

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 807**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/US2014/071035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14870759 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3082833**

54 Título: **Biomarcadores de la lipogénesis de novo y métodos que los emplean**

30 Prioridad:

**20.12.2013 US 201361918866 P**  
**31.01.2014 US 201461934033 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.04.2019**

73 Titular/es:

**METABOLON, INC. (100.0%)**  
**617 Davis Drive, Suite 400**  
**Durham, NC 27713, US**

72 Inventor/es:

**WATKINS, STEVEN M.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 708 807 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

Biomarcadores de la lipogénesis *de novo* y métodos que los emplean

**Campo**

5 En la presente se describen biomarcadores, métodos para identificar biomarcadores correlacionados con la lipogénesis *de novo* y métodos basados en estos biomarcadores.

**Antecedentes**

10 La lipogénesis *de novo* ("de novo lipogenesis", DNL) es el proceso fisiológico que consiste en sintetizar ácidos grasos a partir de un sustrato, un proceso que en los seres humanos se produce principalmente en el hígado. El proceso ha resultado difícil de evaluar *in vivo*, debido a que la cantidad de grasa en la sangre no está en una proporción directa con la DNL. La lipogénesis aporta una minoría de los ácidos grasos presentes en seres humanos; la mayoría de los ácidos grasos provienen de la dieta, pero el proceso de la lipogénesis puede ser un indicador importante del estado de salud. Una medición basada en la sangre de la lipogénesis permitiría medir el impacto de la dieta, el estilo de vida y las terapias sobre la DNL y la evaluación de la contribución de la DNL a enfermedades.

15 Los niveles absolutos de los ácidos grasos individuales en sangre no son indicativos de DNL, debido a que la mayoría de los ácidos grasos en seres humanos provienen de la dieta, incluyendo los ácidos grasos que también son los productos directos de la lipogénesis. Así, una medición directa de un ácido graso individual en sangre no puede diferenciar entre un ácido graso de la dieta y un ácido graso derivado de DNL. Además, el nivel absoluto de todos los lípidos en sangre puede ser alto o bajo dependiendo de procesos biológicos no relacionados con la DNL (por ejemplo, una eliminación lenta del VLDL).

20 Para solucionar esta limitación, los procedimientos actuales para medir la lipogénesis *de novo* implican el uso de isótopos estables, en particular a través de la ingestión de agua pesada. Por tanto, este método no se emplea de modo general en la clínica.

25 Las enfermedades que implican a la DNL incluye diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica ("non-alcoholic steatohepatitis", NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular (hipertrigliceridemia), y trastornos de la piel. Resulta deseable emplear métodos mínimamente invasivos o no invasivos para medir el nivel de ácidos grasos en sangre y/o la piel que son indicativos de la lipogénesis *de novo* en seres humanos, y normalizar el efecto del contenido total de lípidos en sangre en la evaluación empleando estos valores medidos para determinar la cantidad de lipogénesis *de novo* en un individuo.

30 Lyons Jones *et al.*, Am. J. Med. Genet., parte A, 161A:1860-1865 (2013) describen métodos para evaluar el metabolismo de lípidos en la gastrosquisis. Peter *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. (2011), 96(7):E1126-E1130 investigan la relación entre la expresión de glucoquinasa y marcadores de la lipogénesis, y el uso del índice de DNL de los ácidos grasos C16:0/C18:2. El documento US2009/0239253 describe el uso de diversos ácidos grasos en métodos para evaluar la lipogénesis.

**Sumario de la invención**

35 La presente invención proporciona un método para determinar el nivel de lipogénesis *de novo* en un sujeto como se reivindica en la reivindicación 1. También se describe un método para determinar el nivel de lipogénesis *de novo* en un sujeto, comprendiendo dicho método analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la lipogénesis *de novo* (DNL) en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 40 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; y comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para determinar el nivel de lipogénesis *de novo* en el sujeto.

45 También se describe un método para determinar si un sujeto está predispuesto o está en riesgo de desarrollar enfermedades que están relacionadas con la lipogénesis *de novo* (por ejemplo, diabetes, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, hipertrigliceridemia), comprendiendo dicho método analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la lipogénesis *de novo* (DNL) en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 50 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; y comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para determinar si el sujeto está predispuesto a desarrollar dicha enfermedad relacionado con la lipogénesis *de novo*.

55 También se describe un método para controlar el inicio/avance/regresión de una enfermedad o un trastorno relacionado con la DNL en un sujeto, comprendiendo dicho método analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la DNL en la muestra, en el que dichos

uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; y comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia de avance de la DNL y/o regresión de la DNL para controlar el inicio/avance/regresión de la enfermedad o el trastorno relacionado con la DNL en el sujeto.

- 5 También se describe un método para predecir si un sujeto padece una enfermedad o un trastorno relacionado con la DNL, que comprende analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la DNL en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; y comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para predecir si el sujeto padece una enfermedad o un trastorno relacionado con la DNL.

15 Las mediciones de dichos uno o más biomarcadores de DNL, o sus combinaciones, pueden usarse para generar un índice de DNL que puede emplearse para evaluar la DNL en un sujeto. El método comprende analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones, generar un modelo matemático que comprende los niveles medidos de dichos uno o más biomarcadores (índice de DNL), calcular una puntuación del índice de DNL basándose en el índice de DNL, y comparar la puntuación del índice de DNL con niveles de referencia de DNL para evaluar la DNL en el sujeto.

20 También se describe un método para controlar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad o un trastorno relacionado con la DNL, comprendiendo dicho método analizar una primera muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la DNL en la muestra, obteniéndose dicha primera muestra del sujeto en un primer momento, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; tratar el sujeto para una enfermedad o un trastorno relacionado con la DNL; analizar una segunda muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores, obteniéndose dicha segunda muestra del sujeto en un segundo momento después del tratamiento; comparar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores en la primera muestra con el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la segunda muestra para evaluar la eficacia del tratamiento para tratar una enfermedad o un trastorno relacionado con la DNL.

35 También se describen métodos para evaluar la lipogénesis en la piel y su relación con la función de la piel (por ejemplo, para evaluar la producción de sebo, el riesgo de acné, etc.), comprendiendo dicho método analizar una muestra de piel, epidérmica, de células de la piel o de sebo procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la DNL en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; y comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para evaluar la lipogénesis en la piel.

### Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 es un ejemplo de un algoritmo médico para la gestión de pacientes que ilustra si el índice de DNL sería útil en la práctica clínica para determinar niveles aberrantes de lipogénesis *de novo*, el tratamiento recomendado, el control de la lipogénesis *de novo* y el control del efecto de una intervención de tratamiento sobre la lipogénesis *de novo*.

45 La figura 2 es una gráfica que muestra las puntuaciones del índice de DNL de células tratadas con un inhibidor de DNL empleando la fracción de fosfolípidos de células. La caja representa el 50% intermedio de la distribución, y las "prolongaciones" superiores e inferiores representan la extensión completa de los datos. El guion se refiere al promedio y el círculo a los valores atípicos. El eje de ordenadas indica la mediana del valor escalado.

La figura 3 es una gráfica de cajas que muestra las puntuaciones del índice de DNL de células tratadas con un inhibidor de DNL empleando la fracción de triglicéridos de células.

50 La figura 4 es una gráfica de cajas que muestra las puntuaciones del índice de DNL de células tratadas con las dosis indicadas de un inhibidor de DNL.

La figura 5 es una gráfica de cajas que muestra las puntuaciones del índice de DNL de seres humanos con NASH o NAFLD comparados con sujetos control normales.

55 La figura 6 muestra el área bajo la curva ("area under the curve", AUC) de tres modelos para predecir la diabetes. Las curvas características de la actuación del receptor muestran la mayor capacidad del índice de DNL para predecir la diabetes, además de la respuesta aguda a la insulina ("acute insulin response", AIR), y la sensibilidad a la insulina (Si).

La figura 7 es una gráfica de cajas que muestra las puntuaciones del índice de DNL de sebo de una piel tratada con un placebo o con un inhibidor de la DNL usando el índice DNL de sebo 1 y el índice de DNL 2.

5 La figura 8 es una gráfica que muestra la correlación de las puntuaciones del índice de DNL empleando el índice de DNL 1, el índice de DNL 2 y el índice de DNL 3 de muestras de plasma humano con la contribución fraccionaria de la lipogénesis *de novo* (fDNL) en los pacientes.

10 La figura 9 son gráficas de cajas que muestran la distribución de valores para las puntuaciones del índice de DNL para pacientes con NASH y sin NASH. Los pacientes con NASH están a la izquierda y los pacientes sin NASH están a la derecha. A. Índice de DNL 1, el valor de p para la asociación con las puntuaciones del índice de DNL 1 y el diagnóstico de NASH fue de 0,027. B. Índice de DNL 2, el valor de p para la asociación con las puntuaciones del índice de DNL 2 y el diagnóstico de NASH fue de 0,002. C. Índice de DNL 3, el valor de p para la asociación con las puntuaciones del índice de DNL 3 y el diagnóstico de NASH fue de 0,004.

15 La figura 10 son gráficas de cajas que muestran la distribución de valores para las puntuaciones del índice de DNL para pacientes con grados de esteatosis. A. Es la gráfica del índice de DNL 1; B. Es la gráfica del índice de DNL 2; C. Es la gráfica del índice de DNL 3. La puntuación del índice de DNL está en el eje de ordenadas y el grado de esteatosis en el eje de abscisas. El valor de p para la asociación con las puntuaciones del índice de DNL 1 y el diagnóstico de NASH fue <0,001. El valor de p para la asociación con las puntuaciones del índice de DNL 2 y el diagnóstico de NASH fue <0,001. El valor de p para la asociación con las puntuaciones del índice de DNL 3 y el diagnóstico de NASH fue <0,001.

### Descripción detallada de la invención

20 En la presente se describen biomarcadores de la DNL; métodos para determinar la DNL; métodos para diagnosticar enfermedades relacionadas con la DNL; métodos para determinar la predisposición a enfermedades relacionadas con la DNL; métodos para controlar el avance/regresión de enfermedades relacionadas con la DNL; métodos para predecir enfermedades o trastornos relacionados con la DNL; métodos para generar un índice de DNL; métodos para controlar la eficacia de tratamientos para enfermedades relacionadas con la DNL; así como otros métodos basados en biomarcadores del DNL.

25 Sin embargo, antes de describir con más detalle esta invención, primero se definirán los siguientes términos y expresiones.

Definiciones:

30 La "lipogénesis *de novo*" o "DNL" se refiere al proceso fisiológico que consiste en sintetizar ácidos grasos a partir de un sustrato.

La "DNL fraccionaria" o "fDNL" es una medición de la fracción de los ácidos grasos recién sintetizados en VLDL-triacilglicerol. El método emplea isótopos estables.

35 El "índice de DNL" se refiere a una medición de la lipogénesis *de novo* basada en los biomarcadores de la DNL y en algoritmos médicos descritos en la presente que permiten la evaluación de la lipogénesis *de novo in vivo*. El "índice de DNL" se refiere a una ecuación matemática que emplea los biomarcadores de la DNL. La "puntuación del índice de DNL" se refiere al valor obtenido del índice de DNL o como resultado de emplear el índice de DNL.

