) de la diabetes en el mundo supone la diabetes de tipo 2, que tiene una patogenia multifactorial. La secuencia patológica de la diabetes de tipo 2 implica muchos elementos. Se cree que es obligatorio tener una predisposición genética que actualmente es poco comprendida. La posterior aparición de un fenotipo de diabetes dependerá de muchos factores medioambientales que comparten la capacidad de estresar el sistema de homeostasis de la glucosa, tanto provocando como empeorando la resistencia a la insulina o deteriorando la secreción de insulina. Por supuesto hay muchas hormonas implicadas en la regulación del metabolismo de la glucosa, pero la hormona clave es la insulina. La normogluceemia es mantenida por la interacción equilibrada entre la acción de la insulina y la secreción de insulina. La insulina es producida por las células pancreáticas β , que son capaces de regular muy rápidamente las diferentes demandas de glucosa. La razón principal de la diabetes de tipo 2 es una creciente resistencia a la insulina. Por lo tanto, la acción de la insulina normalmente descenderá, pero inicialmente el sistema es capaz de compensar esto mediante un aumento de la función de las células β . En este momento quizás sólo podría medirse una alteración en la glucosa en ayunas o una tolerancia alterada a la glucosa en la OGTT (prueba de tolerancia a la glucosa oral). Pero con el tiempo las células β estarán sobreestresadas por un aumento en la resistencia a la insulina y podría diagnosticarse una toxicidad por glucosa y una diabetes de tipo 2.

20 Aparte de los problemas médicos directos de un azúcar sanguíneo alto o bajo, la principal carga médica y socioeconómica de la enfermedad está causada por las complicaciones asociadas. Las devastadoras complicaciones de la diabetes sacarina son en su mayor parte enfermedades macrovasculares y microvasculares, insuficiencia renal crónica, retinopatía, neuropatía periférica y autónoma o infarto de miocardio. Por lo tanto, la morbilidad cardiovascular en los pacientes con diabetes de tipo 2 es entre dos y cuatro veces mayor que la de las personas no diabéticas (Stumvoll y col., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, Lancet 2005).

25 A la luz este mecanismo, las terapias de la diabetes se basan actualmente en la monitorización de los niveles sanguíneos de azúcar y en la reducción de un elevado nivel sanguíneo de azúcar hasta unos niveles normales mediante la administración de insulina exógena. En este punto, la insulina exógena se inyecta en la sangre. Alternativamente, los niveles de glucosa en la sangre pueden ser regulados mediante dietas nutricionales y la exclusión de factores de riesgo del estilo de vida, tales como el hábito tabáquico, la ausencia de ejercicio, unos elevados niveles de colesterol y un peso corporal inestable.

30 El Comité de Expertos de la ADA (American Diabetes Association) ha reconocido un grupo intermedio de sujetos cuyos niveles de glucosa, aunque no cumplen los criterios de la diabetes, son no obstante demasiado elevados como para ser considerados normales. Este grupo se define por tener unos niveles plasmáticos de glucosa en ayunas (FPG) > 100 mg/dl (5,6 mmol/l) pero < 126 mg/dl (7,0 mmol/l) o unos valores en la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 2 h (OGTT) de > 140 mg/dl (7,8 mmol/l) pero < 200 mg/dl (11,1 mmol/l). Por lo tanto, las categorías de los valores de la FPG son como sigue:

- 35 - FPG < 100 mg/dl (5,6 mmol/l) = glucosa normal en ayunas;
- 40 - FPG 100 - 125 mg/dl (5,6 - 6,9 mmol/l) = IFG (glucosa alterada en ayunas);
- 45 - FPG > 126 mg/dl (7,0 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico debe confirmarse, como se describe a continuación),

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

- 50 - postcarga de glucosa a las 2 h < 140 mg/dl (7,8 mmol/l) = tolerancia normal a la glucosa
- 55 - postcarga de glucosa a las 2 h 140 - 199 mg/dl (7,8 - 11,1 mmol/l) = IGT (tolerancia alterada a la glucosa)
- postcarga de glucosa a las 2 h > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico debe confirmarse, como se describe a continuación).

Diagnóstico de la diabetes sacarina de tipo 2:

1. Síntomas de la diabetes más una concentración de glucosa plasmática ocasional > 200 mg/dl (11,1 mmol/l). Ocasional se define como cualquier momento del día independientemente del tiempo pasado desde la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia y una pérdida de peso sin explicación.
 5 Alternativamente: 2, FPG > 126 mg/dl (7,0 mmol/l). El ayuno se define como ninguna ingesta calórica durante al menos 8 h. Alternativamente: 3, postcarga de glucosa a las 2 h > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante una OGTT. La prueba debería realizarse según describe la OMS, mediante el uso de una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

10 En ausencia de una hiperglucemia indiscutible, estos criterios deberían ser confirmados mediante la repetición de la prueba en días diferentes. La tercera medición (OGTT) no está recomendada en el uso clínico rutinario.

(American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2006) Sin embargo, un aumento en los niveles sanguíneos de azúcar o una disminución en la insulina disponible son más bien desarrollos anterógrados en el desarrollo y la progresión de la diabetes.

15 Taylor y col (1987, Annals of Clinical Biochemistry, British Medical Association 24 (3): 293 - 300) desvelan la determinación de ácidos grasos de eritrocitos en sujetos normales mediante una cromatografía de gas-líquido. Se averiguó que los cinco principales ácidos grasos encontrados en los eritrocitos (los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico) podían ser identificados con una precisión aceptable.

20 Rodríguez y col. (2004, Prostaglandins Leukotrienes and essential Fatty Acids 71 (5): 303 - 308) analizaron el efecto de la diabetes sacarina de tipo II en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos. El análisis se realizó mediante una cromatografía de gases, y se encontraron algunas variaciones significativas para varios ácidos grasos entre los pacientes obesos o diabéticos en comparación con los controles delgados.

Wang y col. (2005, Analytical Biochemistry 77 (13): 4108 - 4116) desvelan un procedimiento de perfilado metabólico de los fosfolípidos plasmáticos y biomarcadores de la diabetes sacarina de tipo II, identificados mediante una HPLC / EM por electronebulización.

25 Sin embargo, todavía no hay disponibles medidas diagnósticas alternativas o medidas diagnósticas que podrían incluso identificar los individuos en riesgo antes de una clara aparición de la enfermedad, o al menos en una etapa temprana de la enfermedad.

30 Consecuentemente, el problema técnico subyacente en la presente invención debe contemplarse como la provisión de medios y de procedimientos para un diagnóstico eficaz y fiable de la diabetes y/o de una predisposición a la misma. El problema técnico es resuelto mediante las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones y descritas en el presente documento, a continuación.

Consecuentemente, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la diabetes que comprende:

- 35 (a) la determinación de al menos un metabolito en una muestra de prueba de un sujeto sospechoso de padecer diabetes, siendo seleccionado dicho al menos un metabolito de entre el grupo que consiste en: ácido tricosanoico (C23:0); y
 (b) la comparación de los resultados de la determinación de la etapa (a) con una referencia, mediante lo cual se va a diagnosticar la diabetes.

40 Además, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la diabetes o de una predisposición a la misma que comprende:

- 45 (a) la determinación de al menos un metabolito en una muestra de prueba de un sujeto sospechoso de padecer diabetes o de tener una predisposición a la misma, siendo seleccionado dicho al menos un metabolito de entre el grupo que consiste en: 1,5-anhidrosorbitol, ácido eicosenoico (C20:1), eritrol, ácido ribónico, pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0); y
 (b) la comparación de los resultados de la determinación de la etapa (a) con una referencia, mediante lo cual se va a diagnosticar la diabetes o una predisposición a la misma.

Adicionalmente se desvelan metabolitos seleccionados de entre uno cualquiera de los grupos que consisten en:

- 50 (i) 1,5-anhidrosorbitol
 (ii) ácido eicosenoico (C20:1)
 (iii) eritrol
 (iv) ácido ribónico y ácido tricosanoico (C23:0)
 (v) pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),
 (vi) ácido eicosenoico (C20:1), eritrol, ácido ribónico, ácido tricosanoico (C23:0), pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),

- (vii) eritrol, ácido ribónico, ácido tricosanoico (C23:0), pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),
- (viii) eritrol, ácido ribónico, ácido tricosanoico (C23:0), pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),
- 5 (ix) ácido ribónico, ácido tricosanoico (C23:0), pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),
- (x) ácido tricosanoico (C23:0), pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),
- (xi) 1,5-anhidrosorbitol, ácido eicosanoico (C20:1), eritrol, ácido ribónico, ácido tricosanoico, pentadecanol, campesterol, ácido maleico y ácido melísico (C30:0),
- 10 (xii) 1,5-anhidrosorbitol, ácido eicosanoico (C20:1), eritrol, ácido ribónico y ácido tricosanoico,
- (xiii) 1,5-anhidrosorbitol, ácido eicosanoico (C20:1) y eritrol,
- o
- (xiv) 1,5-anhidrosorbitol y ácido eicosanoico (C20:1).

15 Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para las enfermedades mencionadas en el presente documento. Sin embargo, lo más preferiblemente, mediante el procedimiento de la presente divulgación va ser determinado un grupo de biomarcadores que incluye o que consiste en los biomarcadores de uno de los grupos mencionados anteriormente. Un grupo de biomarcadores consiste, preferiblemente, en menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferiblemente, hasta todos los biomarcadores mencionados anteriormente.

20 La expresión "procedimiento para el diagnóstico" como se menciona 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, debe entenderse que el procedimiento, en una forma de realización preferida, es un procedimiento que se lleva a cabo *in vitro*, es decir, no se realiza en el cuerpo humano o animal. El diagnóstico, según se usa en el presente documento, se refiere a la valoración de la probabilidad de que un sujeto padezca una enfermedad. Como comprenderán los expertos en la técnica, dicha valoración, aunque se prefiere que lo sea, habitualmente no será correcta para el 100 % de los sujetos que se van a diagnosticar. Sin embargo, el término requiere que una porción estadísticamente significativa de los sujetos pueda ser identificada como que padece la enfermedad o como que tiene una predisposición a la misma. La persona experta en la técnica puede determinar sin demasiadas complicaciones si una porción es estadísticamente significativa mediante el uso de varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc.. Los detalles se encuentran en Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50 %, de al menos el 60 %, de al menos el 70 %, de al menos el 80 %, de al menos el 90 %, de al menos el 95 %. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

35 El diagnóstico de acuerdo con la presente invención incluye la monitorización, la confirmación y la clasificación de la enfermedad pertinente o de sus síntomas. La monitorización se refiere al mantenimiento de un seguimiento de una enfermedad ya diagnosticada, o de una complicación, por ejemplo, para analizar la progresión de la enfermedad, la influencia de un tratamiento en particular sobre la progresión de la enfermedad, o las complicaciones que surgen durante el periodo de enfermedad o después de un tratamiento exitoso de la enfermedad. La confirmación se refiere a la consolidación o la corroboración de un diagnóstico ya realizado mediante el uso de otros indicadores o marcadores. La clasificación se refiere a la ubicación del diagnóstico de acuerdo con la fuerza o el tipo de los síntomas en las diferentes clases, por ejemplo, los tipos de diabetes según se establece en cualquier otra parte de la descripción.