40 Un "algoritmo médico" o "algoritmo de gestión del paciente" se refiere a cualquier cálculo, fórmula, estudio estadístico, nomograma o tabla de consulta útil en la asistencia sanitaria. Los algoritmos médicos incluyen estrategias de árboles de decisión para el tratamiento (por ejemplo, si los síntomas A, B, y C son evidentes, entonces usar el tratamiento X) y para el diagnóstico (por ejemplo, si los síntomas E, F, y G son evidentes, entonces el diagnóstico es Z o el ensayo de diagnóstico que se debe realizar es Y) en la asistencia sanitaria. Los algoritmos médicos pueden incluir nomogramas de diagnóstico o diagramas de flujo de diagnóstico en forma, por ejemplo, de un árbol de decisión binario.

45 Una "enfermedad relacionada con la DNL" o "trastorno relacionado con la DNL", tal como se emplea en la presente, se refiere a la diabetes y trastornos relacionados, que incluyen la prediabetes, la resistencia a la insulina, y la diabetes de tipo 2, así como la obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica ("non-alcoholic steatohepatitis", NASH), cáncer, y enfermedad cardiovascular, que incluye hipertrigliceridemia, aterosclerosis, cardiomiopatía, y trastornos de la piel.

50 Una "enfermedad cardiovascular" se refiere a cualquier enfermedad del corazón o los vasos sanguíneos. La enfermedad cardiovascular o cardíaca incluye, pero no se limita, por ejemplo, a angina, arritmia, enfermedad de la arteria coronaria ("coronary artery disease", CAD), enfermedad cardíaca coronaria, cardiomiopatía (que incluye cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica, y cardiomiopatía diabética), ataque al corazón (infarto de miocardio), insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía hipertrófica, regurgitación mitral, prolapso de la válvula mitral, estenosis pulmonar, etc. La enfermedad de los vasos sanguíneos incluye, pero no se limita, por ejemplo, a enfermedad vascular periférica, enfermedad de las arterias,

enfermedad de la arteria carótida, trombosis de venas profundas, enfermedades venosas, aterosclerosis, etc.

La “diabetes” se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por unos niveles altos de azúcar en sangre (glucosa) que surgen como consecuencia de defectos en la secreción o la acción de la insulina, o de ambos.

5 La “diabetes de tipo 2” se refiere a uno de los dos tipos principales de diabetes, el tipo en el que las células beta del páncreas producen insulina, al menos en los estadios tempranos de la enfermedad, pero el cuerpo es incapaz de utilizarla de modo eficaz porque las células del cuerpo son resistentes a la acción de la insulina. En estadios posteriores de la enfermedad, las células beta pueden dejar de producir insulina. La diabetes de tipo 2 también se conoce como diabetes resistente a la insulina, diabetes no dependiente de insulina y diabetes de aparición en la etapa adulta.

10 La “prediabetes” se refiere a uno o más trastornos diabéticos tempranos, que incluyen una utilización alterada de la glucosa, unos niveles anómalos o alterados de glucosa en ayunas, una tolerancia alterada a la glucosa, una sensibilidad alterada a la insulina y la resistencia a la insulina.

15 La “resistencia a la insulina” se refiere al trastorno en el que las células se convierten en resistentes a los efectos de la insulina —una hormona que regula la captación de glucosa hacia el interior de las células— o cuando la cantidad de insulina producida es insuficiente para mantener un nivel normal de glucosa. La capacidad de las células para responder a la acción de la insulina para estimular el transporte del azúcar glucosa desde la sangre hacia los músculos y otros tejidos disminuye (es decir, disminuye la sensibilidad a la insulina). Con el tiempo, el páncreas produce mucha más insulina de lo normal y las células continúan siendo resistentes. Siempre que se produzca la suficiente insulina para superar esta resistencia, los niveles de glucosa en sangre permanecen normales. Cuando el páncreas ya no es capaz de seguir este ritmo, la glucosa en sangre empieza a aumentar, dando como resultado una diabetes. La resistencia a la insulina varía desde normal (sensible a la insulina) a resistente a la insulina (“insulin resistant”, IR).

25 La “sensibilidad a la insulina” o “ $S_i$ ” se refiere a la capacidad de las células para responder a los efectos de la insulina para regular la captación y la utilización de glucosa. La sensibilidad a la insulina varía de normal a resistente a la insulina (IR).

La “utilización de glucosa” se refiere a la absorción de glucosa desde la sangre por el músculo y las células grasas, y a la utilización del azúcar para el metabolismo celular. La captación de glucosa hacia el interior de las células es estimulada por la insulina.

30 La “obesidad” se refiere a un trastorno crónico definido por una cantidad en exceso de grasa corporal. La cantidad normal de grasa corporal (expresada como porcentaje de peso corporal) es de entre 25-30% en mujeres y de 18-23% en hombres. Las mujeres con más del 30% de grasa corporal y los hombres con más del 25% de grasa corporal se consideran obesos.

35 Los “trastornos de la piel” se refieren a trastornos que afectan a la producción o a la calidad del sebo, e incluyen acné, eccema seborreico y piel aceitosa, o trastornos que afectan al estrato córneo, que incluyen psoriasis, rosácea, piel seca, caspa, función de barrera hídrica, etc. Los trastornos de la piel relacionados con la lipogénesis *de novo* también pueden incluir cánceres, tales como melanomas.

40 El “índice de masa corporal” (“Body Mass Index”, BMI) se refiere al cálculo que emplea la altura y el peso de un individuo para calcular la cantidad de grasa corporal del individuo. Un exceso de grasa corporal (por ejemplo, obesidad) puede conducir a enfermedades y otros problemas de salud. El BMI es la medición elegida por muchos médicos e investigadores que estudian la obesidad. El BMI se calcula empleando una fórmula matemática que considera la altura y el peso del individuo. El BMI es igual al peso de la persona en kilogramos dividido entre la altura en metros al cuadrado ( $BMI = kg/m^2$ ). Se considera que los sujetos que tienen un BMI menor que 19 tienen un peso demasiado bajo, mientras que se considera que los que tienen un BMI de entre 19 y 25 tienen un peso normal, se considera en general que los que tienen un BMI de entre 25 y 29 tienen sobrepeso, y generalmente se considera que los individuos con un BMI de 30 o más son obesos. La obesidad mórbida se refiere a un sujeto que tiene un BMI de 40 o mayor.

50 Una “muestra” o “muestra biológica” o “espécimen” significa un material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar los biomarcadores deseados y puede comprender material celular y/o no celular procedente del sujeto. La muestras pueden aislarse a partir de cualquier tejido o fluido biológico adecuado, tal como, por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero, piel, tejido epidérmico, tejido adiposo, tejido aórtico, tejido hepático, orina, sebo o muestras de células.

Un “sujeto” significa cualquier animal, pero preferiblemente es un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, mono, primate no humano, rata, ratón, vaca, perro, gato, cerdo, caballo o conejo.

55 El “nivel” de uno o más biomarcadores significa la cantidad o concentración absoluta o relativa del biomarcador en la muestra.

Un “nivel de referencia” de un biomarcador significa un nivel del biomarcador que es indicativo de un estado de enfermedad o fenotipo concretos, o la ausencia de estos, así como de combinaciones de estados de enfermedad, fenotipos o la ausencia de estos. Un nivel de referencia “positivo” de un biomarcador significa un nivel que es indicativo de un estado de enfermedad o fenotipo concretos. Un nivel de referencia “negativo” de un biomarcador significa un nivel que es indicativo de la ausencia de un estado de enfermedad o fenotipo concretos. Por ejemplo, un “nivel de referencia DNL-positivo” de un biomarcador significa un nivel del biomarcador que es indicativo de un aumento en la medición de la DNL en un sujeto, y un “nivel de referencia DNL-negativo” de un biomarcador significa un nivel del biomarcador que es indicativo de una medición disminuida de la DNL en un sujeto. Como otro ejemplo, un “nivel de referencia DNL-positivo al avance” de un biomarcador significa un nivel del biomarcador que es indicativo del avance de la DNL en un sujeto, y un “nivel de referencia DNL-negativo a la regresión” de un biomarcador significa un nivel del biomarcador que es indicativo de la regresión de la DNL. Un “nivel de referencia” de un biomarcador puede ser una cantidad o concentración absoluta o relativa del biomarcador, la presencia o ausencia del biomarcador, un intervalo de cantidad o concentración del biomarcador, una cantidad o concentración mínima y/o máxima del biomarcador, una cantidad o concentración promedio del biomarcador y/o la mediana de una cantidad o concentración del biomarcador; y, además, los “niveles de referencia” de combinaciones de biomarcadores también pueden ser proporciones de cantidades o concentraciones absolutas o relativas de dos o más biomarcadores con respecto a los demás. Los niveles de referencia positivos y negativos apropiados de biomarcadores para un estado de enfermedad o fenotipo concreto, o su ausencia, pueden determinarse midiendo los niveles de los biomarcadores deseados en uno o más sujetos apropiados, y estos niveles de referencia pueden adaptarse a poblaciones específicas de sujetos (por ejemplo, un nivel de referencia puede hacerse corresponder con la edad, de modo que puedan realizarse comparaciones entre los niveles de biomarcadores en muestras de sujetos de cierta edad y los niveles de referencia para un estado de enfermedad o fenotipo concreto, o su ausencia, en cierto grupo de edad; de modo similar, un nivel de referencia puede hacerse corresponder con el género o etnia/raza).

Un “marcador DNL-positivo” se refiere a un biomarcador de la lipogénesis *de novo*, cuyo nivel se correlaciona positivamente con la DNL (es decir, el nivel del biomarcador aumenta a medida que aumenta la DNL).

Un “marcador DNL-negativo” se refiere a un biomarcador de la lipogénesis *de novo*, cuyo nivel se correlaciona negativamente con la DNL (es decir, el nivel del biomarcador disminuye a medida que disminuye la DNL).

#### I. Biomarcadores

Los biomarcadores para su uso en los métodos descritos en la presente relacionados con la DNL incluyen los ácidos grasos 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones y subconjuntos. Los biomarcadores pueden medirse dentro de una clase de lípidos específica (por ejemplo, triacilglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), ésteres de colesterol (CE), diglicéridos (DG), ácidos grasos libres (FA), lisofosfatidilcolinas (LY), fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), esfingomielinas (SM), ésteres cerosos (WE), etc.) o como parte de un análisis de ácidos grasos totales (que incluye todas las clases de lípidos en el análisis). Los ácidos grasos pueden medirse en cualquier muestra biológica. Los ácidos grasos 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12 o complejos de lípidos intactos (por ejemplo, especies de triacilglicéridos o fosfolípidos) que contienen estos ácidos grasos son marcadores positivos de la DNL (es decir, un aumento en la DNL está asociado con niveles elevados de los biomarcadores), y los ácidos grasos 18:2n6, 20:4n6, 22:6n3, o complejos de lípidos intactos que contienen estos ácidos grasos o escualeno son marcadores negativos de la DNL (es decir, un aumento en la DNL está asociado con niveles reducidos de los biomarcadores). En una realización, los biomarcadores incluyen 16:0, 16:1n7, y 18:2n6, y sus combinaciones.

Además, los métodos descritos en la presente que emplean los biomarcadores 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3, y sus combinaciones, pueden usarse en combinación con mediciones de diagnóstico clínicas de las enfermedades relacionadas con la DNL. Las combinaciones con diagnósticos clínicos pueden facilitar los métodos descritos o confirmar los resultados de los métodos descritos (por ejemplo, facilitar o confirmar el diagnóstico, controlar el avance o la regresión y/o determinar la predisposición a enfermedades relacionadas con la DNL). Los métodos descritos en la presente que emplean los biomarcadores 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3, y sus combinaciones, pueden usarse en combinación con la información del paciente, tal como, por ejemplo, género, raza, edad, historia médica, historia médica familiar, factores de riesgo, etc.

Los métodos para medir los ácidos grasos descritos en la presente como componentes de una clase de lípidos complejos intactos (por ejemplo, especies de triacilglicéridos o fosfolípidos, tales como PC16:0|16:1n7) también se contemplan. La clase de lípidos puede ser, por ejemplo, los lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, diglicéridos, lisofosfatidilcolinas o ésteres cerosos. En algunas realizaciones, la clase de lípidos se selecciona del grupo que consiste en lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas realizaciones, la clase de lípidos se selecciona del grupo que consiste en lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos totales y ésteres de colesterol. En algunas realizaciones, la clase de lípidos se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas realizaciones, la clase de lípidos se

selecciona del grupo que consiste en triglicéridos, ácidos grasos libres, y ésteres cerosos. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los ácidos grasos totales. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los triglicéridos. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los ésteres de colesterol. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son las fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son las fosfatidiletanolaminas. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los fosfolípidos. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los lípidos neutros. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los diglicéridos. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son las esfingomielinas. En algunas realizaciones, la clase de lípidos son los ésteres cerosos. Los prefijos "TG", "FA", "PC", "PE", y "CE" se corresponden con ácidos grasos presentes dentro de los triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y ésteres de colesterol, respectivamente. Así, "TG14:0" indica el ácido graso 14:0 presente dentro de triglicéridos.

## II. Evaluación de la DNL

Los biomarcadores de DNL pueden usarse para evaluar (o ayudar a evaluar) la DNL en un sujeto. Se entenderá que los biomarcadores identificados pueden usarse para evaluar la DNL en cualquier sujeto y esto incluye la evaluación de la DNL en un sujeto sano (por ejemplo, como parte de una evaluación de la salud física rutinaria), en un sujeto asintomático, en un sujeto que se sospecha que padece o que está en riesgo de padecer una enfermedad relacionada con la DNL, o en un sujeto en respuesta a una composición o a una intervención terapéutica. También se entenderá que un sujeto puede someterse a una o más evaluaciones de la DNL.

En un ejemplo de método, la evaluación de la DNL en un sujeto comprende (1) analizar una muestra biológica obtenida de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la DNL en la muestra, y (2) comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con uno o más niveles de referencia de dichos uno o más biomarcadores para determinar el nivel de la DNL en el sujeto. Dichos uno o más biomarcadores pueden seleccionarse del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3, y sus combinaciones. Por ejemplo, el nivel o niveles de un biomarcador, dos o más biomarcadores, tres o más biomarcadores, cuatro o más biomarcadores, cinco o más biomarcadores, seis o más biomarcadores, etc., incluyendo una combinación de todos los biomarcadores listados, puede usarse para evaluar la DNL. La determinación de los niveles de combinaciones de los biomarcadores puede permitir lograr una mayor sensibilidad y especificidad en los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, un análisis apareado de dos biomarcadores o de proporciones de los niveles de ciertos biomarcadores (y compuestos que no son biomarcadores) en muestras biológicas puede lograr una mayor sensibilidad y especificidad en la evaluación de la DNL.

Además, la presente descripción proporciona métodos para evaluar la DNL en la piel y su relación con la función de la piel (por ejemplo, para evaluar la producción de sebo, el riesgo de acné, etc.). En un ejemplo de método, la evaluación de la DNL en un sujeto comprende analizar una muestra de piel o epidérmica o de células de la piel procedente de dicho sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores de DNL en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones; y comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para evaluar la lipogénesis en la piel. Por ejemplo, el nivel o niveles de un biomarcador, dos o más biomarcadores, tres o más biomarcadores, cuatro o más biomarcadores, cinco o más biomarcadores, seis o más biomarcadores, etc., incluyendo una combinación de todos los biomarcadores listados, puede usarse para evaluar la DNL. En una realización, dichos uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, y escualeno. En otra realización, dichos uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, y escualeno se emplean en combinaciones con uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3, y sus combinaciones. En otra realización, dichos uno o más biomarcadores comprenden 16:0, 16:1n7, y 18:2n6. En otra realización, dichos uno o más biomarcadores comprenden 16:0, 16:1n10, y escualeno. En otra realización, dichos uno o más biomarcadores comprenden 16:0, 16:1n7, 18:2n6, 14:0, y 14:1n5. En otra realización, dichos uno o más biomarcadores comprenden 16:0, 16:1n7, 18:2n6, 14:0, 14:1n5, 20:4n6, y 22:6n3. La determinación de los niveles de combinaciones de los biomarcadores puede permitir lograr una mayor sensibilidad y especificidad en los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, un análisis apareado de dos biomarcadores o de proporciones de los niveles de ciertos biomarcadores (y compuestos que no son biomarcadores) en muestras biológicas puede lograr una mayor sensibilidad y especificidad en la evaluación de la DNL.

Puede utilizarse cualquier método para analizar la muestra biológica para determinar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra. Los métodos adecuados incluyen cromatografía (por ejemplo, HPLC, cromatografía de gases, cromatografía de gases capilar, cromatografía líquida), espectrometría de masas (por ejemplo, MS, MS-MS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), unión de anticuerpos, otras técnicas inmunoquímicas, y sus combinaciones.

El nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores puede compararse con niveles de referencia de DNL empleando diversas técnicas, que incluyen una comparación sencilla (por ejemplo, una comparación manual). El

nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra biológica también puede compararse con niveles de referencia empleando uno o más análisis estadísticos (por ejemplo, ensayo de la t, ensayo de T de Welch, ensayo de suma de rangos de Wilcoxon, análisis de correlación, bosque aleatorio, puntuación T, puntuación Z) o usando un modelo matemático (por ejemplo, un modelo estadístico). Por ejemplo, puede emplearse un modelo matemático que comprende la medición de un único analito de biomarcador o la medición de múltiples analitos de biomarcadores para evaluar la DNL en un sujeto. Cuando se analizan los efectos que producen dos o más biomarcadores de DNL, se pueden evaluar los efectos de estos biomarcadores individualmente u obtener el efecto neto de estos biomarcadores, por ejemplo, usando diversas fórmulas matemáticas o modelos para cuantificar el efecto de cada biomarcador. Una fórmula que contiene los niveles de uno o más biomarcadores de DNL como variables incluye cualquier fórmula matemática, modelo, ecuación o expresión establecido basándose en principios matemáticos o estadísticos o métodos que emplean los valores de uno o más biomarcadores como variables.

Los resultados del método pueden emplearse junto con otros métodos (o sus resultados) útiles para evaluar la DNL en un sujeto. Por ejemplo, las mediciones de fDNL, sensibilidad a la insulina y/o respuesta aguda a la insulina ("acute insulin response", AIR), así como la información del paciente, tal como, por ejemplo, la edad, BMI, género, raza u otros factores de riesgo, pueden usarse con los biomarcadores.

Los biomarcadores proporcionados en la presente pueden utilizarse en una fórmula o modelo matemático o estadístico ("índice de DNL") para generar una puntuación numérica ("puntuación del índice de DNL") que es un indicador de la DNL en el sujeto. La puntuación del índice de DNL coloca al sujeto en un intervalo de DNL de bajo a normal a alto. Los métodos para generar un índice de DNL pueden comprender obtener muestras biológicas procedentes de una o más cohortes de referencia (por ejemplo, individuos sanos, individuos con una enfermedad relacionada con la DNL), medir los niveles de uno o más biomarcadores de DNL en las muestras, y utilizar los niveles medidos en un modelo matemático formado por dichos niveles medidos de dichos uno o más biomarcadores. Por ejemplo, pueden usarse métodos, tales como el análisis de múltiples variables de la varianza, regresión de múltiples variables, regresión múltiple, para determinar las relaciones entre variables dependientes y variables independientes en el índice de DNL. El método puede emplear cualquier número de marcadores seleccionados de 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3, y sus combinaciones. Múltiples biomarcadores pueden correlacionarse con la DNL, mediante cualquier método, incluidos métodos estadísticos, tales como el análisis de regresión.

En algunas realizaciones, se establece una fórmula que contiene uno o más biomarcadores de DNL como variables empleando un análisis de regresión, por ejemplo, regresiones lineales múltiples. En una realización, los biomarcadores pueden usarse en un modelo estadístico para generar un índice de DNL. Por ejemplo, sin limitación, pueden usarse las siguientes ecuaciones en un índice de DNL para generar una puntuación del índice de DNL:

Puntuación de índice de DNL =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)$  (empleando datos de porcentaje de moles o normalizando para el total o TG)

Puntuación de índice de DNL =  $(a(16:0)+b(16:1n7))/c(18:2n6)$  (proporción normalizante)

Puntuación de índice de DNL =  $a(\text{marcador DNL-positivo})-b(\text{marcador DNL-negativo})$

Puntuación de índice de DNL =  $a(16:0)+b(16:1n10)-c(18:2n6)$

Puntuación de índice de DNL =  $a(16:0)+b(16:1n10)-c(\text{escualeno})$

Puntuación de índice de DNL =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)$

Puntuación de índice de DNL =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)$

Puntuación de índice de DNL =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)-f(20:4n6)-g(22:6n3)$

en las que a, b, c, d, e, f, g son coeficientes que actúan como factores escalantes que pueden calcularse a partir de niveles humanos convencionales de cada uno de los marcadores. Además, el resultado de la ecuación (puntuación del índice de DNL) puede escalarse (por ejemplo, de 1-10) para proporcionar una utilidad clínica óptima. Los metabolitos de biomarcadores pueden expresarse en términos cuantitativos o relativos (por ejemplo, porcentaje de moles, % moles); sin embargo, los coeficientes y la forma de la ecuación deben ajustarse a la forma de los datos proporcionados. Las fórmulas pueden usar uno o más biomarcadores de DNL como variables, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o más biomarcadores. Las constantes de estas fórmulas pueden establecerse utilizando un conjunto de datos obtenidos a partir de valores de DNL conocidos o a partir de cohortes con enfermedades asociadas a DNL. Los niveles de biomarcadores de DNL usados en estas fórmulas pueden ser los niveles en un momento concreto o los cambios en los niveles a lo largo de un periodo de tiempo.

En otro aspecto, el índice de DNL puede incorporar variables tales como, por ejemplo, el género y/o la raza. En otro aspecto, el índice de DNL puede incorporar mediciones de otros ácidos grasos o lípidos.

La puntuación del índice de DNL puede usarse para clasificar al sujeto según el nivel de DNL (por ejemplo, normal,

bajo, alto). Los ejemplos de usos no limitantes de la puntuación del índice de DNL incluyen: la evaluación de la DNL; la clasificación de la DNL; la predisposición a desarrollar enfermedades relacionadas con la DNL; el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la DNL; el control del avance/regresión de enfermedades relacionadas con la DNL; y el control de la eficacia de un tratamiento para enfermedades relacionadas con la DNL.