45 El término "diabetes" o "diabetes sacarina", según se usa en el presente documento, se refiere a estados patológicos en los que el metabolismo de la glucosa está alterado. Dicha alteración da como resultado una hiperglucemia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes puede subdividirse en cuatro clases. La diabetes de tipo 1 está causada por una ausencia de insulina. La insulina es producida por las denominadas células de los islotes pancreáticos. Dichas células pueden ser destruidas por una reacción autoinmune en la diabetes de tipo 1 (tipo 1 a). Además, la diabetes de tipo 1 también incluye una variante idiopática (de tipo 1 b). La diabetes de tipo 2 está causada por una resistencia a la insulina. La diabetes de tipo 3, de acuerdo con la clasificación actual, comprende todos los demás tipos específicos de diabetes sacarina. Por ejemplo, las células beta pueden tener defectos genéticos que afecten a la producción de insulina, la resistencia a la insulina puede tener una causa genética, o el páncreas como tal puede estar destruido o deteriorado. Además, la desregulación hormonal o los fármacos también pueden causar la diabetes de tipo 3. La diabetes de tipo 4 puede aparecer durante el embarazo. Preferiblemente, la diabetes, según se usa en el presente documento, se refiere a la diabetes tipo 2. De acuerdo con la German Society for Diabetes, la diabetes se diagnostica por un nivel de glucosa plasmática mayor de 110 mg/dl en ayunas o mayor de 220 mg/dl postprandial. Algunas técnicas diagnósticas preferidas adicionales se desvelan en cualquier parte de esta memoria descriptiva. Algunos síntomas adicionales de la diabetes son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto estándar de medicina, tales como Stedman o Pschyrembl.

60 El término "predisposición" según se usa en el presente documento significa que un sujeto todavía no ha desarrollado la enfermedad o cualquiera de los síntomas de la enfermedad mencionados anteriormente u otros criterios diagnósticos, pero sin embargo, desarrollará la enfermedad en el futuro con una cierta probabilidad. Dicha probabilidad debe diferir significativamente de la probabilidad de aparición estadística de la diabetes sacarina.

Preferiblemente, la probabilidad de desarrollar una diabetes es de al menos el 30 %, de al menos el 40 %, de al menos el 50 %, de al menos el 60 %, de al menos el 70 %, de al menos el 80 %, de al menos el 90 % o del 100 % de una predisposición diagnosticada. El diagnóstico de una predisposición puede denominarse a veces como el pronóstico o la predicción de la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad.

5 El término "al menos un metabolito", según se usa en el presente documento, se refiere a un único metabolito o a una pluralidad de metabolitos, es decir, preferiblemente al menos a 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 ó 10.000 metabolitos. Debe apreciarse que "metabolito" según 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 las que para cada metabolito puede haber presente 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 o inorgánicos incluyendo aquellos formados por material biológico, tales como organismos. Preferiblemente, el metabolito de acuerdo con la presente invención es un compuesto de molécula pequeña. Más preferiblemente, en el caso de que se contemple una pluralidad de metabolitos, dicha pluralidad de metabolitos representan un metaboloma, es decir, la colección de metabolitos que forma un organismo, un órgano, un tejido o una célula en un momento específico y en unas condiciones específicas.

Los metabolitos son compuestos de molécula pequeña, tales como sustratos de enzimas de rutas metabólicas, intermedios de dichas rutas con los productos obtenidos a partir de una ruta metabólica. Las rutas metabólicas son bien conocidas en la técnica y pueden variar según la especie. Preferiblemente, dichas rutas incluyen al menos el ciclo del ácido cítrico, la cadena respiratoria, la fotosíntesis, la fotorrespiración, la glucólisis, la gluconeogénesis, la ruta de la hexosa monofosfato, la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, la producción y la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea, las rutas de biosíntesis de aminoácidos, las rutas de degradación de proteínas tales como la degradación proteosómica, las rutas de degradación de aminoácidos, la biosíntesis o la degradación de: lípidos, policétidos (incluyendo por ejemplo flavonoides e isoflavonoides), isoprenoides (incluyendo, por ejemplo, terpenos, esteroides, carotenoides, xantófilas), carbohidratos, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, benzenoides, indoles, compuestos indolo-azufrados, 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. Consecuentemente, los metabolitos de los compuestos de molécula pequeña están formados 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 son necesarios para el funcionamiento normal de la célula, el funcionamiento del órgano o el crecimiento, el desarrollo o la salud del animal. Además, los metabolitos de molécula pequeña comprenden adicionalmente metabolitos secundarios con una función ecológica esencial, por ejemplo, metabolitos que permiten que un organismo se adapte a su entorno. Adicionalmente, los metabolitos no se limitan a dichos metabolitos primarios y secundarios, y engloban adicionalmente compuestos de molécula pequeña artificiales. Dichos compuestos de molécula pequeña artificiales derivan de moléculas pequeñas proporcionadas exógenamente que son administradas a, o captadas por, un organismo, pero que no son metabolitos primarios o secundarios como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, los compuestos de molécula pequeña artificiales pueden ser los productos metabólicos obtenidos a partir de fármacos mediante rutas metabólicas del animal. Además, los metabolitos incluyen adicionalmente péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, tales como ARN o ADN. Más preferiblemente, un metabolito tiene un peso molecular de desde 50 Da (Dalton) hasta 30.000 Da, lo más preferiblemente menor de 30.000 Da, menor de 20.000 Da, menor de 15.000 Da, menor de 10.000 Da, menor de 8.000 Da, menor de 7.000 Da, menor de 6.000 Da, menor de 5.000 Da, menor de 4.000 Da, menor de 3.000 Da, menor de 2.000 Da, menor de 1.000 Da, menor de 500 Da, menor de 300 Da, menor de 200 Da, menor de 100 Da. 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 desde 50 Da hasta 1.500 Da.

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

Otros metabolitos preferidos para determinar conjuntamente, es decir, tanto simultáneamente como consecutivamente, junto con los metabolitos o los grupos de metabolitos mencionados anteriormente, son los metabolitos elegidos 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),
- (ii) un ácido graso poliinsaturado, preferiblemente, ácido docosaheptaenoico (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 linoléico (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,

(vi) un metabolito del Ciclo de la Urea, preferiblemente, urea, citrulina, succinato u ornitina,

5 (vii) manosa, ácido alfa-cetoisocaproico, glicerol, fracción lipídica o ácido 3-hidroxi-butírico,

(viii) glucosa.

Un "ácido graso saturado de cadena larga" según se indica de acuerdo con la presente invención engloba, preferiblemente, ácidos grasos de entre C18 y C30 en los que las cifras "18" y "30" indican el número de átomos de carbono en la cadena del ácido graso. Más preferiblemente, se refiere a ácidos grasos de entre C20 y C30, y lo más preferiblemente, al ácido lignocérico (C24:0), al ácido melísico (C30:0) o al ácido tricosanoico (C23:0).

Un "ácido graso poliinsaturado" según se usa en el presente documento significa un ácido graso que comprende más de un enlace de carbono insaturado. Los ácidos grasos poliinsaturados contemplados por la presente invención son ácidos grasos poliinsaturados de entre C18 y C22, y lo más preferiblemente, el ácido docosahexanoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), el ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), el ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), el ácido linoleico (C18:cis[9,12]2) o el ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3).

El término "aminoácido" según se usa en el presente documento engloba tanto los aminoácidos naturales como los derivados de los mismos. Los aminoácidos naturales son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar de bioquímica. Más preferiblemente, el término se refiere a lisina, alanina, treonina, triptófano, valina, isoleucina, leucina, cisteína, metionina, tirosina, fenilalanina, glicina, prolina o glutamina.

El término "antioxidante" según se usa en el presente documento engloba compuestos que son capaces de prevenir la oxidación en un sujeto. Preferiblemente, el término se refiere a metabolitos naturales que pueden servir como coenzimas en la célula de un sujeto o que son vitaminas, incluyendo las que es necesario administrar exógenamente. Más preferiblemente, un antioxidante de acuerdo con la presente invención es el ácido ascórbico, la coenzima Q10 o el alfa-tocoferol.

El término "un metabolito del Ciclo del Ácido Cítrico" o "un metabolito del Ciclo de la Urea" se refiere a los productos, los intermedios y los reactivos que son sintetizados o utilizados como sustratos en las anteriormente mencionadas bien conocidas cascadas de conversión bioquímica. Estos productos, intermedios y reactivos se describen en los libros de texto estándar de bioquímica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. 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 mencionado en 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 grupos de metabolitos diferentes especificados anteriormente en desde (i) hasta (vii). Más preferiblemente, va a determinarse 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 desde (i) hasta (vii). Se ha averiguado que los miembros de las clases de metabolitos mencionadas anteriormente proporcionan biomarcadores complementarios para el diagnóstico de la diabetes o de una predisposición a la diabetes. Además, una combinación de las anteriormente mencionadas clases de metabolitos proporciona unos resultados incluso más superiores y fiables.

Más preferiblemente, además de los anteriormente mencionados metabolitos complementarios o grupos de metabolitos complementarios, se determina al menos un metabolito complementario elegido de entre cualquiera de los siguientes grupos que consisten en:

(i) ácido ascórbico;

(ii) manosa;

(iii) valina e isoleucina;

(iv) ácido úrico y leucina;

(v) cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexanoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-4-hidroxi-prolina, ácido 3-hidroxi-butírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;

(vii) manosa, valina, isoleucina, leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexanoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0),

- trans-4-hidroxiprolina, ácido 3-hidroxibutírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;
- 5 (viii) valina, isoleucina, leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-
- 10 4-hidroxiprolina, ácido 3-hidroxibutírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;
- 15 (ix) leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (cl6arans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-4-
- 20 hidroxiprolina, ácido 3-hidroxibutírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;
- (x) ácido ascórbico y manosa;
- (xi) ácido ascórbico, manosa, valina e isoleucina;
- 25 (xii) ácido ascórbico, manosa, valina, isoleucina, ácido úrico y leucina;
- (xiii) ácido ascórbico, manosa, valina, isoleucina, leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, y coenzima Q10;
- (xiv) glucosa

- 30 Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador complementario adecuado por sí mismo para las enfermedades mencionadas en el presente documento. Sin embargo, lo más preferiblemente, mediante el procedimiento de la presente invención se va a determinar un grupo de biomarcadores complementarios que incluye o que consiste 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
- 35 complementarios mencionados anteriormente.

- Los metabolitos complementarios antes mencionados se compararán también, preferiblemente, con unos resultados de referencia adecuados según se ha especificado en cualquier otra parte en el presente documento. El resultado de dicha comparación serán complementarios adicionales para averiguar si el sujeto padecerá diabetes o no, o tendrá una predisposición a la misma o no. Los resultados de referencia preferidos, los valores de los cambios de las cantidades relativas y las indicaciones del tipo de regulación, pueden encontrarse en los Ejemplos anexos, a
- 40 continuación.

- El término "muestra de prueba", según se usa en el presente documento, se refiere a las muestras que se van a usar para el diagnóstico de la diabetes mediante el procedimiento de la presente invención. Dicha muestra de prueba es una muestra biológica. Las muestras procedentes de fuentes biológicas (es decir, las muestras biológicas)
- 45 comprenden habitualmente una pluralidad de metabolitos. Las muestras biológicas que se van a usar en el procedimiento de la presente invención son muestras de sangre, plasma o suero. Estas incluyen también muestras que comprenden compartimentos u orgánulos subcelulares, tales como la mitocondria, el aparato de Golgi o los peroxisomas. Las muestras biológicas derivan de un sujeto como se ha especificado en cualquier otra parte en el presente documento. Las técnicas para la obtención de los anteriormente mencionados diferentes tipos de muestras
- 50 biológicas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las muestras sanguíneas pueden obtenerse mediante la recolección de sangre, mientras que las muestras de tejidos o de órganos se obtienen, por ejemplo, mediante una biopsia.

- Las muestras mencionadas anteriormente son, preferiblemente, pretratadas antes de que sean usadas para el procedimiento de la presente invención. Como se describe con más detalle a continuación, dicho pretratamiento puede incluir los tratamientos necesarios para liberar o separar los compuestos o para eliminar un exceso de material o de desechos. Algunas técnicas adecuadas comprenden una centrifugación, una extracción, un fraccionamiento, una purificación y/o un enriquecimiento de los compuestos. Además, se llevan a cabo otros pretratamientos con objeto de proporcionar los compuestos en una forma o en una concentración adecuada para el análisis del compuesto. Por ejemplo, si se usa una cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas
- 60 en el procedimiento de la presente invención, será necesario derivatizar los compuestos antes de dicha cromatografía de gases. Los pretratamientos adecuados y necesarios dependerán del medio usado para llevar a cabo el procedimiento de la invención y son bien conocidos por la persona experta en la técnica. Las muestras pretratadas según se ha descrito anteriormente también están comprendidas por el término "muestra" según se usa

de acuerdo con la presente invención.

El término "sujeto", según 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 seres humanos. Otros animales que pueden ser diagnosticados mediante la aplicación del procedimiento de la presente invención son aves o reptiles. Un sujeto sospechoso de padecer diabetes, según se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que muestra, preferiblemente, síntomas o signos clínicos o parámetros indicativos de una diabetes. Sin embargo, el término también se refiere a un sujeto aparentemente sano, es decir, un sujeto que no muestra ninguno de los síntomas, signos clínicos o parámetros mencionados anteriormente. Los sujetos aparentemente sanos pueden ser investigados mediante el procedimiento de la presente invención como una medida de cuidado preventivo o con un fin de cribado de la población.

El término "determinación de dicho al menos un metabolito", según se usa en el presente documento, se refiere a la determinación de al menos un rasgo característico del al menos un metabolito comprendido por la muestra mencionada en el presente documento. Los rasgos característicos de acuerdo con la presente invención son los rasgos que caracterizan las propiedades físicas y/o químicas, incluyendo las propiedades bioquímicas, de un metabolito. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, el peso molecular, la viscosidad, la densidad, la carga eléctrica, el espín, la actividad óptica, el color, la fluorescencia, la quimioluminiscencia, la composición elemental, la estructura química, la capacidad de reaccionar con otros compuestos, la capacidad de desencadenar una respuesta en un sistema de lectura biológica (por ejemplo, la inducción de un gen indicador) y similares. Los valores de dichas propiedades pueden servir como rasgos característicos y pueden ser determinados mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Además, el rasgo característico puede ser cualquier rasgo que 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 la identificación química de dicho al menos un metabolito. El al menos un metabolito comprendido en una muestra de prueba puede determinarse de acuerdo con la presente invención cuantitativamente o cualitativamente. Para una determinación cualitativa, se determinará la presencia o la ausencia del metabolito mediante una técnica adecuada. Además, la determinación cualitativa puede incluir, preferiblemente, la determinación de la estructura o de la composición química del metabolito. Para una determinación cuantitativa, se determinará bien la cantidad precisa del al menos un metabolito presente en la muestra, o bien se determinará la cantidad relativa del al menos un metabolito, preferiblemente, basándose en el valor determinado para el (los) rasgo(s) característico(s) mencionado(s) anteriormente en el presente documento. La cantidad relativa puede determinarse en el caso en el que la cantidad precisa de un metabolito no pueda o no deba ser determinada. En dicho caso, puede determinarse si la cantidad en la que está presente el metabolito ha aumentado o disminuido con respecto a una segunda muestra que comprende dicho metabolito en una segunda cantidad. El análisis cuantitativo de un metabolito incluye también, por tanto, lo que a veces se denomina un análisis semicuantitativo de un metabolito.

Además, una determinación según se usa en el procedimiento de acuerdo con la presente invención incluye, preferiblemente, el uso de una etapa de separación del compuesto antes de la etapa de análisis mencionada anteriormente. Preferiblemente, dicha etapa de separación del compuesto produce una separación resuelta con el tiempo de los metabolitos comprendidos en la muestra. Algunas técnicas de separación adecuadas que se pueden usar preferiblemente de acuerdo con la presente invención, incluyen por tanto todas las técnicas de separación cromatográficas tales como cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía en capa fina, cromatografía de exclusión por tamaños o de afinidad. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica y pueden ser aplicadas por la persona experta en la técnica sin demasiadas complicaciones. Lo más preferiblemente, la LC y/o la GC son las técnicas cromatográficas que van a ser contempladas por el procedimiento de la presente invención. Los dispositivos adecuados para dicha determinación de metabolitos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente se usa la espectrometría de masas, en particular la cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS), la espectrometría de masas de infusión directa o la espectrometría de masas de resonancia de ión-ciclotrón de transformada de Fourier (FT-ICR-MS), la electroforesis capilar con espectrometría de masas (CE-MS), la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a una espectrometría de masas (HPLC-MS), la espectrometría de masas de cuadrupolo, cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente, tal como MS-MS o MS-MS-MS, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectrometría de masas de pirolisis (Py-MS), espectrometría de masas de movilidad iónica o espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). Más preferiblemente, se usan la LC-MS y/o la GC-MS como se describe con detalle a continuación. Dichas técnicas se desvelan en, por ejemplo, Nissen, Journal of Chromatography A, 703, 1995: 37 - 57, en el documento US 4.540.884 o en el documento US 5.397.894, cuya divulgación de su contenido se incorpora al presente documento por referencia. Como alternativa, o además de, las técnicas de espectrometría de masas, pueden usarse las siguientes técnicas para la determinación del compuesto: resonancia magnética nuclear (RMN), imágenes por resonancia magnética (MRI), análisis de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia ultravioleta (UV), índice de refracción (RI), detección fluorescente, detección radioquímica, detección electroquímica, dispersión de la luz (LS), espectroscopia de dispersión Raman o detección por ionización de llama (FID). Estas técnicas son bien conocidas por la persona experta en la técnica y pueden ser aplicadas sin demasiadas complicaciones. El procedimiento de la presente invención estará ayudado, preferiblemente, por una

automatización. Por ejemplo, el procesado o el pretratamiento de la muestra pueden estar automatizados con robótica. El procesado y la comparación de los datos está ayudado, preferiblemente, por unos programas y unas bases de datos informáticas adecuadas. La automatización según se describe anteriormente en este documento permite el uso del procedimiento de la presente invención en enfoques de alto rendimiento.

5 Además, el al menos un metabolito también puede ser determinado mediante un ensayo químico o biológico específico. Dicho ensayo debe comprender un medio que permita detectar específicamente el al menos un
 10 metabolito en la muestra. Preferiblemente, dicho medio es capaz de reconocer específicamente la estructura química del metabolito o es capaz de identificar específicamente el metabolito basándose en su capacidad para reaccionar con otros compuestos o en su capacidad para desencadenar una respuesta en un sistema de lectura
 15 biológica (por ejemplo, la inducción de un gen indicador). Los medios que son capaces de reconocer específicamente la estructura química de un metabolito son preferiblemente, anticuerpos u otras proteínas que interactúan específicamente con estructuras químicas, tales como receptores o enzimas. Pueden obtenerse anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante el uso del metabolito como un antígeno mediante procedimientos
 20 bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos mencionados en el presente documento incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como los 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 las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestran una
 25 especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Además, están englobados los anticuerpos de cadena única. Las secuencias donantes incluirán habitualmente al menos los residuos de aminoácidos de unión al antígeno del donante, pero también pueden comprender otros residuos de aminoácidos estructuralmente y/o funcionalmente pertinentes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Las proteínas adecuadas que son capaces de reconocer específicamente el metabolito son, preferiblemente, las enzimas que están implicadas en la conversión metabólica de dicho metabolito. Dichas enzimas pueden usar el metabolito como sustrato o pueden convertir un
 30 sustrato en el metabolito. Además, dichos anticuerpos pueden usarse como una base para generar oligopéptidos que reconozcan específicamente el metabolito. Estos oligopéptidos deben comprender, por ejemplo, los dominios de unión a la enzima o los bolsillos para dicho metabolito. Algunos ensayos adecuados basados en anticuerpos y/o en enzimas pueden ser RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmuoadsorción enzimática), inmunoensayos enzimáticos en sándwich, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia en sándwich (ECLIA), fluoroinmunoensayos de disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA) o inmunoensayos en fase sólida. Además, el metabolito también puede ser identificado basándose en su capacidad para reaccionar con otros compuestos, es decir, por una reacción química específica. Las reacciones adecuadas son bien conocidas en la técnica y engloban preferiblemente reacciones enzimáticas (por ejemplo, para la manosa, Pitkanen E, Pitkanen O, Uotila L.; Eur J Clin Chem Clin Biochem., octubre de 1997; 35 (10): 761 - 6; o para el 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, enero de 1963, 39 - 46, Vol. 31, N° 1), procedimientos espectrofluorimétricos (Sumi T, Umeda Y, Kishi Y, Takahashi K, Ka-kimoto F.; Clin Chim Acta., 1 de diciembre de 1976; 73 (2): 233 - 9) y fluorescencia; quimioluminiscencia (J. J. Thiele, H. J. Freisleben, J. Fuchs y F. R. Ochsendorf; Human Reproduction, Vol. 10, N° 1, páginas 110 - 115, 1995). Pueden usarse otros procedimientos de
 40 detección adicionales tales como electroforesis capilar (Hubert A. Carchon y Jaak Jaeken; Clinical Chemistry 47: 1319 - 1321, 2001) y procedimientos colorimétricos (Kyaw A; Clin Chim Acta., junio de 1978; 86 (2): 153 - 7). Además, el metabolito puede determinarse en una muestra debido a su capacidad para desencadenar una respuesta en un sistema de lectura biológica. La respuesta biológica debe ser detectada como una lectura indicativa de la presencia y/o de la cantidad del metabolito comprendido en la muestra. La respuesta biológica puede ser, por
 45 ejemplo, la inducción de la expresión de un gen o una respuesta fenotípica de una célula o de un organismo.