5 En otro aspecto, los biomarcadores de DNL o el índice de DNL pueden incluirse en un algoritmo médico para la gestión de pacientes, en el que el índice y la puntuación de DNL son una unidad métrica útil para ser integrada en la práctica clínica. El algoritmo médico puede usar el valor medido de uno o más analitos de biomarcadores de DNL o la puntuación del índice de DNL calculada para guiar el posterior ensayo, evaluación y tratamiento de un sujeto que se presenta en una clínica o ante un médico. Un ejemplo no limitante y sencillo de algoritmo se presenta en la figura 1. El sujeto (101) puede presentarse en la clínica con síntomas o puede ser asintomático (102). El sujeto puede presentar factores de riesgo, tal como una historia personal o una historia familiar de lipogénesis *de novo* aberrante o puede no presentar factores de riesgo (102). Si el sujeto no presenta factores de riesgo y es asintomático, entonces no se determinará el índice de DNL y el paciente se controlará una vez al año (103) a menos que se desarrollen síntomas o factores de riesgo. Si el sujeto es sintomático y/o presenta factores de riesgo (por ejemplo, una historia personal o familiar), entonces se analizará una muestra procedente del sujeto (104) para determinar la puntuación del índice de DNL de dicho sujeto (105). De modo similar, si el sujeto es asintomático y presenta factores de riesgo (por ejemplo, una historia personal o familiar de estos), entonces se analizará una muestra procedente del sujeto (104) para determinar la puntuación del índice de DNL de dicho sujeto (105). Si la puntuación del índice de DNL (105) no está por encima de un valor umbral o valor de referencia que indica la presencia de DNL o una predisposición a una enfermedad relacionada con la DNL, entonces el sujeto se controlará periódicamente (106). Si la puntuación del índice de DNL (105) está por encima de un valor umbral o valor de referencia que indica la presencia de DNL o una predisposición a una enfermedad relacionada con la DNL, entonces el sujeto se remitirá a más ensayos y evaluaciones (107) para determinar si dicho sujeto debe tratarse (por ejemplo, con fármacos y/o cambios en el estilo de vida). Si se determina, basándose en los ensayos y evaluaciones adicionales, que es necesario el tratamiento (108), entonces se prescribirá una intervención terapéutica (109) y después puede controlarse la respuesta de dicho paciente a la terapia (110). Dicho sujeto volverá periódicamente para la determinación de su estado de DNL mediante la medición de biomarcadores de la DNL (104) y el cálculo de una puntuación de DNL (105). La puntuación de DNL se comparará con la puntuación de DNL anterior para determinar si el tratamiento es eficaz. Si se determina que no es necesaria una intervención de tratamiento (108), dicho sujeto se controlará periódicamente (106).

### III. Control del avance/regresión de la enfermedad

El uso de biomarcadores de la DNL en un índice de DNL permite controlar el avance/regresión de enfermedades relacionadas con la DNL (por ejemplo, diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica ("non-alcoholic steatohepatitis", NASH), cáncer, y enfermedad cardiovascular, etc.) en un sujeto. Un método para controlar el avance/regresión de una enfermedad relacionada con la DNL, tal como diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, y trastornos de la piel en un sujeto comprende (1) analizar una primera muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para la DNL seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones en la primera muestra obtenida del sujeto en un primer momento, (2) analizar una segunda muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores, obteniéndose dicha segunda muestra del sujeto en un segundo momento, y (3) comparar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores en la segunda muestra con (a) el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la primera muestra y/o (b) con niveles de referencia de DNL para controlar el avance/regresión de la enfermedad relacionada con la DNL en el sujeto. Los resultados del método son indicativos del desarrollo de la enfermedad relacionada con la DNL (es decir, el avance o la regresión, si se han producido cambios) en el sujeto.

Después de obtenerse la primera muestra pueden obtenerse una o más muestras adicionales del sujeto en un momento posterior. En un aspecto, dichas una o más muestras adicionales se obtienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más días después de la primera muestra. En otro aspecto, dichas una o más muestras adicionales se obtienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más semanas después de la primera muestra o después del inicio del tratamiento con la composición. En otro aspecto, dichas una o más muestras adicionales pueden obtenerse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más meses después de la primera muestra o después del inicio del tratamiento con la composición.

En una realización, los resultados del método pueden basarse en la puntuación del índice de DNL que es indicativa del nivel de DNL en el sujeto y que puede controlarse a lo largo del tiempo. Comparando la puntuación del índice de DNL de una muestra recogida en un primer momento con la puntuación del índice de DNL de una muestra recogida en al menos un segundo momento puede determinarse el avance o la regresión de la enfermedad relacionada con DNL. Por ejemplo, dicho método para controlar el avance/regresión de la prediabetes y/o diabetes de tipo 2 en un sujeto comprende (1) analizar una primera muestra biológica procedente de un sujeto para determinar una puntuación del índice de DNL para la primera muestra obtenida del sujeto en un primer momento, (2) analizar una segunda muestra biológica procedente de un sujeto para determinar una segunda puntuación del índice de DNL, obteniéndose dicha segunda muestra del sujeto en un segundo momento, y (3) comparar la puntuación del índice de

DNL en la primera muestra con la puntuación del índice de DNL en la segunda muestra para controlar el avance/regresión de la prediabetes y/o la diabetes de tipo 2 en el sujeto.

5 El uso de los biomarcadores y del índice de DNL descritos en la presente para el control del avance puede guiar o ayudar a que el médico decida poner en marcha medidas preventivas, tales como restricciones dietéticas, ejercicio o un tratamiento con fármacos de estadio temprano.

#### IV. Determinación de la predisposición a una enfermedad

10 El uso de biomarcadores de la DNL en un índice de DNL, tal como se describe en la presente, también puede usarse para determinar si un sujeto que no muestra ningún síntoma de una enfermedad relacionada con la DNL, tal como diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH),  
 15 cáncer, enfermedad cardiovascular y trastornos de la piel, está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL. Estos métodos para determinar si un sujeto que no tiene síntomas de una enfermedad relacionada con la DNL, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, y trastornos de la piel, está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL comprenden (1) analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones en la muestra, y (2) comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para determinar si el sujeto está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL. Los biomarcadores también pueden usarse en un modelo matemático o estadístico o una fórmula (índice de DNL) para determinar la predisposición a una enfermedad relacionada con la DNL. Los resultados del método pueden emplearse junto con otros métodos (o sus resultados) útiles en la determinación clínica para saber si un sujeto está predispuesto a desarrollar la enfermedad.

25 Después de determinar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra, el nivel o niveles se comparan con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos para predecir si el sujeto está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL, tal como diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, o trastornos de la piel. Los niveles de uno o más biomarcadores en una muestra que se corresponden con niveles de referencia DNL-positivos (por ejemplo, niveles que son los mismos que los niveles de referencia, sustancialmente los mismos que los niveles de referencia, por encima y/o por debajo del mínimo y/o máximo de los niveles de referencia y/o dentro del intervalo de los niveles de referencia) son indicativos de que el sujeto está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL. Los niveles de uno o más biomarcadores en una muestra que se corresponden con niveles de referencia DNL-negativos (por ejemplo, niveles que son los mismos que los niveles de referencia, sustancialmente los mismos que los niveles de referencia, por encima y/o por debajo del mínimo y/o máximo de los niveles de referencia y/o dentro del intervalo de los niveles de referencia) son indicativos de que el sujeto no está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL. Además, los niveles de uno o más biomarcadores que están diferencialmente presentes (en especial a un nivel que sea estadísticamente significativo) en la muestra, comparados con unos niveles de referencia DNL-negativos, pueden ser indicativos de que el sujeto está predispuesto a desarrollar la enfermedad relacionada con la DNL. Los niveles de uno o más biomarcadores que están diferencialmente presentes (en especial a un nivel que sea estadísticamente significativo) en la muestra, comparados con unos niveles de referencia DNL-positivos, son indicativos de que el sujeto no está predispuesto a desarrollar la enfermedad relacionada con la DNL.

45 En otra realización, los biomarcadores pueden utilizarse en un modelo matemático o estadístico o una fórmula (índice de DNL) para determinar la predisposición a una enfermedad relacionada con la DNL, comprendiendo dicho método (1) analizar una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores en la muestra, en el que dichos uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones en la muestra, (2) emplear un modelo matemático que comprende los niveles medidos de dichos uno o más biomarcadores para generar un índice de DNL, (3) calcular una puntuación del índice de DNL a partir de dicho índice de DNL, y (4) comparar la puntuación del índice de DNL de la muestra con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores para determinar si el sujeto está predispuesto a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL.

55 Además, también es posible determinar unos niveles de referencia específicos para evaluar si un sujeto que no padece una enfermedad relacionada con la DNL, tal como diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular o trastornos de la piel, está predispuesto o no a desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL. Por ejemplo, es posible determinar unos niveles de referencia de los biomarcadores para evaluar diferentes grados de riesgo (por ejemplo, bajo, intermedio, alto) en un sujeto para desarrollar una enfermedad relacionada con la DNL. Dichos niveles de referencia pueden usarse para la comparación con los niveles de dichos uno o más biomarcadores en una muestra biológica procedente de un sujeto.

#### 60 V. Control de la eficacia terapéutica

Los biomarcadores proporcionados también permiten la evaluación de la eficacia del tratamiento de una enfermedad relacionada con la DNL, tal como diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular o trastornos de la piel. Estas evaluaciones pueden usarse, por ejemplo, en estudios de eficacia, para controlar los efectos de modificaciones en el estilo de vida, así como para dirigir la selección de composiciones para tratar la enfermedad relacionada con la DNL. Por ejemplo, el uso de biomarcadores de DNL en un índice de DNL para la diabetes también permite evaluar la eficacia de un tratamiento para la diabetes, así como evaluar la eficacia relativa de dos tratamientos para la diabetes. Los tratamientos que pueden controlarse para la eficacia terapéutica pueden incluir la dieta, modificaciones en el estilo de vida, tratamiento con una composición u otras terapias usadas para tratar trastornos relacionados con la DNL.

Así, también se describen métodos para evaluar la eficacia de un tratamiento de una enfermedad relacionada con la DNL, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, o trastornos de la piel, que comprenden (1) analizar, procedente de un sujeto (o un grupo de sujetos) que padece una enfermedad relacionada con la DNL, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, o trastornos de la piel, y que en la actualidad o previamente se ha sometido a tratamiento para dicha enfermedad, una muestra biológica (o un grupo de muestras) para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para el trastorno seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones, y (2) comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con (a) el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en una muestra biológica previamente tomada del sujeto, en la que la muestra biológica previamente tomada se obtuvo del sujeto antes de comenzar el tratamiento, (b) unos niveles de referencia DNL-positivos de dichos uno o más biomarcadores, (c) unos niveles de referencia DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores, (d) unos niveles de referencia DNL-positivos al avance de dichos uno o más biomarcadores y/o (e) unos niveles de referencia DNL-positivos a la regresión de dichos uno o más biomarcadores. Los resultados de la comparación son indicativos de la eficacia del tratamiento para la enfermedad relacionada con la DNL.

La segunda muestra puede obtenerse del sujeto en cualquier momento después de haber obtenido la primera muestra. En un aspecto, la segunda muestra se obtiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más días después de la primera muestra o después del inicio de la terapia. En otro aspecto, la segunda muestra se obtiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más semanas después de la primera muestra o después del inicio de la terapia. En otro aspecto, la segunda muestra pueden obtenerse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más meses después de la primera muestra o después del inicio de la terapia.