Además, debe entenderse que dependiendo de la técnica usada para la determinación de dicho al menos un metabolito, el analito que se detectará podría ser un derivado del metabolito fisiológico, es decir, el metabolito presente en un sujeto. Dichos analitos pueden ser generados como resultado de una preparación de la muestra o de un medio de detección. Se considera que los compuestos mencionados en el presente documento son analitos. Sin embargo, como se ha establecido anteriormente, estos analitos representarán los metabolitos de una forma cualitativa y cuantitativa. Además, debe entenderse que para una pluralidad de metabolitos, el metabolito será idéntico al analito.

El término "referencia" se refiere a los resultados, es decir, a los datos de los rasgos característicos del al menos un metabolito, que pueden correlacionarse con la diabetes. Dichos resultados de referencia se obtienen, preferiblemente, a partir de una muestra de un sujeto del que se sabe que padece diabetes. Los resultados de referencia pueden obtenerse mediante la aplicación del procedimiento de la presente invención. Alternativamente, aunque no obstante también preferido, los resultados de referencia pueden obtenerse a partir de una muestra de un sujeto del que se sabe que no padece diabetes, es decir, de un sujeto sano con respecto a la diabetes, y más preferiblemente, también de otras enfermedades. Además, la referencia también podría ser, preferiblemente, una referencia calculada, lo más preferiblemente la media o la mediana, de la cantidad relativa o absoluta de un metabolito de una población de individuos que comprende el sujeto que se va a investigar. Las cantidades absolutas o relativas de los metabolitos de dichos individuos en la población pueden determinarse como se ha especificado en cualquier parte en el presente documento. La forma de calcular un valor de referencia adecuado, preferiblemente, la

media o la mediana, es bien conocida en la técnica. La población de sujetos mencionada debe comprender una pluralidad de sujetos, preferiblemente, al menos 5, 10, 50, 100, 1.000 ó 10.000 sujetos. Debe apreciarse que el sujeto que se va a diagnosticar mediante el procedimiento de la presente invención y los sujetos de dicha pluralidad de sujetos son de la misma especie.

- 5 Más preferiblemente, los resultados de referencia, es decir, los valores para al menos un rasgo característico del al menos un metabolito, se almacenan en un medio de almacenamiento de datos adecuado, tal como una base de datos, y por lo tanto también son adecuados para diagnósticos futuros. Esto también permite el diagnóstico eficaz de la predisposición a una enfermedad debido a que los resultados de referencia adecuados pueden ser identificados en la base de datos una vez que se haya confirmado (en el futuro) que el sujeto a partir del cual se obtuvo la correspondiente muestra de referencia desarrolló (de hecho) diabetes. Los resultados de referencia preferidos que están asociados con la diabetes en seres humanos son aquellos mostrados en las Tablas de los Ejemplos dados.

El término "comparación" se refiere a la evaluación de si los resultados de la determinación descritos anteriormente con detalle en este documento, es decir, los resultados de la determinación cualitativa o cuantitativa del al menos un metabolito, son idénticos o similares a los resultados de referencia, o difieren de los mismos.

- 15 En el caso de que se obtengan resultados de referencia a partir de un sujeto o de un grupo de los que se sabe que padecen diabetes, dicha enfermedad puede ser diagnosticada basándose en el grado de identidad o de similitud entre los resultados del ensayo obtenidos a partir de la muestra de prueba y los anteriormente mencionados resultados de referencia, es decir, basándose en una composición cualitativa o cuantitativa idéntica o similar con respecto al, al menos un, metabolito. Los resultados de la muestra de prueba y los resultados de referencia son idénticos si los valores para los rasgos característicos, y en el caso de la determinación cuantitativa, la intensidad de los valores, son idénticos. Dichos resultados son similares si los valores de los rasgos característicos son idénticos pero la intensidad de los valores es diferente. Dicha diferencia no es, preferiblemente, significativa y debe estar caracterizada porque los valores de la intensidad están en al menos el intervalo de entre el percentil 1° y el 99°, entre el percentil 5° y el 95°, entre el percentil 10° y el 90°, entre el percentil 20° y el 80°, entre el percentil 30° y el 70°, entre el percentil 40° y el 60° del valor de referencia, el percentil 50°, 60°, 70°, 80°, 90° o 95° del valor de referencia.

- En el caso de que se obtengan resultados de referencia a partir de un sujeto o de un grupo de los que se sabe que no padecen diabetes, dicha enfermedad puede ser diagnosticada basándose en las diferencias entre los resultados del ensayo obtenidos a partir de la muestra de prueba y los anteriormente mencionados resultados de referencia, es decir, en las diferencias en la composición cualitativa o cuantitativa con respecto al, al menos un, metabolito. Se aplica lo mismo si se usa una referencia calculada como se ha especificado anteriormente. La diferencia puede ser un aumento en la cantidad absoluta o relativa de un metabolito (denominada a veces regulación por aumento del metabolito; véanse también los Ejemplos) o una disminución en cualquiera de dichas cantidades o la ausencia de una cantidad detectable del metabolito (denominada a veces regulación por aumento del metabolito; véanse también los Ejemplos). Preferiblemente, la diferencia en la cantidad relativa o absoluta es significativa, es decir, está fuera del intervalo entre el percentil 45° y el 55°, entre el percentil 40° y el 60°, entre el percentil 30° y el 70°, entre el percentil 20° y el 80°, entre el percentil 10° y el 90°, entre el percentil 5° y el 95°, entre el percentil 1° y el 99° del valor de referencia. Para los metabolitos específicos mencionados en cualquier parte de esta memoria descriptiva, los valores preferidos de los cambios en las cantidades relativas (es decir, las "veces" del cambio) o el tipo de cambio (es decir, la regulación "por aumento" o "por disminución" que da como resultado una cantidad relativa y/o absoluta mayor o menor) están indicados en las Tablas 1 a 4, a continuación. Si en dichas tablas está indicado que un metabolito dado está "regulado por aumento" en un sujeto, la cantidad relativa y/o absoluta estará aumentada, si está "regulado por disminución", la cantidad relativa y/o absoluta del metabolito estará disminuida. Además, las "veces" del cambio indica el grado de aumento o de disminución, por ejemplo, un aumento de 2 veces significa que la cantidad es dos veces la cantidad del metabolito comparada con la referencia. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención incluye, en una forma de realización preferida, una referencia que deriva de un sujeto o de un grupo de los que se sabe que padecen diabetes. Más preferiblemente, unos resultados idénticos o similares para la muestra de prueba y dicha referencia (es decir, unas cantidades relativas o absolutas similares del al menos un metabolito) son indicativos de diabetes. En otra forma de realización preferida del procedimiento de la presente invención, la referencia deriva de un sujeto del que se sabe que no padece diabetes o es una referencia calculada. Más preferiblemente, la ausencia del al menos un metabolito o de una cantidad que, preferiblemente significativamente, difiere en la muestra de prueba en comparación con la muestra de referencia (es decir, se observa una diferencia significativa en la cantidad absoluta o relativa) es indicativa de diabetes en dicho caso.

- La comparación está, preferiblemente, ayudada por una automatización. Por ejemplo, puede usarse un programa informático adecuado que comprenda un algoritmo para la comparación de dos conjuntos de datos diferentes (por ejemplo, los conjuntos de datos que comprenden los valores del (los) rasgo(s) característico(s)). Dichos programas informáticos y algoritmos son bien conocidos en la técnica. No obstante de lo anterior, una comparación también puede llevarse a cabo manualmente.

- Los anteriormente mencionados procedimientos para la determinación del al menos un metabolito puede ser implementados en un dispositivo. Un dispositivo, según se usa en el presente documento, debe comprender al menos el medio mencionado anteriormente. Además, el dispositivo comprende, preferiblemente, adicionalmente un

medio para la comparación y la evaluación del los (los) rasgo(s) característico(s) detectados del al menos un metabolito y, también preferiblemente, de la intensidad de la señal determinada. Los medios del dispositivo están, preferiblemente, conectados operativamente entre sí. La forma de conectar los medios de un modo operativo dependerá del tipo de medio incluido en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplique un medio para la determinación automática cualitativa o cuantitativa del metabolito, los datos obtenidos mediante dicho medio de operación automática pueden ser procesados, por ejemplo, mediante un programa informático con objeto de facilitar el diagnóstico. Preferiblemente, los medios están comprendidos por un único dispositivo en dicho caso. Dicho dispositivo puede incluir consecuentemente una unidad de análisis para los metabolitos y una unidad informática para el procesado de los datos resultantes para el diagnóstico. Alternativamente, cuando se usan medios tales como tiras analíticas para la determinación de los metabolitos, el medio para el diagnóstico puede comprender tiras o tablas de control que asignan los datos resultantes determinados a los datos resultantes conocidos que están acompañados de diabetes o aquellos que son indicativos de que un sujeto es sano, como se ha analizado anteriormente. Los dispositivos preferidos son aquellos que pueden ser aplicados sin un conocimiento particular por parte de un profesional clínico especializado, por ejemplo, tiras analíticas o dispositivos electrónicos que simplemente requieren la carga de una muestra.

Alternativamente, los procedimientos para la determinación del al menos un metabolito pueden ser implementados en un sistema que comprende varios dispositivos que están, preferiblemente, conectados operativamente entre sí. Específicamente, el medio debe estar conectado de una forma tal que permita llevar a cabo el procedimiento de la presente invención según se ha descrito con detalle anteriormente. Por lo tanto, conectados operativamente, según se usa en el presente documento, preferiblemente, significa conectados funcionalmente. Dependiendo del medio que se vaya a usar para el sistema de la presente divulgación, dicho medio puede estar conectado funcionalmente mediante la unión de dicho medio con el otro mediante un medio que permite al transporte de datos entre dichos medios, por ejemplo, cables de fibra de vidrio y otros cables para un transporte de datos de alto rendimiento. No obstante, la presente divulgación también contempla la transferencia inalámbrica de datos entre los medios, por ejemplo, a través de una LAN (LAN inalámbrica, W-LAN). Un sistema preferido que comprende un medio para la determinación de metabolitos según se usa en el presente documento engloba un medio para la separación de los metabolitos, tal como dispositivos cromatográficos, y un medio para la determinación del metabolito, tal como dispositivos de espectrometría de masas. Los dispositivos adecuados se han descrito con detalle anteriormente. Los medios preferidos para la separación del compuesto que se van a usar en el sistema de la presente divulgación incluyen dispositivos cromatográficos, más preferiblemente dispositivos de cromatografía líquida, de HPLC y/o de cromatografía de gases. Los dispositivos preferidos para la determinación del compuesto 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 cuadrupolo, espectrometría de masas acoplada secuencialmente (incluyendo MS-MS o MS-MS-MS), ICP-MS, Py-MS o TOF. Los medios de separación y de determinación están, preferiblemente, conectados entre sí. Más preferiblemente, se usa una LC-MS y/o una GC-MS en el sistema de la presente divulgación según se ha descrito con detalle en cualquier parte de la memoria descriptiva. Adicionalmente deben estar comprendidos medios para la comparación y/o el análisis de los resultados obtenidos de los medios para la determinación de metabolitos. El medio para la comparación y/o el análisis de los resultados puede comprender al menos una base de datos y un programa informático implementado para la comparación de los resultados. Las divulgaciones preferidas de los sistemas y dispositivos mencionados anteriormente también se describen con detalle a continuación.

Ventajosamente, se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que el al menos uno de los anteriormente mencionados metabolitos será un biomarcador adecuado para la diabetes o para una predisposición a la misma. La aplicación de estos metabolitos como biomarcadores permite un diagnóstico de la diabetes rápido, fiable y rentable. Además, una ventaja adicional con respecto a las técnicas disponibles en la técnica anterior es que el procedimiento de la presente invención permite incluso el diagnóstico de una predisposición. Además, el procedimiento puede estar ayudado por la automatización, según se ha descrito en cualquier parte de esta memoria descriptiva, y por lo tanto, permite un cribado de alto rendimiento para los sujetos en riesgo de padecer diabetes. De este modo, el procedimiento de la presente invención puede ayudar en los programas sanitarios de prevención de la diabetes y puede usarse para monitorizar el éxito de las terapias de la diabetes o en las medidas para la prevención de la diabetes, incluyendo dietas nutricionales. Además, los metabolitos o las combinaciones de metabolitos mencionadas en el presente documento pueden ser determinados simultáneamente de una forma temporal y económicamente rentable mediante las técnicas de perfilado metabólico descritas en la presente memoria descriptiva.

Las explicaciones y las interpretaciones de los términos realizadas anteriormente se aplican consecuentemente a las demás formas de realización especificadas en el presente documento dadas a continuación.

En una divulgación adicional del procedimiento de la presente memoria descriptiva, dicho al menos un metabolito se elige de entre el grupo que consiste en: 1,5-anhidrosorbitol, ácido eicosenoico (C20:1) y pentadecanol.

Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para las enfermedades mencionadas en el presente documento. Sin embargo, lo más preferiblemente, se va determinar un grupo de biomarcadores que incluye los biomarcadores de uno de los grupos mencionados anteriormente mediante 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 anteriormente. Adicionalmente, se ha

5 averiguado en el estudio subyacente de la presente invención que los metabolitos de los grupos mencionados anteriormente son particularmente muy adecuados como biomarcadores para la diabetes o la predisposición a la misma en los individuos varones. Consecuentemente, el sujeto que se va diagnosticar de acuerdo con la presente memoria descriptiva está en el contexto de la anteriormente mencionada divulgación preferida, más preferiblemente es un sujeto macho.

En una divulgación adicional del procedimiento de la presente memoria descriptiva, dicho al menos un metabolito se elige de entre el grupo que consiste en: ácido eicosenoico (C20:1), campesterol, ácido ribónico y eritrol.

10 Cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para las enfermedades mencionadas en el presente documento. Sin embargo, lo más preferiblemente, se va determinar un grupo de biomarcadores que incluye los biomarcadores de uno de los grupos mencionados anteriormente mediante el procedimiento de la presente memoria descriptiva. Un grupo de biomarcadores consiste, preferiblemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferiblemente, hasta todos los biomarcadores mencionados anteriormente. Además, se ha averiguado de acuerdo con los estudios subyacentes de la presente invención que el anteriormente mencionado grupo de metabolitos es particularmente muy adecuado como biomarcadores para la diabetes o la predisposición a la misma en los sujetos femeninos. Consecuentemente, más preferiblemente, el sujeto mencionado en relación con la anteriormente mencionada divulgación preferida es una hembra.

15 Como se ha descrito anteriormente, en una forma de realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha determinación del al menos un metabolito comprende una espectrometría de masas (MS).

20 La espectrometría de masas, según se usa en el presente documento, engloba todas las técnicas que permiten la determinación del peso molecular (es decir, la masa) o de una variable de masa correspondiente a un compuesto, es decir, un metabolito, que se va a determinar de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la espectrometría de masas, según se usa en el presente documento, se refiere a la GC-MS, a la LC-MS, a la espectrometría de masas de infusión directa, a la FT-ICR-MS, a la CE-MS, HPLC-MS, a la espectrometría de masas de cuadrupolo, a cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente tal como la MS-MS o la MS-MS-MS, a la ICP-MS, a la Py-MS, a la TOF o cualesquiera metodologías combinadas mediante el uso de las técnicas mencionadas anteriormente. La forma de aplicación de estas técnicas es bien conocida por la persona experta en la técnica. Además, los dispositivos adecuados están disponibles en el mercado. Más preferiblemente, la espectrometría de masas, según se usa en el presente documento, se refiere a la LC-MS y/o a la GC-MS, es decir, a la espectrometría de masas que está conectada operativamente a una etapa de separación cromatográfica previa. Más preferiblemente, la espectrometría de masas según se usa en el presente documento engloba la MS de cuadrupolo. Más preferiblemente, dicha MS de cuadrupolo se realiza como sigue: a) selección de un cociente de masa / carga (m/z) de un ión creado mediante ionización en un primer cuadrupolo analítico del espectrómetro de masas, a) fragmentación del ión seleccionado en la etapa a) mediante la aplicación de un voltaje de aceleración en un cuadrupolo subsiguiente adicional que está relleno de gas de colisión y actúa como una cámara de colisión, la selección de un cociente de masa / carga de un ión creado mediante el proceso de fragmentación de la etapa b) en un cuadrupolo subsiguiente adicional, en el que las etapas a) hasta c) del procedimiento se llevan a cabo al menos una vez, y el análisis del cociente de masa / carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias como resultado del proceso de ionización, en el que el cuadrupolo está relleno de gas de colisión pero no se aplica voltaje de aceleración durante el análisis. Los detalles sobre dicha espectrometría de masas más preferida que se va a usar de acuerdo con la presente invención pueden encontrarse en el documento WO 03/073464.

35 Más preferiblemente, dicha espectrometría de masas es una cromatografía líquida (LC) con MS y/o una cromatografía de gas (GC) con MS.

45 La cromatografía líquida, según se usa en el presente documento, se refiere a todas las técnicas que permiten la separación de compuestos (es decir, de metabolitos) en fase líquida o supercrítica. La cromatografía líquida se caracteriza porque se hacen pasar los compuestos en una fase móvil a través de la fase estacionaria. Cuando los compuestos pasan a través de la fase estacionaria a unas velocidades diferentes pueden ser separados en el tiempo, ya que cada compuesto individual tiene su tiempo de retención específico (es decir, el tiempo que necesita el compuesto para pasar a través del sistema). La cromatografía líquida según se usa en el presente documento también incluye la HPLC. Los dispositivos de cromatografía líquida están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Agilent Technologies, EE.UU. La cromatografía de gases aplicada de acuerdo con la presente invención opera, en principio de una forma comparable a la cromatografía líquida. Sin embargo, en lugar de tener los compuestos (es decir, los metabolitos) en una fase móvil líquida que se hace pasar a través de la fase estacionaria, los compuestos estarán presentes en un volumen gaseoso. Los compuestos pasan la columna, que puede contener materiales de soporte sólidos como fase estacionaria, o las paredes de la misma puede servir como, o están recubiertas de, la fase estacionaria. De nuevo, cada compuesto tiene un tiempo específico que necesita para pasar a través de la columna. Además, en el caso de la cromatografía de gases, se contempla preferiblemente que los compuestos estén derivatizados antes de la cromatografía de gases. Las técnicas de derivatización adecuadas son bien conocidas en la técnica. Preferiblemente, la derivatización de acuerdo con la presente invención se refiere a una metoximación y a una trimetilsililación de, preferiblemente, compuestos polares, y a una transmetilación, metoximación y trimetilsililación de, preferiblemente, compuestos no polares (es decir, lipófilos).

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a un conjunto de datos que comprende los valores característicos de al menos un metabolito que son indicativos de diabetes o de una predisposición a la misma, eligiéndose dicho metabolito de entre uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente.

5 El término "conjunto de datos" se refiere a un conjunto de datos que pueden estar agrupados entre sí física y/o lógicamente. Consecuentemente, el conjunto de datos puede estar implementado en un único medio de almacenamiento de datos o en medios de almacenamientos de datos separados físicamente están conectados operativamente entre sí. Preferiblemente, el conjunto de datos está implementado mediante una base de datos. Por lo tanto, una base de datos según se usa en el presente documento comprende el conjunto de datos en un medio de almacenamiento adecuado. Además, la base de datos comprende, preferiblemente, adicionalmente un sistema de gestión de la base de datos. El sistema de gestión de la base de datos es, preferiblemente, un sistema de gestión de bases de datos basado en una red de trabajo, jerárquico u orientado al objeto. Adicionalmente, la base de datos puede ser una base de datos federal o integrada. Más preferiblemente, la base de datos se implementará como un sistema distribuido (federal), por ejemplo, como un sistema cliente-servidor. Más preferiblemente, la base de datos está estructurada de forma que permita que un algoritmo de búsqueda compare un conjunto de datos de ensayo con los conjunto de datos formados por el conjunto de datos. Específicamente, mediante el uso de dicho algoritmo, pueden buscarse en la base de datos conjuntos de datos similares o idénticos que son indicativos de diabetes o de una predisposición a la misma (por ejemplo, una búsqueda de consulta). Por lo tanto, si puede identificarse un conjunto de datos idéntico o similar en el conjunto de datos, el conjunto de datos de ensayo se asociará con la diabetes o con una predisposición a la misma. Consecuentemente, la información obtenida a partir del conjunto de datos puede usarse para el diagnóstico de la diabetes o de una predisposición a la misma basándose en el conjunto de datos de ensayo obtenido a partir de un sujeto. Más preferiblemente, el conjunto de datos comprende los valores característicos de todos los metabolitos comprendidos por uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente.

A la luz de lo anterior, la presente divulgación engloba un medio de almacenamiento de datos que comprende el anteriormente mencionado conjunto de datos.