El cambio (si se produce) en el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores a lo largo del tiempo puede ser indicativo del avance o la regresión de la enfermedad relacionada con la DNL en el sujeto. Para caracterizar el desarrollo de una enfermedad relacionada con la DNL concreta en el sujeto, el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la primera muestra, el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la segunda muestra y/o los resultados de la comparación de los niveles de los biomarcadores en la primera y segunda muestra pueden compararse con unos niveles de referencia DNL-positivos y/o DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores. Si las comparaciones indican que el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores aumentan o disminuyen a lo largo del tiempo (por ejemplo, en la segunda muestra comparada con la primera muestra) para hacerse más similares a los niveles de referencia DNL-positivos (o menos similares a los niveles de referencia DNL-negativos), entonces los resultados son indicativos del avance de la enfermedad relacionada con la DNL. Si las comparaciones indican que el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores aumentan o disminuyen a lo largo del tiempo para hacerse más similares a los niveles de referencia DNL-negativos (o menos similares a los niveles de referencia DNL-positivos), entonces los resultados son indicativos de la regresión de la enfermedad relacionada con la DNL.

En otra realización, los biomarcadores pueden usarse en un modelo matemático o estadístico o una fórmula (índice de DNL) para determinar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad relacionada con la DNL, comprendiendo dicho método (1) analizar, procedente de un sujeto (o un grupo de sujetos) que padece una enfermedad relacionada con la DNL, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular, o trastornos de la piel, y que en la actualidad o previamente se ha sometido a tratamiento para dicha enfermedad, una muestra biológica (o un grupo de muestras) para determinar el nivel o niveles de uno o más biomarcadores para el trastorno seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 y sus combinaciones, (2) emplear un modelo matemático que comprende los niveles medidos de dichos uno o más biomarcadores para generar un índice de DNL, (3) calcular una puntuación del índice de DNL a partir de dicho índice de DNL, y (4) comparar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en la muestra con (a) el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en una muestra biológica previamente tomada del sujeto, en la que la muestra biológica previamente tomada se obtuvo del sujeto antes de comenzar el tratamiento, (b) unos niveles de referencia DNL-positivos de dichos uno o más biomarcadores, (c) unos niveles de referencia DNL-negativos de dichos uno o más biomarcadores, (d) unos niveles de referencia DNL-positivos al avance de dichos uno o más biomarcadores y/o (e) unos niveles de referencia DNL-positivos a la regresión de dichos uno o más biomarcadores. Los resultados de la comparación son indicativos de la eficacia del tratamiento para la enfermedad relacionada con la DNL.

Al igual que con los otros métodos descritos en la presente, las comparaciones realizadas en los métodos para controlar la eficacia terapéutica de un tratamiento para una enfermedad relacionada con la DNL, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular o trastornos de la piel, en un sujeto pueden realizarse empleando diversas técnicas, que incluyen comparaciones simples, uno o más análisis estadísticos, y sus combinaciones.

Los resultados del método pueden emplearse junto con otros métodos (o sus resultados) descritos en la presente y/u otros métodos útiles en el control clínico del avance/regresión de la enfermedad o el trastorno en un sujeto.

Tal como se describió anteriormente en conexión con los métodos para diagnosticar (o para ayudar a diagnosticar) una enfermedad o un trastorno, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular o trastornos de la piel, puede usarse cualquier método adecuado para analizar las muestras biológicas para determinar el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores en las muestras. Además, el nivel o niveles de dichos uno o más biomarcadores, que incluyen una combinación de todos los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3, o cualquiera de sus fracciones, puede determinarse y usarse en métodos para controlar el avance/regresión de la enfermedad relacionada con la DNL en un sujeto.

Dichos métodos pueden realizarse para controlar el desarrollo de la enfermedad o trastorno en sujetos, por ejemplo, el desarrollo de la prediabetes hacia la diabetes de tipo 2 en un sujeto que padece prediabetes, o pueden emplearse en sujetos que no padecen una enfermedad o trastorno (por ejemplo, sujetos sospechosos de estar predispuestos a desarrollar la enfermedad o el trastorno) para controlar los niveles de predisposición a la enfermedad o el trastorno.

Los biomarcadores proporcionados también permiten la identificación de sujetos en los que el tratamiento de una enfermedad relacionada con la DNL, tal como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular o trastornos de la piel, resulta eficaz (es decir, los pacientes responden a la terapia). Estas evaluaciones pueden usarse, por ejemplo, en la selección de composiciones para tratar la enfermedad o el trastorno en ciertos sujetos.

VI. Métodos para emplear los biomarcadores para otras enfermedades o trastornos

En otro aspecto, al menos algunos de los biomarcadores descritos en la presente para la DNL también pueden ser biomarcadores para otras enfermedades o trastornos que en la actualidad no se conoce que estén asociados con la DNL. Es decir, los métodos descritos en la presente con respecto a la DNL también pueden usarse para el diagnóstico (o para ayudar al diagnóstico) de una enfermedad o trastorno sospechoso de estar relacionado con la DNL, en métodos para controlar el avance/regresión de dicha enfermedad o trastorno, y en métodos para evaluar la eficacia de composiciones para tratar dicha enfermedad o trastorno. Estos métodos pueden llevarse a cabo como se describe en la presente con respecto a la resistencia a la insulina.

## Ejemplos

I. Métodos generales

Brevemente, los lípidos procedentes de muestras de plasma o de muestras de sebo se extrajeron en presencia de patrones internos auténticos mediante el método de Folch *et al.* [Folch, J., M. Lees, y G. H. Sloane-Stanley, 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509] empleando cloroformo:metanol (2:1 en v/v). Las muestras de sebo se recogieron empleando Sebutape según se ha descrito [Pierard, G. E., Pierard-Franchimont, C. y Kligman, A. M., Kinetics of sebum excretion evaluated by the Sebutape—Chromameter technique, *Skin Pharmacology, revista oficial de the Skin Pharmacology Society*, 6, 38-44 (1993)]. El extracto de lípidos totales se transesterificó en ácido sulfúrico al 1% en metanol en un vial sellado bajo una atmósfera de nitrógeno a 100 °C durante 45 min. El extracto resultante se neutralizó con carbonato de potasio al 6%, y los ésteres metílicos de ácidos grasos ("fatty acid methyl esters", FAME) se extrajeron con hexano y se prepararon para una cromatografía de gases. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se separaron y se cuantificaron mediante una cromatografía de gases capilar (Agilent Technologies, modelo 6890) equipada con una columna capilar 30 m DB-88MS (Agilent Technologies) y un detector de ionización de llama. Se obtuvieron resultados cuantitativos comparando cada ácido graso con su control de patrón interno. Todos los ensayos presentados en la presente han pasado por protocolos de control de calidad internos.

En estos ejemplos se emplearon los datos de porcentaje de moles (% moles) para todos los análisis. Los datos de % moles son simplemente datos de la composición de ácidos grasos, y cada ácido graso se expresa como un porcentaje del conjunto total. La conversión de concentraciones de ácidos grasos cuantitativas en concentraciones de % moles normaliza el efecto de los cambios en los niveles de lípidos en plasma totales (por ejemplo, mayor o menor contenido en triacilglicéridos). Como alternativa, estos ácidos grasos pueden medirse como componentes de lípidos complejos intactos (por ejemplo, especies de triacilglicéridos o fosfolípidos, tales como PC16:0|16:1n7).

Ejemplo 1: Índice de lipogénesis *de novo* (DNL)

Varios ácidos grasos se ven afectados por la lipogénesis *de novo*, algunos de modo positivo (concretamente, son sintetizados *de novo*), y algunos de modo negativo (concretamente, son diluidos por la lipogénesis *de novo* o son inhibidores del proceso). Por ejemplo, los ácidos grasos palmitato y palmitoleato (16:0 y 16:1n7) son productos de la DNL humana (Aarsland A., Wolfe R. R., Hepatic secretion of VLDL fatty acids during stimulated lipogenesis in men, *J. Lipid Res.*, 1998, 39:1280-1286; Wu J. H., Lemaitre R. N., Imamura F., King I. B., Song X., Spiegelman D., Siscovick D. S., Mozaffarian D., Fatty acids in the *de novo* lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011, 94:431-438). El miristato y el miristoleato son los análogos de 14 carbonos de 16:0 y 16:1n7 y también son producidos a través de la lipogénesis *de novo* solo que en mucha menos abundancia. Sin embargo, el ácido linoleico (18:2n6) se deriva exclusivamente de la dieta (es el ácido graso poliinsaturado más abundante en el suministro alimentario). El ácido graso 18:2n6 se correlaciona en gran medida, pero de un modo negativo, con otros miembros del conjunto, lo cual sugiere que el agrupamiento representa el equilibrio de los ácidos grasos derivados de la DNL y derivados de la dieta en la circulación. Estudios previos han mostrado unos niveles disminuidos de 18:2n6 en lípidos originados de la DNL (Aarsland A., Wolfe R. R., Hepatic secretion of VLDL fatty acids during stimulated lipogenesis in men, *J. Lipid Res.*, 1998, 39:1280-1286).

Los ácidos grasos relacionados con la DNL incluyen: (A) marcadores positivos: 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, y (B) marcadores negativos: 18:2n6, 20:4n6, 22:6n3.

Los biomarcadores más constantes de la DNL son: 16:0, 16:1n7 y 18:2n6. Estos marcadores se seleccionaron como ejemplos de biomarcadores para medir los niveles en muestras y para el uso de dichos niveles medidos en un índice para medir la DNL. Los biomarcadores pueden medirse dentro de una clase específica de lípidos (por ejemplo, triacilglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), ésteres de colesterol (CE)) o como parte de un análisis de ácidos grasos totales (que incluye todas las clases de lípidos en el análisis). Los ácidos grasos pueden medirse en tejidos o fluidos, y son biomarcadores de la DNL particularmente útiles cuando se miden en suero o plasma. En este ejemplo, los valores medidos de estos biomarcadores se emplean en un modelo estadístico para generar un índice de DNL que es útil para informar al médico acerca del estado de DNL del paciente, para controlar la respuesta a una intervención terapéutica, para evaluar la predisposición a enfermedades, tales como la diabetes y trastornos relacionados, obesidad, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cáncer, enfermedad cardiovascular (hipertrigliceridemia) y trastornos de la piel.

Se generó un ejemplo de índice de DNL,  $DNL = a(16:0) + b(16:1n7) - c(18:2n6)$ , en el que los datos (es decir, los valores para los niveles medidos de los ejemplos de biomarcadores, 16:0, 16:1n7, 18:2n6) se escalan a % moles. El escalado y los coeficientes varían en la forma final de la ecuación para producir un peso casi equivalente para cada compuesto en la ecuación. Por ejemplo, si el biomarcador 16:0 está presente como 30% de los ácidos grasos, y el biomarcador 16:1n7 está presente como 1% de los ácidos grasos, el coeficiente para 16:1n7 debe ser aproximadamente 30 para igualar la contribución de cada componente de ácido graso de la ecuación.