25 El término "medio de almacenamiento de datos" según se usa en el presente documento engloba los medios de almacenamiento de datos que están basados en entidades físicas individuales tales como un CD, un CD-ROM, un disco duro, un medio de almacenamiento óptico o un disquete. Además, el término incluye adicionalmente medios de almacenamiento de datos que consisten en entidades separadas físicamente que están conectadas operativamente entre sí de una forma tal que proporcionen el anteriormente mencionado conjunto de datos, preferiblemente, de una forma adecuada para una búsqueda de consulta.

La presente divulgación también se refiere a un sistema que comprende:

- (a) un medio para la comparación de los valores característicos de los metabolitos de una muestra conectado operativamente a
- (b) un medio de almacenamiento de datos como se ha descrito anteriormente.

35 El término "sistema", según se usa en el presente documento, se refiere a medios diferentes que están conectados operativamente entre sí. Dichos medios pueden estar implementados en un único dispositivo o pueden ser dispositivos separados físicamente que están conectados operativamente entre sí. Los medios para la comparación de los valores característicos de los metabolitos operan, preferiblemente, basándose en un algoritmo de comparación como se ha mencionado anteriormente. El medio de almacenamiento de datos comprende, preferiblemente, el conjunto de datos con la base de datos mencionados anteriormente, en los que cada uno de los conjuntos de datos almacenados son indicativos de diabetes o de una predisposición a la misma. Por lo tanto, el sistema de la presente divulgación permite la identificación de si un conjunto de datos de ensayo está comprendido por el conjunto de datos almacenado en el medio de almacenamiento de datos. Consecuentemente, el sistema de la presente divulgación puede aplicarse como un medio diagnóstico en el diagnóstico de la diabetes o de una predisposición a la misma.

En una divulgación preferida del sistema está comprendido el medio para la determinación de los valores característicos de los metabolitos de una muestra.

50 El término "medio para la determinación de los valores característicos de los metabolitos" se refiere preferiblemente a los dispositivos anteriormente mencionados para la determinación de metabolitos, tales como los dispositivos de espectrometría de masas, los dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos en los metabolitos.

Además, la presente divulgación se refiere a un medio diagnóstico que comprende un medio para la determinación de al menos un metabolito elegido de entre uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente.

55 El término "medio diagnóstico", preferiblemente, se refiere a un dispositivo diagnóstico, sistema o ensayo biológico o químico según se ha especificado con detalle en cualquier parte de la descripción.

La expresión "medio para la determinación de al menos un metabolito" se refiere a dispositivos o agentes que son capaces de reconocer específicamente el metabolito. Algunos dispositivos adecuados pueden ser dispositivos

espectrométricos tales como una espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos en los metabolitos. Los agentes adecuados pueden ser compuestos que detectan específicamente los metabolitos. Detección, según se usa en el presente documento, puede ser un proceso en dos etapas, es decir, el compuesto puede unirse en primer lugar específicamente al metabolito para ser detectado, y generar posteriormente una señal detectable, por ejemplo, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales radioactivas y similares. Para la generación de la señal detectable pueden ser necesarios compuestos adicionales que están todos comprendidos por el término "medio para la determinación del al menos un metabolito". Los compuestos que se unen específicamente al metabolito se han descrito con detalle en cualquier parte de la memoria descriptiva e incluyen, preferiblemente, enzimas, anticuerpos, ligandos, receptores u otras moléculas o compuestos químicos biológicos, que se unen específicamente a los metabolitos. En una divulgación preferida, la señal detectable también representa una señal cuantificable, lo que significa que la intensidad relativa del al menos un metabolito es proporcional a la intensidad relativa de la señal detectable.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición diagnóstica que comprende al menos un metabolito elegido de entre uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente.

El al menos un metabolito elegido de entre cualquiera de los grupos mencionados anteriormente servirá como biomarcador, es decir, una molécula indicadora de una afección patológica o de una predisposición en el sujeto, es decir, de la diabetes o de una predisposición a la misma. Por lo tanto, los propios metabolitos pueden servir como composiciones diagnósticas, preferiblemente, tras su visualización o detección mediante los medios mencionados en el presente documento. Por lo tanto, una composición diagnóstica que indica la presencia de un metabolito de acuerdo con la presente divulgación también puede comprender dicho biomarcador físicamente, por ejemplo, un complejo de un anticuerpo y el metabolito que va a ser detectado puede servir como composición diagnóstica. Consecuentemente, la composición diagnóstica puede comprender adicionalmente un medio para la detección de los metabolitos como se ha especificado en cualquier parte de esta descripción. Alternativamente, si se usa un medio de detección tal como técnicas basadas en MS o en RMN, la especie molecular que sirve como indicador de la afección patológica será el al menos un metabolito comprendido por la muestra de prueba que se va a investigar. Por lo tanto, el al menos un metabolito mencionado de acuerdo con la presente divulgación debe servir por sí mismo como composición diagnóstica debido a su identificación como biomarcador.

Finalmente, la presente divulgación se refiere al uso de al menos un metabolito o de un medio para la determinación del mismo para la elaboración de un dispositivo o una composición diagnóstica para el diagnóstico de la diabetes, en los que dicho al menos un metabolito se elige de entre uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente.

Como se ha especificado ya anteriormente, cada uno de dichos metabolitos es un biomarcador adecuado por sí mismo para las enfermedades mencionadas en el presente documento. Sin embargo, lo más preferiblemente, se va a determinar un grupo de biomarcadores que incluye los biomarcadores de uno cualquiera de los grupos mencionados anteriormente, mediante 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 anteriormente.

Todas las referencias mencionadas anteriormente están incorporadas en el presente documento por referencia con respecto a su total contenido de divulgación, así como su contenido de divulgación específico mencionado explícitamente en la descripción anterior.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos que no pretenden restringir ni limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: determinación de los metabolitos

A los voluntarios se les informó sobre los reconocimientos planificados. El protocolo experimental fue aprobado por el Dife (German Institute for Human Nutrition) Institutional Review Board, y todos los sujetos proporcionaron su consentimiento informado por escrito. A continuación se midieron los valores antropométricos y el espesor de la íntima media. Después de estos reconocimientos se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) con 75 g glucosa. Se tomaron muestras sanguíneas a los 0, 30, 60 y 120 minutos. Se obtuvo el plasma a partir de la sangre completa mediante la adición de EDTA como anticoagulante y una subsiguiente centrifugación.

Los voluntarios se clasificaron según los criterios de la OMS y la ADA:

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

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

- postcarga de glucosa a las 2 h < 140 mg/dl (7,8 mmol/l) = tolerancia normal a la glucosa
- postcarga de glucosa a las 2 h 140 - 199 mg/dl (7,8 - 11,1 mmol/l) = IGT (tolerancia alterada a la glucosa)
- postcarga de glucosa a las 2 h > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) = diagnóstico provisional de diabetes (el diagnóstico debe confirmarse, como se describe a continuación).

Diagnóstico de la diabetes sacarina de tipo 2:

1. Síntomas de la diabetes más una concentración de glucosa plasmática ocasional > 200 mg/dl (11,1 mmol/l). Ocasional se define como cualquier momento del día independientemente del tiempo pasado desde la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia y una pérdida de peso sin explicación.
2. FPG > 126 mg/dl (7,0 mmol/l). El ayuno se define como ninguna ingesta calórica durante al menos 8 h.
3. postcarga de glucosa a las 2 h > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante una OGTT.

Las muestras se prepararon y se sometieron a un análisis mediante LCMS y GCMS según se describe a continuación:

Las muestras se prepararon al día siguiente: las proteínas se separaron mediante precipitación a partir del plasma sanguíneo.

Después de la adición de agua y una mezcla de etanol y diclorometano, el resto de la muestra se fraccionó en una fase acuosa, la fase polar, y una fase orgánica, la fase lipófila.

Para la transmetanolisis de los extractos lipídicos, al extracto evaporado se añadió una mezcla de 140 µl de cloroformo, 37 µl de ácido clorhídrico (al 37 % en peso de HCl en agua), 320 µl de metanol y 20 µl de tolueno. El recipiente se cerró herméticamente fuertemente y se calentó durante 2 horas a 100 °C, con agitación. La disolución subsiguientemente se evaporó a sequedad. El residuo se secó completamente.

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

Para la fase polar, la derivatización se realizó de la siguiente forma: la metoximación de los grupos carbonilo se realizó mediante reacción con clorhidrato de metoxiamina (20 mg/ml en piridina, 50 µl durante 1,5 horas a 60 °C) en un recipiente fuertemente cerrado. Se añadieron 10 µl de una disolución de ácidos grasos de cadena lineal con números impares (disolución de cada 0,3 mg/ml de los ácidos grasos de entre 7 y 25 átomos de carbono y cada 0,6 mg/ml de los ácidos grasos con 27, 29 y 31 átomos de carbono en 3 / 7 (v/v) de piridina / tolueno) como patrones de tiempo. Finalmente, se realizó la derivatización con 50 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoroacetamida (MSTFA) durante 30 minutos a 60 °C, de nuevo en el recipiente fuertemente cerrado. El volumen final antes de la inyección en el GC era de 110 µl.

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

Para el análisis se usaron unas columnas de separación capilar comerciales habituales (de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) con diferentes fases estacionarias de polimetilsiloxano que contenían desde un 0 % hasta un 35 % de fracciones aromáticas, dependiendo de los materiales de muestra analizados y de las fracciones de la etapa de la separación de fases (por ejemplo: DB-1ms, HP-5ms, DB-XLB, DB-35ms, Agilent Technologies). Se inyectó hasta 1 µl del volumen final sin división, y el programa de temperatura del horno comenzó a 70 °C y finalizó a 340 °C con diferentes velocidades de calentamiento dependiendo del material de la muestra y de la fracción de la etapa de separación de fases, con objeto de conseguir una separación cromatográfica suficiente y un número de barridos en cada pico de analito. Adicionalmente se usó RTL (*Retention Time Locking*, Agilent Technologies) para el análisis y las condiciones estándar habituales de GC-MS, por ejemplo, un flujo constante con nominal entre 1 y 1,7 ml/min y helio como gas de la fase móvil, la ionización se realizó mediante impacto electrónico con 70 eV, un barrido en un intervalo de m/z de entre 15 y 600 con unas velocidades de barrido de entre 2,5 y 3 escans/s y las condiciones de ajuste estándar.

Los sistemas de HPLC-MS consistían en un sistema de LC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Canadá). El análisis de HPLC se realizó en columnas de separación de fase inversa disponibles comercialmente con fases

estacionarias C18 (por ejemplo: GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18). Se inyectaron hasta 10 µL del volumen final de la muestra, y la separación se llevó a cabo con una dilución en gradiente mediante el uso de gradientes de metanol / agua / ácido fórmico o de acetonitrilo / agua / ácido fórmico a un caudal de 200 ml/min.

- 5 La espectrometría de masas se realizó mediante una ionización por electronebulización en modo positivo para la fracción no polar, y en modo negativo para la fracción polar mediante el uso del modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) y escáner completo desde 100 - 1.000 amu.

Ejemplo 2: evaluación de los datos

10 Las mediciones de GC y de LC-MS de todas las muestras sanguíneas de los pacientes con diabetes y de los sujetos de control se llevaron a cabo junto con las referencias de plasma agrupadas. Para cada lote de medición se calcularon las proporciones relativas de las señales de los sujetos individuales.

15 Los metabolitos específicos de la diabetes se determinaron mediante un análisis univariante: en primer lugar, aplicando una prueba estadística de comparación entre los pacientes diabéticos y los sujetos de control (prueba de la t), y en segundo lugar, seleccionando los metabolitos expresados diferencialmente con unos valores de p lo suficientemente bajos ($p < 0,05$). Adicionalmente se determinó el número de veces de cambio de los valores (es decir, las proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación (que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")) para cada metabolito.

20 En las siguientes Tablas 1 a 8 se presentan los resultados de la evaluación de los datos. Las Tablas 1 a 4 muestran los resultados para los metabolitos que no han sido notificados para pacientes diabéticos en la bibliografía disponible. Los metabolitos mencionados en las Tablas 5 a 8 ya han sido descritos para pacientes diabéticos. Las Tablas 1 y 5 muestran los resultados obtenidos para todos los conjuntos de datos disponibles generados de acuerdo con el presente estudio sin una estratificación por género (no estratificados). Las Tablas 2 y 6 muestran los resultados de los pacientes macho estratificados por edades, mientras que las Tablas 3 y 7 muestran los resultados de las hembras estratificados por edades. Las Tablas 4 y 8 contienen los resultados integrados de las Tablas 2 y 3 así como de las Tablas 6 y 7, respectivamente. Los resultados presentados en las tablas están ordenados de acuerdo con su potencial y eficacia como biomarcadores para la diabetes o una predisposición a la misma. También se indica el tipo de regulación observada. "Por encima" se refiere a un aumento en la cantidad absoluta o relativa del metabolito, mientras que "por debajo" se refiere a una disminución en dicha cantidad absoluta o relativa, o incluso a una ausencia del metabolito en cantidades detectables. Los metabolitos que están particularmente fuertemente asociados con la diabetes están subdivididos en grupos indicados por las líneas divisorias de las Tablas.

35 Tabla 1: nuevos metabolitos específicos para la diabetes determinados sobre un conjunto de datos completo. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t ") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")).

Tabla 1: resultados globales no estratificados

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
1,5-anhidrosorbitol	por debajo	0,83	1,68E-10
ácido eicosenoico (C20:1)	por encima	1,23	3,68E-09
eritrol	por encima	1,17	1,87E-08
ácido ribónico	por encima	1,12	0,000207352
ácido tricosanoico (C23:0)	por debajo	0,91	0,000690021
pentadecanol	por encima	1,14	0,002821548
campesterol	por debajo	0,92	0,008032527
ácido maleico	por debajo	0,93	0,012630545
ácido melísico (C30:0)	por debajo	0,97	0,032299205

40 Tabla 2: nuevos metabolitos específicos para la diabetes determinados sobre machos emparejados por edades. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t ") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos

("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")).

Tabla 2: resultados de machos estratificados según la edad

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
1,5-anhidrosorbitol	por debajo	0,715966162	5,46E-07
ácido eicosenoico (C20:1)	por encima	1,289836715	0,00169478
pentadecanol	por encima	1,215689075	0,029197314

5 Tabla 3: nuevos metabolitos específicos para la diabetes determinados sobre hembras emparejadas por edades. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")).

Tabla 3: resultados de hembras estratificados según la edad

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
ácido eicosenoico (C20:1)	por encima	1,179797938	0,001492544
campesterol	por debajo	0,808075198	0,003629138
ácido tricosanoico (C23:0)	por debajo	0,894095758	0,013812625
ácido ribónico	por encima	1,138360459	0,01522522
eritrol	por encima	1,129463926	0,033964934

15 Tabla 4: nuevos metabolitos específicos para la diabetes combinados a partir de las Tablas 1 - 3. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")).

Tabla 4: resultados integrados

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	P. t
1,5-anhidrosorbitol	por debajo	0,829793095	1,68E-10
ácido eicosenoico (C20:1)	por encima	1,232521755	3,68E-09
eritrol	por encima	1,165086499	1,87E-08
ácido ribónico	por encima	1,123283244	0,000207352
ácido tricosanoico (C23:0)	por debajo	0,914819475	0,000690021
pentadecanol	por encima	1,137229303	0,002821548
campesterol	por debajo	0,808075198	0,003629138
ácido maleico	por debajo	0,925831953	0,012630545
ácido melísico (C30:0)	por debajo	0,967955786	0,032299205

25 Tabla 5: metabolitos específicos para la diabetes determinados sobre el conjunto de datos completo. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")). El hallazgo trivial de unos niveles de glucosa significativamente alterados en los pacientes diabéticos

ES 2 525 345 T3

con respecto a los sujetos de control fue excluido de la tabla.

Tabla 5: resultados globales no estratificados

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
ácido ascórbico	por encima	1,46	3,36E-57
manosa	por encima	1,49	1,73E-42
valina	por encima	1,20	5,67E-21
isoleucina	por encima	1,23	4,91 E-20
leucina	por encima	1,19	7,13E-18
ácido úrico	por encima	1,22	3,51E-17
cisteína	por encima	1,27	6,53E-15
posible dag (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3)	por encima	1,35	1,65E-14
piruvato	por encima	1,43	1,08E-13
glicerol, fracción lipídica	por encima	1,36	2,60E-13
alanina	por encima	1,16	9,73E-13
ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	por encima	1,35	2,92E-12
ácido a-cetoisocaproico	por encima	1,36	3,71E-12
tirosina	por encima	1,15	3,94E-12
coenzima Q10	por encima	1,44	4,82E-12
fenilalanina	por encima	1,12	4,79E-10
ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4)	por encima	1,18	1,03E-09
ácido palmítico (C16:0)	por encima	1,16	2,25E-09
glicina	por debajo	0,88	3,11E-07
metionina	por encima	1,12	3,97E-07
ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5)	por encima	1,40	6,24E-07
prolina	por encima	1,13	8,62E-07
ácido pantoténico	por encima	1,15	8,71E-07
ácido esteárico (C18:0)	por encima	1,12	1,88E-06
citrato	por encima	1,10	2,00E-06
ácido heptadecanoico (C17:0)	por encima	1,13	3,08E-06
ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1)	por encima	1,23	1,01 E-05
urea	por encima	1,15	1,39E-05
ácido mirístico (C14:0)	por encima	1,24	2,07E-05
trans-4-hidroxiprolin	por encima	1,17	3,23E-05
ácido 3-hidroxibutírico	por encima	1,29	5,88E-05
malato	por encima	1,09	7,55E-05
ácido lignocérico (C24:0)	por debajo	0,92	0,000180162
mioinositol	por encima	1,10	0,00026466
fosfato (inorgánico y de fosfatos orgánicos)	por encima	1,06	0,000360853
glicerol, fracción polar	por encima	1,12	0,000497516
lisina	por encima	1,09	0,001206357
creatinina	por encima	1,12	0,004335171
ácido treónico	por debajo	0,90	0,00480835
succinato	por debajo	0,93	0,005840745
ácido glicérico	por debajo	0,90	0,006088538
ácido linolénico (C18:cis[9,12,15]3)	por encima	1,10	0,006887601
lactato	por encima	1,10	0,007055085
glicerol-3-fosfato, fracción polar	por encima	1,08	0,010395131
treonina	por debajo	0,95	0,011333993

(continuación)

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
fosfato, lípido (fosfolípidos)	por debajo	0,96	0,011654865
alfa-tocoferol	por encima	1,15	0,01644293
mioinositol-2-monofosfato, fracción lipídica (mioinositolfosfolípidos)	por encima	1,10	0,023497772
ácido linoleico (C18:cis[9,12]2)	por encima	1,05	0,029803521
colesterol	por debajo	0,95	0,040018899
triptófano	por encima	1,04	0,044645682
glutamina	por encima	1,08	0,048316597

Tabla 6: metabolitos específicos para la diabetes determinados sobre machos emparejados por edades. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")). El hallazgo trivial de unos niveles de glucosa significativamente alterados en los pacientes diabéticos con respecto a los sujetos de control fue excluido de la tabla.

5

10

Tabla 6: resultados de machos estratificados según la edad

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
ácido ascórbico	por encima	1,484165764	4,48E-16
manosa	por encima	1,441573-139	1,02E-10
triacilglicéridos (que contienen C16:1, C18:1 o C16:0)	por encima	1,241759768	5,15E-06
glicerol, fracción lipídica	por encima	1,450283984	0,000120249
valina	por encima	1,1519912	0,000250545
glicina	por debajo	0,893625097	0,000402058
ácido úrico	por encima	1,154617325	0,000417209
alanina	por encima	1,135942086	0,000824962
isoleucina	por encima	1,14342636	0,000977933
leucina	por encima	1,122545097	0,001040907
ácido a-cetoisocaproico	por encima	1,237299055	0,001333169
cisteína	por encima	1,185825621	0,002788438
ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1)	por encima	1,335554411	0,003179817
ácido palmítico (C16:0)	por encima	1,154644873	0,00355258
fosfato (inorgánico y de fosfatos orgánicos)	por encima	1,085474184	0,003897319
tirosina	por encima	1,101189829	0,006262303
ácido pantoténico	por encima	1,150110477	0,008641156
ácido mirístico (C14:0)	por encima	1,347548843	0,00904407
coenzima Q10	por encima	1,358078148	0,010579477
piruvato	por encima	1,219379362	0,01116163
ácido esteárico (C18:0)	por encima	1,135222404	0,01651251
ácido heptadecanoico (C17:0)	por encima	1,135873084	0,016656669
ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4)	por encima	1,113293751	0,017485633
citrato	por encima	1,085160753	0,017527845
ácido treónico	por debajo	0,841572782	0,02001934
treonina	por debajo	0,92665537	0,029210563
prolina	por encima	1,103973996	0,034468001
fenilalanina	por encima	1,088412821	0,035540147
glicerol, fracción polar	por encima	1,146918974	0,038229859
ornitina	por debajo	0,920136988	0,042452599
malato	por encima	1,104999923	0,04703203

5 Tabla 7: metabolitos específicos para la diabetes determinados sobre hembras emparejadas por edades. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1 ("por debajo")). El hallazgo trivial de unos niveles de glucosa significativamente alterados en los pacientes diabéticos con respecto a los sujetos de control fue excluido de la tabla.