Los biomarcadores se midieron usando una plataforma de análisis de ácidos grasos convencional (GC-FID o GC-MS). La plataforma produce datos sobre cada componente del índice de DNL en un solo ensayo. Como alternativa, puede usarse una plataforma de LC-MS para identificar las especies de lípidos que mejor reflejan la DNL y puede desarrollarse un ensayo de LC-MS específico de biomarcador/optimizado para un biomarcador.

Se derivaron los cálculos iniciales de los valores para escalar la ecuación. La concentración promedio (expresada en % moles) de cada biomarcador principal de ácido graso de la DNL en el suero humano (promedio +/- DE) es la siguiente:

16:0: 21,6+/-2,4

16:1n7: 2,1+/-1,1

18:2n6: 31,9+/-4,6

Los coeficientes escalantes pueden obtenerse de una manera tan simple como dividiendo cada componente de ácido graso entre su concentración promedio (o multiplicando por la inversa de su concentración). Así, un ejemplo de un índice de DNL (basado en las concentraciones promedio de los biomarcadores medidas e indicadas anteriormente) es: puntuación del índice de DNL =  $0,0463(\% \text{ moles de } 16:0) + 0,476(\% \text{ moles de } 16:1n7) - 0,0313(\% \text{ moles de } 18:2n6)$ . Los coeficientes escalantes pueden calcularse para cualquier ácido graso que incluye, por ejemplo, 16:1n10, 18:1n10, 18:1n12, escualeno, 16:0, 16:1n7, 14:0, 14:1n5, 18:2n6, 20:4n6, y 22:6n3 en cualquier tipo de muestra.

Los métodos descritos en este ejemplo pueden emplearse para generar un índice de DNL para cualquier tipo de muestra y usando cualquier combinación de biomarcadores de ácidos grasos de la DNL.

Para los ejemplos 2-3 se usó el siguiente índice de DNL: puntuación del índice de DNL =  $0,0463(\% \text{ moles de } 16:0) + 0,476(\% \text{ moles de } 16:1n7) - 0,0313(\% \text{ moles de } 18:2n6)$ .

Ejemplo 2: Efectos de la inhibición de la lipogénesis *de novo* sobre la puntuación del índice de DNL

Se realizaron dos experimentos con células tratadas con inhibidores químicos de la acetil:CoA carboxilasa (ACC). La ACC es una enzima que cataliza la reacción que produce malonil-CoA, que es el sustrato requerido para la lipogénesis *de novo*. Si se inhibe la ACC, no se produce malonil-CoA lo cual, a su vez, inhibe la lipogénesis *de novo*.

5 En el primer experimento, las células en cultivo se trataron con el inhibidor o solo con el vehículo durante 24 h o 48 h. Tras el tratamiento, las células se recolectaron y se midieron los biomarcadores. Los niveles de los biomarcadores se usaron en el índice de DNL para producir la puntuación del índice de DNL. La puntuación del índice de DNL fue significativamente menor en las células tratadas con el inhibidor que en las control tratadas solo con el vehículo, lo cual indica que la lipogénesis *de novo* disminuyó en las células tratadas con el inhibidor de ACC. Se calculó la puntuación del índice de DNL empleando dos fracciones de lípidos, la fracción de PL y la fracción de TG, y se obtuvieron resultados similares. Los datos se presentan gráficamente en la figura 2 (fracción de PL) y la figura 10 3 (fracción de TG).

En el segundo experimento, se trataron células de sebocitos en cultivo con una de tres dosis (baja, intermedia, alta) de un inhibidor de ACC o con un vehículo control por sí solo. Después del tratamiento, las células se recolectaron y se midieron los biomarcadores. Los niveles de los biomarcadores se usaron en el índice de DNL para producir la puntuación del índice de DNL. Las células tratadas con el inhibidor mostraron una reducción significativa y dependiente de la dosis en la puntuación del índice de DNL, comparada con la puntuación del índice de DNL obtenida con las células tratadas solo con vehículo. Los datos se presentan gráficamente en la figura 4.

Ejemplo 3: Aplicación del índice de DNL a sujetos con trastornos hepáticos

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una enfermedad que comienza con la acumulación de grasa (que se cree que en parte es grasa de la DNL) en el hígado y avanza hacia la inflamación y la fibrosis. Se recogió plasma sanguíneo de un total de 60 sujetos con una estadificación de la enfermedad confirmada mediante biopsia (19 sujetos con NASH, 2 sujetos con NAFLD, y 39 sujetos normales). Se midieron los biomarcadores 16:0, 16:1n7 y 18:2n6, y las mediciones se usaron en el índice de DNL para generar una puntuación del índice de DNL para cada sujeto. Existe un claro aumento en las puntuaciones del índice de DNL en pacientes con NASH y NAFLD con relación a sus controles normales. Los resultados se ilustran gráficamente en la figura 5.

Ejemplo 4: Desarrollo y aplicación del índice de DNL en sujetos resistentes a la insulina y diabéticos

En otro ejemplo, se generaron modelos del índice de DNL y se aplicaron a una cohorte formada por 749 sujetos, 102 de los cuales avanzaron hasta la diabetes dentro de 5 años. La cohorte estaba formada por 55% mujeres, 45% hombres; 42% blancos, 34% hispanos no blancos, 24% afroamericanos; edad promedio 55 años. Se obtuvieron mediciones de la sensibilidad a la insulina ( $S_i$ ) y de respuesta aguda a la insulina (AIR) de todos los participantes en la línea de base realizando un ensayo de tolerancia a la glucosa intravenoso con toma de muestras frecuente ("frequently sampled intravenous glucose tolerance test", FSIGTT) con un análisis del modelo mínimo. De los 102 participantes que desarrollaron diabetes, estos sujetos eran mayores y tenían un BMI y unos valores de la línea de base de glucosa en sangre en ayunas mayores, y la  $S_i$  y la AIR fueron significativamente diferentes de los individuos que no desarrollaron diabetes.

Se cuantificaron los ácidos grasos como se describió en el ejemplo 1 en el suero recolectado en la línea de base para los 749 sujetos. Las concentraciones de ácidos grasos difieren a través de los grupos de raza/étnicos; los datos se presentan en la tabla 1. Los biomarcadores de ácidos grasos usados como variables en el ejemplo de índice de DNL se indican en negrita.

Tabla 1 - Concentración promedio de biomarcadores de la DNL según la etnia

Marcador	Nombre común	Promedio y desviación estándar (% moles)			
		Todos	Afroamericanos	Hispanos	Caucásicos
<b>18:2n6</b>	<b>Ácido linoleico</b>	29,84 ± 4,26	30,36 ± 3,8 <sup>ΔΣ</sup>	29,35 ± 4,3 <sup>δ</sup>	29,94 ± 4,4 <sup>δ</sup>
<b>16:0</b>	<b>Ácido palmítico</b>	21,54 ± 2,04	21,02 ± 1,7 <sup>ΔΣ</sup>	21,88 ± 2,0 <sup>δ</sup>	21,59 ± 2,1 <sup>δ</sup>
14:0	Ácido mirístico	0,98 ± 0,38	0,82 ± 0,42 <sup>ΔΣ</sup>	1,04 ± 0,38 <sup>δ</sup>	1,03 ± 0,34 <sup>δ</sup>
14:1n5	Ácido miristoleico	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,05 <sup>ΔΣ</sup>	0,08 ± 0,04 <sup>δ</sup>	0,08 ± 0,04 <sup>δ</sup>
<b>16:1n7</b>	<b>Ácido palmitoleico</b>	2,08 ± 0,92	1,60 ± 0,67 <sup>ΔΣ</sup>	2,38 ± 0,89 <sup>δ</sup>	2,17 ± 0,94 <sup>δ</sup>

comparaciones apareadas (ensayos de la t) con corrección de Bonferroni a  $p < 5,4 \times 10^{-4}$ ;

<sup>δ</sup> significativamente diferente de los afroamericanos;

<sup>Δ</sup> significativamente diferente de los hispanos;

<sup>Σ</sup> significativamente diferente de los caucásicos,

Antes del análisis, los valores de % moles para los metabolitos se normalizaron a un promedio 0 y una varianza 1. La Si y la AIR también se transformaron como  $AIR = \text{sign}(AIR) \cdot \sqrt{|\text{abs}(AIR)|}$ ; y  $Si = \log_e(Si+1)$ . El índice de DNL se calculó como  $DNL = 0,0464 (16:0) + 0,489 (16:1n7) - 0,0335 (18:2n6)$ .

El ácido palmítico (16:0) y el ácido palmitoleico (16:1n7) estaban muy inversamente asociados con la sensibilidad a la insulina (coeficientes estandarizados  $\beta_0$  de -0,39 y -0,25,  $p < 0,001$ ) y resultaron predictores positivos significativos de la diabetes incidente (RR 1,64 y 1,77,  $p < 0,0001$ ); el ácido linoleico (18:2n6) estaba muy asociado positivamente con la sensibilidad a la insulina (coeficientes estandarizados  $\beta_0$  de 0,38,  $p < 0,001$ ) y resultó un predictor inverso significativo de la diabetes (RR 0,61,  $p < 0,001$ ). Los datos se presentan en la tabla 2. Los biomarcadores de ácidos grasos usados como variables en el ejemplo de índice de DNL se indican en negrita.

Tabla 2 - Asociaciones univariadas de biomarcadores de la DNL con la sensibilidad a la insulina y la diabetes

Marcador	Nombre completo	Coefficientes estandarizados $\beta_0$ para $S_i$ (valor de p)	RR para la diabetes por desviación estándar del metabolito (%95 de IC)	Valor de p para RR
<b>18:2n6</b>	<b>Ácido linoleico</b>	0,38 (<0,0001) <sup>δ</sup>	0,61 (0,52-0,79)	<0,0001 <sup>δ</sup>
14:0	Ácido mirístico	-0,23 (0,002)	1,34 (1,10-1,66)	0,004
<b>16:0</b>	<b>Ácido palmítico</b>	-0,39 (<0,0001) <sup>δ</sup>	1,64 (1,34-2,02)	<0,0001 <sup>δ</sup>
14:1n5	Ácido miristoleico	-0,11 (0,12)	1,31 (1,07-1,62)	0,009
<b>16:1n7</b>	<b>Ácido palmitoleico</b>	-0,25 (0,001) <sup>δ</sup>	1,77 (1,42-2,20)	<0,0001 <sup>δ</sup>

RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza;  $S_i$ , sensibilidad a la insulina

Las concentraciones se expresan como porcentaje de moles de los ácidos grasos totales medidos

<sup>δ</sup>  $p < 0,0014$  se considera significativo basándose en un ajuste de comparación múltiple mediante el método de Bonferroni

Se emplearon los biomarcadores de la DNL en el índice de DNL. La asociación del índice de DNL se evaluó mediante regresión logística. Se evaluaron dos modelos, uno para el índice de DNL no ajustado (puntuación del índice de DNL =  $0,0464 (16:0) + 0,489 (16:1n7) - 0,0335 (18:2n6)$ ), y uno para el índice de DNL ajustado para  $S_i$  y AIR. El índice de DNL no ajustado fue un predictor significativo de la diabetes incidente (tabla 3; OR: 1,5982, valor de  $P < 0,001$ ). El índice de DNL sigue siendo significativo después del ajuste para  $S_i$  y AIR, con una oportunidad relativa de 1,3987 (valor de  $p$ : 0,0054). Los datos indican que el índice de DNL es un predictor de la diabetes incidente que es independiente de la sensibilidad a la insulina ( $S_i$ ) y de la función de las células beta (AIR).

Tabla 3 - Asociación del índice de DNL con la diabetes incidente (oportunidad relativa por 1 desviación estándar)

	Oportunidad relativa (por 1SD)	Valor de P
Índice de DNL no ajustado	1,5982	<0,001
Ajustado para $S_i$ y AIR	1,3987	0,0054

El área bajo la curva (AUC) se evaluó para los modelos para la predicción de la diabetes. La ilustración gráfica de la curva característica de receptor-operador ("receiver-operator characteristic curve", ROC) se muestra en la figura 6. El AUC para el modelo 1, que incluye solo AIR y  $S_i$ , fue de 0,816. El AUC para el modelo 2, que es el índice de DNL ajustado para  $S_i$  y AIR, fue de 0,837. Así, la inclusión del índice de DNL en el modelo matemático proporciona una mayor discriminación del riesgo de diabetes que la base patogénica muy conocida de la diabetes (resistencia a la insulina, función de las células beta y obesidad), tal como se muestra por un aumento significativo en la ROC entre los modelos 1 y 2.

Por tanto, los marcadores de la lipogénesis *de novo* (18:2n6, 14:0, 16:0, 14:1n5, y 16:1n7) están asociados con la diabetes incidente, independientemente de la vía reconocida de la resistencia a la insulina y la respuesta alterada de las células beta. Los biomarcadores de ácidos grasos son correlatos transversales de  $S_i$  y predictores de la diabetes. Los resultados de aplicar el índice de DNL compuesto a partir de dichos biomarcadores a dichos sujetos demuestran que el índice de DNL a) se correlaciona con la resistencia a la insulina, y b) es predictivo de la diabetes futura de una manera que es independiente de la sensibilidad a la insulina y de la función de las células beta. El índice de DNL representa un nuevo atributo fisiológico de procesos diabéticos que debe medirse para evaluar el riesgo de desarrollar diabetes y para controlar los cambios que se producen en la diabetes.

Ejemplo 5: Desarrollo y aplicación del índice de DNL de sebo

En otro ejemplo se evaluaron los efectos de un inhibidor de la lipogénesis para inhibir la producción/secreción de sebo en la piel empleando modelos de índice de DNL de sebo. La cohorte estaba formada por 20 sujetos reclutados en un estudio clínico de un inhibidor de la lipogénesis como tratamiento para la reducción de la secreción de sebo. Diez sujetos recibieron un placebo y diez sujetos recibieron el tratamiento. Se calculó una puntuación del índice de DNL de sebo para las muestras recogidas en la línea de base y las muestras recogidas después del tratamiento. Se generaron y evaluaron dos modelos de índice de DNL de sebo:

Índice de DNL de sebo 1 (SDI1): puntuación de DNL =  $0,0398(16:0)+0,0455(16:1n10)-1,398(18:2n6)$

Índice de DNL de sebo 2 (SDI2): puntuación de DNL =  $0,0398(16:0)+0,0455(16:1n10)-0,0113(\text{escualeno})$ .

Se recogieron muestras de los participantes en la línea de base y después del tratamiento empleando Sebutage que se aplicó a la frente de los participantes durante 30 minutos, se retiró y se procesó mediante los mismos métodos que se describen en los métodos generales. Los valores medidos obtenidos para las variables de biomarcadores indicados en cada uno de los modelos del índice de DNL de sebo se emplearon después para calcular las puntuaciones del índice de DNL. Con ambos ejemplos de modelos del índice de DNL de sebo se observó una reducción significativa ( $p<0,01$ ) en la puntuación de DNL en el grupo tratado, pero no se observó cambio en la puntuación del índice de DNL del grupo con placebo ( $p = 0,66$  para SDI1,  $p = 0,93$  para SDI2), basándose en un ensayo de la t de Student apareado que compara la línea de base con momentos del tiempo después del tratamiento para cada grupo. Para el índice de DNL de sebo 1 se midió una disminución significativa en la puntuación con el tratamiento ( $p<0,01$ ), mientras que no se produjo ningún efecto con el placebo ( $p = 0,66$ ) en la puntuación de SDI1. En la figura 7 se ilustra una representación gráfica de los resultados. De modo similar, se midió una reducción significativa en la puntuación obtenida del índice de DNL de sebo 2 en respuesta al tratamiento ( $p<0,01$ ), mientras que la puntuación de SDI2 no cambió en el tratamiento con placebo ( $p = 0,93$ ). En la figura 7 se presenta una ilustración gráfica de los datos. Estos resultados obtenidos con SDI1 y SDI2 son coherentes con el efecto del tratamiento comparado con el placebo.

Ejemplo 6: Actuación de los índices de DNL en una población humana normal

En el análisis se emplearon muestras de plasma humano procedentes de 11 pacientes cuya contribución fraccionaria de la lipogénesis *de novo* (fDNL) a la composición de lípidos totales del plasma es conocida. La fDNL se determinó como se describe en M. K. Hellerstein, *De novo* lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects, *European journal of clinical nutrition*, 53, supl., 1, S53-65 (1999). Se tomaron muestras de plasma para el análisis de los ácidos grasos al mismo tiempo que se realizaba la evaluación de fDNL. En cada muestra se realizó un análisis de los ácidos grasos para determinar la concentración de 16:0, 16:1n7, 18:2n6, 14:0, 14:1n5, 18:1n9, 20:4n6 y 22:6n3.

Usando los métodos descritos en la presente, se calcularon tres versiones del índice de DNL a partir de los datos de composición de ácidos grasos:

Puntuación de índice de DNL 1 =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)$

Puntuación de índice de DNL 2 =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)$

Puntuación de índice de DNL 3 =  $a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)-f(20:4n6)-g(22:6n3)$

Los coeficientes usados en los índices de DNL son iguales a la inversa del promedio de concentración en % moles de cada ácido graso a través de las muestras de la cohorte de estudio:  $a = 0,043870068$ ,  $b = 0,576706455$ ,  $c = 0,030067766$ ,  $d = 0,887528921$ ,  $e = 16,64691481$ ,  $f = 0,178183345$ ,  $g = 0,670499855$ .

La puntuación del índice de DNL para cada uno de los 11 pacientes se calculó para los 3 ejemplos de índices de DN. En la tabla 4 se muestran las tres puntuaciones del índice de DNL y las concentraciones de los ácidos grasos 16:0, 16:1n7, 18:2n6, 14:0, 14:1n5, 20:4n6, y 22:6n3 para cada paciente.

Tabla 4 - Puntuaciones del índice de DNL y concentraciones de ácidos grasos para pacientes humanos

Paciente	Puntuación del índice de DNL			Concentración de ácidos grasos									
	1	2	3	16:0	16:1n7	18:2n6	14:0	14:1n5	20:4n6	22:6n3			
1	1,163284	3,862224	0,71306	3151,155	215,4047	3710,788	201,0215	10,31253	1293,801	265,3985			
2	1,277512	3,776299	2,143355	2827,337	283,1162	4273,203	171,9636	9,493363	536,2592	160,2696			
3	0,550546	2,011614	0,004254	2840,067	153,6234	4764,346	103,5225	5,629953	635,2783	211,4846			
4	0,484425	1,69259	-0,23944	2835,05	118,1739	4434,603	66,09926	5,343228	740,3281	155,3171			
5	1,170412	2,791465	0,500372	3250,218	251,4568	4396,24	128,1943	6,096235	876,1833	220,8993			
6	1,077354	2,289096	0,465728	3850,886	230,5824	4741,784	112,3875	4,77393	857,3678	174,3625			
7	1,045032	2,312099	-0,42727	3752,963	229,8355	4702,852	107,658	5,606802	1128,539	309,141			
8	1,369161	3,290882	0,952936	3541,402	312,1384	4488,297	166,9642	7,996686	1280,518	170,1218			
9	1,057554	2,814825	0,689578	3377,608	279,1935	5092,886	138,3527	8,200776	831,1023	246,8623			
10	0,735557	2,151951	0,176442	3393,518	209,4039	5387,642	101,9623	7,015458	812,05	215,3759			
11	1,575848	4,139605	2,096358	4165,409	424,7156	5359,345	179,1593	16,49612	790,9214	305,2253			

Se realizó un análisis con cada uno de los tres índices de DNL y la fDNL. Los tres índices de DNL se correlacionaron positiva y significativamente con fDNL. El índice de DNL 1 tiene un coeficiente de correlación de 0,62 (p = 0,04) con fDNL. El índice de DNL 2 tiene un coeficiente de correlación de 0,77 (p = 0,01) con fDNL. El índice de DNL 3 tiene un coeficiente de correlación de 0,62 (p = 0,04) con fDNL. La figura 8 muestra una ilustración gráfica de las gráficas de correlación para el índice de DNL 1, el índice de DNL 2 y el índice de DNL 3.

Ejemplo 7: Actuación de los índices de DNL en una población de pacientes con NASH sospechada

En otro ejemplo se evaluaron tres modelos de índice de DNL para determinar la asociación de cada índice con un diagnóstico de NASH frente a no NASH (clasificación binaria) y el estadio de la esteatosis. El diagnóstico de NASH y el grado de esteatosis se determinó mediante una biopsia de hígado y una histología para 213 sujetos sospechosos de padecer NASH. Se recolectaron muestras de suero en ayunas de los sujetos en el mismo día en que se realizaron las biopsias. Se realizó el perfil de la composición de ácidos grasos de las muestras de suero y se determinó la asociación de cada uno de los ejemplos de índices de DNL y cada uno de los ácidos grasos que forman los índices de DNL con la presencia de NASH (resultado dicotómico de presencia o ausencia) y con el grado de esteatosis (0, 1, 2, 3).

Se emplearon los tres índices de DNL:

$$\text{Puntuación de índice de DNL 1} = a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)$$

$$\text{Puntuación de índice de DNL 2} = a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)$$

$$\text{Puntuación de índice de DNL 3} = a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)-f(20:4n6)-g(22:6n3)$$

Los coeficientes usados en los índices de DNL son iguales a la inversa del promedio de concentración en % moles de cada ácido graso a través de las muestras de la cohorte de estudio: a = 0,043870068, b = 0,576706455, c = 0,030067766, d = 0,887528921, e = 16,64691481, f = 0,178183345, g = 0,670499855.

Tal como se describe en el ejemplo 6, se calculó la puntuación del índice de DNL para cada uno de los 213 pacientes. Cada uno de los tres índices de DNL y los componentes de ácido graso individuales de los índices de DNL se asoció con el diagnóstico de NASH empleando un análisis de regresión logística. Los datos se presentan en la tabla 5. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 9 que muestra diagramas de cajas de la distribución de los valores en NASH y no NASH para las puntuaciones de los índices de DNL 1, 2 y 3, respectivamente. Las puntuaciones de los índices de DNL 1, 2 y 3 estaban todas significativamente asociadas con el diagnóstico de NASH, con unos valores de p de 0,027, 0,002 y 0,004, respectivamente.