Tabla 7: resultados de las hembras emparejadas por edades

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
ácido ascórbico	por encima	1,380715922	2,95E-15
manosa	por encima	1,462099754	2,85E-14
isoleucina	por encima	1,249533174	3,91 E-10
valina	por encima	1,216130562	9,47E-10
leucina	por encima	1,209312876	4,11E-09
ácido úrico	por encima	1,212338486	3,68E-07
posible DAG (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3)	por encima	1,334873111	1,96E-06
piruvato	por encima	1,422173491	2,55E-06
glicerol, fracción lipídica	por encima	1,293094601	3,32E-06
cisteína	por encima	1,218774727	2,91 E-05
alanina	por encima	1,151999587	3,40E-05
ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4)	por encima	1,184397856	4,34E-05
ácido a-cetoisocaproico	por encima	1,331702228	6,58E-05
tirosina	por encima	1,140901171	7,41 E-05
fenilalanina	por encima	1,117874407	0,000102016
ácido palmítico (C16:0)	por encima	1,151136844	0,000163626
ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	por encima	1,26073495	0,000260771
glicina	por debajo	0,865358103	0,000565068
ácido esteárico (C18:0)	por encima	1,111573897	0,00072957
coenzima Q10	por encima	1,266195595	0,000749378
metionina	por encima	1,105511152	0,002156394
prolina	por encima	1,12556561	0,002831665
citrulina	por debajo	0,913837925	0,004639509
ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5)	por encima	1,365025845	0,005431358
fósforo (inorgánico y de fosfatos orgánicos)	por encima	1,081308636	0,006424403
triptófano	por encima	1,072449337	0,011971631
ácido 3-hidroxiбутírico	por encima	1,173601577	0,012617371
ácido heptadecanoico (C17:0)	por encima	1,101194333	0,014202784
ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]11)	por encima	1,171432156	0,014395605
ácido lignocérico (C24:0)	por debajo	0,904681793	0,014423836
malato	por encima	1,094591121	0,019963926
ácido mirístico (C14:0)	por encima	1,161581037	0,022090354
glicerol, fracción polar	por encima	1,112976588	0,039329749
trans-4-hidroxiprolina	por encima	1,155965403	0,048937139

10 Tabla 8: metabolitos específicos para la diabetes combinados a partir de las Tablas 1 - 3. Los metabolitos ("NOMBRE QUÍMICO") están clasificados de acuerdo con el valor de p de la prueba de la t ("p. t") partiendo de los hallazgos más significativos. También se proporcionan los valores del número de veces de cambio ("Número de veces de cambio": proporciones de las señales medias de los pacientes diabéticos divididas por las proporciones de las señales medias de los sujetos de control) y el tipo de regulación en los pacientes diabéticos ("Tipo de regulación": que distingue si el número de veces de cambio está por encima de 1 ("por encima") o por debajo de 1

15

("por debajo"). El hallazgo trivial de unos niveles de glucosa significativamente alterados en los pacientes diabéticos con respecto a los sujetos de control fue excluido de la tabla.

Tabla 8: resultados integrados

Nombre químico	Regulación	Número de veces de cambio	p. t
ácido ascórbico	por encima	1,460897562	3,36E-57
manosa	por encima	1,49099366	1,73E-42
valina	por encima	1,201219187	5,67E-21
isoleucina	por encima	1,226340595	4,91 E-20
leucina	por encima	1,189558225	7,13E-18
ácido úrico	por encima	1,221580228	3,51E-17
cisteína	por encima	1,272344952	6,53E-15
posible DAG (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3)	por encima	1,354261116	1,65E-14
piruvato	por encima	1,428873302	1,08E-13
glicerol, fracción lipídica	por encima	1,356574719	2,60E-13
alanina	por encima	1,1628012	9,73E-13
ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	por encima	1,351684129	2,92E-12
ácido a-cetoisocaproico	por encima	1,355419473	3,71E-12
tirosina	por encima	1,147988422	3,94E-12
coenzima Q10	por encima	1,437313752	4,82E-12
fenilalanina	por encima	1,121836648	4,79E-10
ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4)	por encima	1,177263087	1,03E-09
ácido palmítico (C16:0)	por encima	1,157367192	2,25E-09
glicina	por debajo	0,883191047	3,11 E-07
metionina	por encima	1,122195372	3,97E-07
ácido eicosapentaenoico (C20: cis[5,8,11,14,17]5)	por encima	1,403223234	6,24E-07
prolina	por encima	1,13167844	8,62E-07
ácido pantoténico	por encima	1,154905329	8,71 E-07
ácido esteárico (C18:0)	por encima	1,11726154	1,88E-06
citrato	por encima	1,098766652	2,00E-06
ácido heptadecanoico (C17:0)	por encima	1,13334341	3,08E-06
ácido trans-9-hexadecenoico (C16arans[9]1)	por encima	1,231675019	1,01E-05
urea	por encima	1,14574428	1,39E-05
ácido mirístico (C14:0)	por encima	1,243213274	2,07E-05
trans-4-hidroxiprolina	por encima	1,170068568	3,23E-05
ácido 3-hidroxibutírico	por encima	1,289932939	5,88E-05
malato	por encima	1,094925736	7,55E-05
ácido lignocérico (C24:0)	por debajo	0,917996389	0,000180162
mioinositol	por encima	1,101603199	0,00026466
fosfato (inorgánico y de fosfatos orgánicos)	por encima	1,063347665	0,000360853
glicerol, fracción polar	por encima	1,124778954	0,000497516
lisina	por encima	1,090319289	0,001206357
creatinina	por encima	1,121185726	0,004335171
citrulina	por debajo	0,913837925	0,004639509
ácido treónico	por debajo	0,899837419	0,00480835
succinato	por debajo	0,92986853	0,005840745
ácido glicérico	por debajo	0,903105894	0,006088538
ácido linolénico (c18:cis[9,12,15]3)	por encima	1,095025387	0,006887601
lactato	por encima	1,104215189	0,007055085
glicerol-3-fosfato, fracción polar	por encima	1,084629455	0,010395131
treonina	por debajo	0,95499908	0,011333993
fosfato, lípido (fosfolípidos)	por debajo	0,958528553	0,011654865
triptófano	por encima	1,072449337	0,011971631
alfa-tocoferol	por encima	1,14791735	0,01644293
mioinositol-2-monofosfato, fracción lipídica (mioinositolfosfolípidos)	por encima	1,097917328	0,023497772
ácido linoleico (C18:cis[9,12]2)	por encima	1,048610793	0,029803521
colesterol	por debajo	0,946204153	0,040018899
ornitina	por debajo	0,920136988	0,042452599
glutamina	por encima	1,075976861	0,048316597

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el diagnóstico de la diabetes que comprende:

(a) la determinación de al menos un metabolito en una muestra de sangre, de suero o de plasma de un sujeto sospechoso de padecer diabetes de tipo 2, siendo dicho al menos un metabolito el ácido tricosaenoico (C23:0); y
 5 (b) la comparación de los resultados del ensayo de determinación de la etapa (a) con una referencia, mediante lo cual se va a diagnosticar la diabetes de tipo 2.

(i) en el que dicha referencia deriva de un sujeto o de un grupo del que se sabe que padecen diabetes de tipo 2 y mediante el cual unos resultados idénticos para la muestra de sangre, de suero o de plasma y la referencia son indicativos de una diabetes de tipo 2, o

10 (ii) en el que dicha referencia deriva de un sujeto o de un grupo del que se sabe que no padecen diabetes de tipo 2 y mediante el cual la ausencia de dicho al menos un metabolito o de una cantidad del mismo que difiere en la muestra de sangre, de suero o de plasma en comparación con la muestra de referencia es indicativo de una diabetes de tipo 2, o

15 (iii) en el que dicha referencia es una referencia calculada para el dicho al menos un metabolito en una población de sujetos, y mediante la cual la ausencia de dicho al menos un metabolito o de una cantidad del mismo que difiere en la muestra de sangre, de suero o de plasma en comparación con la muestra referencia es indicativo de una diabetes de tipo 2.

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

20 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha espectrometría de masas es una cromatografía líquida (LC) con MS y/o una cromatografía de gas (GC) con MS.

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

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

25 (i) un ácido graso saturado de cadena larga, preferiblemente, ácido lignocérico (C24:0) o ácido melísico (C30:0),
 (ii) un ácido graso poliinsaturado, preferiblemente, ácido docosaheptaenoico (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 linoléico (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,

(vii) manosa, ácido alfa-cetoisocaproico, glicerol, fracción lipídica o ácido 3-hidroxi-butírico, y

35 (viii) glucosa.

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

(i) ácido ascórbico;

(ii) manosa;

40 (iii) valina e isoleucina;

(iv) ácido úrico y leucina;

(v) cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosaheptaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico

45 (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-4-hidroxi-prolina, ácido 3-hidroxi-butírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;

50 (xv) manosa, valina, isoleucina, leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosaheptaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, heptadecanoico ácido (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-4-hidroxi-prolina, ácido 3-hidroxi-butírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linoléico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol,

- mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;
- (xvi) valina, isoleucina, leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-4-hidroxiprolina, ácido 3-hidroxibutírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linolénico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;
- (xvii) leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, coenzima Q10, fenilalanina, ácido araquidónico (C20:cis-[5,8,11,14]4), ácido palmítico (C16:0), glicina, metionina, ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), prolina, ácido pantoténico, ácido esteárico (C18:0), citrato, ácido heptadecanoico (C17:0), ácido trans-9-hexadecenoico (C16:trans[9]1), urea, ácido mirístico (C14:0), trans-4-hidroxiprolina, ácido 3-hidroxibutírico, malato, ácido lignocérico (C24:0), mioinositol, fosfato, glicerol, fracción polar, lisina, creatinina, citrulina, ácido treónico, succinato, ácido glicérico, ácido linolénico (C18:cis[9,12,15]3) lactato, glicerol-3-fosfato, fracción polar, treonina, fosfolípidos, triptófano, alfa-tocoferol, mioinositolfosfolípidos, ácido linoleico (C18:cis[9,12]2), colesterol, ornitina y glutamina;
- (xviii) ácido ascórbico y manosa;
- (xix) ácido ascórbico, manosa, valina e isoleucina;
- (xx) ácido ascórbico, manosa, valina, isoleucina, ácido úrico y leucina;
- (xxi) ácido ascórbico, manosa, valina, isoleucina, leucina, ácido úrico, cisteína, diacilglicerol (C18:1, C18:2 o C18:0, C18:3), piruvato, triacilglicerol, alanina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), ácido alfa-cetoisocaproico, tirosina, y coenzima Q10; y
- (xxii) glucosa
7. Uso de un medio diagnóstico que comprende un medio para la determinación del ácido tricosanoico (C23:0) para el diagnóstico de la diabetes de tipo 2 mediante la determinación del ácido tricosanoico (C23:0) como biomarcador en una muestra de sangre, de suero o de plasma.
8. Uso del ácido tricosanoico (C23:0) como biomarcador en una muestra de sangre, de suero o de plasma para el diagnóstico de la diabetes de tipo 2 en un sujeto.