Tabla 5 - Análisis de regresión logística que asocia los índices de DNL con muestras de pacientes NASH o no NASH

	Promedio		DE		Logística
	No NASH	NASH	No NASH	NASH	Valor de P
<b>Índice de DNL 1</b>	0,830	1,054	0,582	0,639	0,027
<b>Índice de DNL 2</b>	2,450	3,153	1,128	1,458	0,002
<b>Índice de DNL 3</b>	0,400	1,154	1,255	1,693	0,004
<b>FA14:0</b>	0,879	1,143	0,276	0,448	<0,001
<b>FA14:1n5</b>	0,939	1,212	0,549	0,681	0,008
<b>FA16:0</b>	0,958	1,027	0,076	0,106	<0,001
<b>FA16:1n7</b>	1,028	1,122	0,445	0,478	0,215
<b>FA18:1n9</b>	1,007	1,016	0,137	0,144	0,700
<b>FA18:2n6</b>	1,042	0,973	0,170	0,173	0,015
<b>FA20:4n6</b>	1,064	1,008	0,286	0,272	0,217
<b>FA22:6n3</b>	1,142	1,148	0,502	0,546	0,949

Los pacientes se clasificaron según el grado de esteatosis (grados 0 y 1, grado 2, y grado 3) basándose en una biopsia hepática y un análisis histológico. Cada uno de los tres índices de DNL y los componentes de ácido graso

5 individuales de los índices de DNL se asoció con el grado de esteatosis empleando un análisis ANOVA. Los datos se presentan en la tabla 6. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 10 que muestra diagramas de cajas de la distribución de los valores en los grados 0 y 1, grado 2, y grado 3 de esteatosis para las puntuaciones de los índices de DNL 1, 2 y 3, respectivamente. Las puntuaciones de los índices de DNL 1, 2 y 3 estaban todas significativamente asociadas con el grado de esteatosis, con unos valores de p menores que 0,001 para todos los índices.

Tabla 6 - Asociación de los índices de DNL con el grado de esteatosis

	Promedio			DE			ANOVA
	G0y1	G2	G3	G0y1	G2	G3	Valor de P
<b>Índice de DNL 1</b>	0,749	1,184	1,098	0,568	0,601	0,728	<0,001
<b>Índice de DNL 2</b>	2,368	3,527	3,143	1,217	1,574	1,374	<0,001
<b>Índice de DNL 3</b>	0,276	1,571	1,217	1,410	1,811	1,628	<0,001
<b>FA14:0</b>	0,897	1,257	1,110	0,334	0,499	0,354	<0,001
<b>FA14:1n5</b>	0,918	1,373	1,185	0,585	0,809	0,549	<0,001
<b>FA16:0</b>	0,958	1,052	1,022	0,087	0,105	0,101	<0,001
<b>FA16:1n7</b>	0,951	1,194	1,180	0,423	0,483	0,554	0,003
<b>FA18:1n9</b>	0,995	1,049	1,007	0,142	0,161	0,128	0,057
<b>FA18:2n6</b>	1,053	0,934	0,977	0,164	0,163	0,179	<0,001
<b>FA20:4n6</b>	1,049	0,983	1,039	0,282	0,298	0,230	0,276
<b>FA22:6n3</b>	1,206	1,126	1,030	0,499	0,565	0,508	0,176

10 Aunque la invención se ha descrito en detalle y haciendo referencia a realizaciones concretas de la misma, para los expertos en la técnica será evidente que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para calcular la lipogénesis *de novo* en un sujeto, que comprende:
- 5 medir los niveles de tres o más biomarcadores en una muestra biológica, en el que los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en el nivel total de ácido mirístico (14:0), el nivel total de ácido miristoleico (14:1n5), el nivel total de palmitato (16:0), el nivel total de palmitoleato (16:1n7), el nivel total de ácido sapiénico (16:1n10), el nivel total de escualeno, el nivel total de linoleato (18:2n6), el nivel total de ácido araquidónico (20:4n6), el nivel total de ácido docosaheanoico (22:6n3), el nivel de ácido mirístico (14:0) en una o más clases de lípidos, el nivel de ácido miristoleico (14:1n5) en una o más clases de lípidos, el nivel de palmitato (16:0) en una o más clases de lípidos, el nivel de palmitoleato (16:1n7) en una o más clases de lípidos, el nivel de ácido sapiénico (16:1n10) en una o más clases de lípidos, el nivel de escualeno en una o más clases de lípidos, el nivel de linoleato (18:2n6) en una o más clases de lípidos, el nivel de ácido araquidónico (20:4n6) en una o más clases de lípidos, y el nivel de ácido docosaheanoico (22:6n3) en una o más clases de lípidos en una muestra recolectada de un sujeto; y
- 10 usar uno de los siguiente modelos para generar una puntuación de índice de lipogénesis *de novo* para calcular la lipogénesis *de novo* en el sujeto:
- 15 (i)  $DNL = a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)$
- (ii)  $DNL = (a(16:0)+b(16:1n7))/c(18:2n6)$
- (iii)  $DNL = a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)$
- (iv)  $DNL = a(16:0)+b(16:1n7)-c(18:2n6)+d(14:0)+e(14:1n5)-f(20:4n6)-g(22:6n3)$
- 20 (v)  $DNL = a(16:0)+b(16:1n10)-c(18:2n6)$ , o
- (vi)  $DNL = a(16:0)+b(16:1n10)-c(\text{escualeno})$
- en los que a, b, c, d, e, f, y g son números constantes; (16:0), (16:1n7), (18:2n6), (14:0), (14:1n5), (20:4n6), (22:6n3), (16:1n10), y escualeno son valores medidos del analito de biomarcador; y DNL es la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* predicha.
- 25 2.- El método de la reivindicación 1, en el que los biomarcadores comprenden los niveles totales de palmitato (16:0), palmitoleato (16:1n7) y linoleato (18:2n6) en sangre.
- 3.- El método de la reivindicación 2, en el que los biomarcadores comprenden además los niveles totales de ácido mirístico (14:0), y (14:1n5) en sangre.
- 30 4.- El método de la reivindicación 3, en el que los biomarcadores comprenden además los niveles totales de ácido araquidónico (20:4n6) y ácido docosaheanoico (22:6n3) en sangre.
- 5.- El método de la reivindicación 1, en la que muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sebo, una muestra de piel, una muestra epidérmica y una muestra de células de la piel.
- 6.- El método de la reivindicación 1, en el que los biomarcadores se miden en una o más clases individuales de lípidos seleccionadas del grupo que consiste en triacilglicéridos, fosfatidilcolina y ésteres de colesterol.
- 35 7.- El método de la reivindicación 1, en el que los biomarcadores se miden después de separar los ácidos grasos de su esqueleto.
- 8.- El método de la reivindicación 1, en el que los biomarcadores se miden como una especie de lípido compleja intacta.
- 9.- El método de la reivindicación 1, en el que los biomarcadores se miden en los lípidos en sangre totales.
- 40 10.- El método de la reivindicación 1, en el que la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* es la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* de sebo y se calcula usando el modelo (v) o (vi).
- 11.- El método de la reivindicación 1, en el que se emplea la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* para evaluar la salud hepática de un individuo que presenta una insuficiencia hepática en forma de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD), resistencia a la insulina o diabetes.
- 45 12.- El método de la reivindicación 1, en el que se emplea la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* para estadificar trastornos hepáticos, en el que el trastorno hepático se selecciona del grupo que consiste en esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD).
- 13.- El método de la reivindicación 1, en el que se emplea la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* para

controlar la respuesta a un agente terapéutico de la lipogénesis *de novo* y trastornos de enfermedad asociados.

14.- El método de la reivindicación 13, en el que el agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña.

15.- El método de la reivindicación 1, en el que se emplea la puntuación del índice de lipogénesis *de novo* para determinar la eficacia de un agente terapéutico para inhibir la lipogénesis *de novo*.

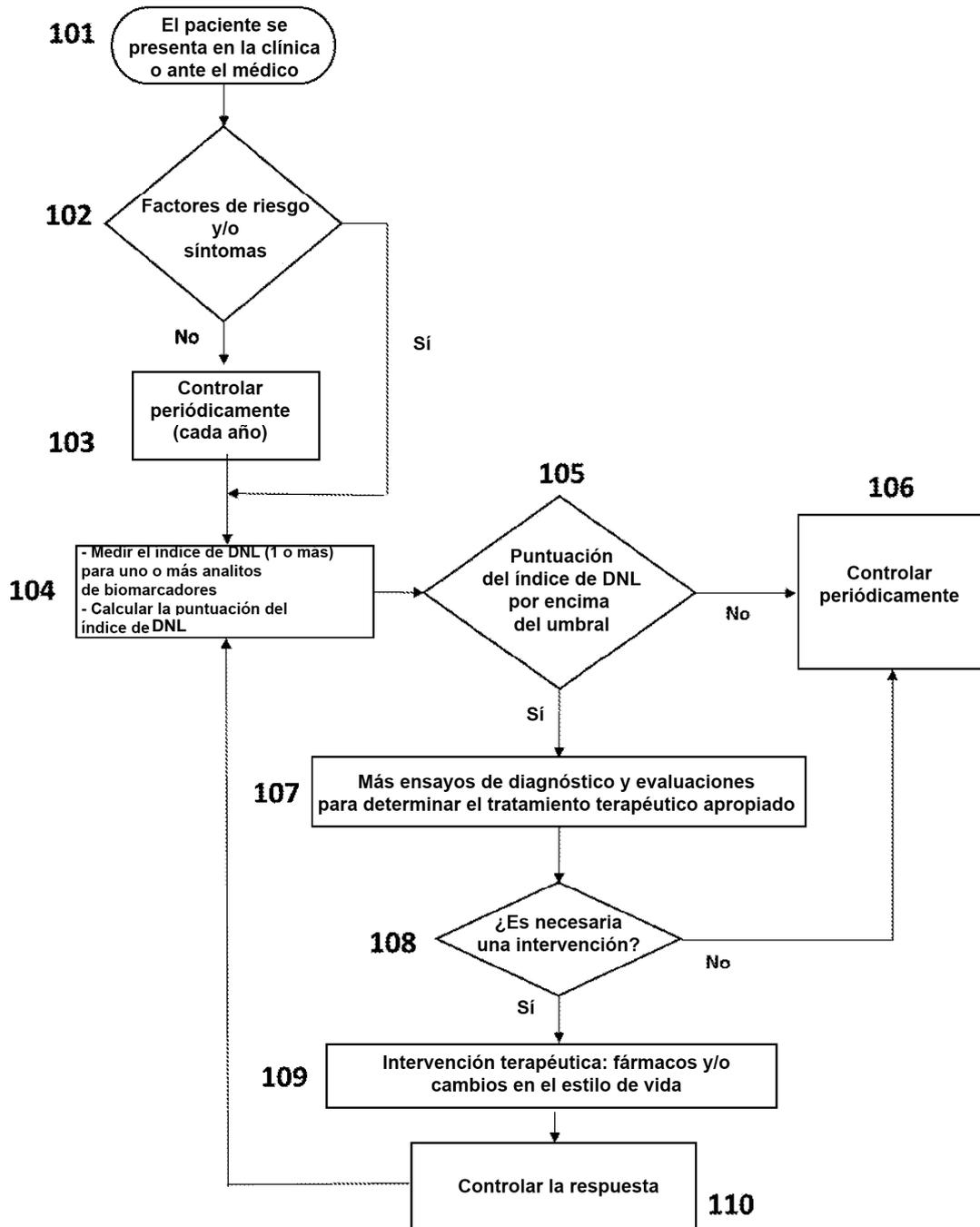


Figura 1

Efecto de la inhibición de ACC sobre la puntuación del índice de DNL en células

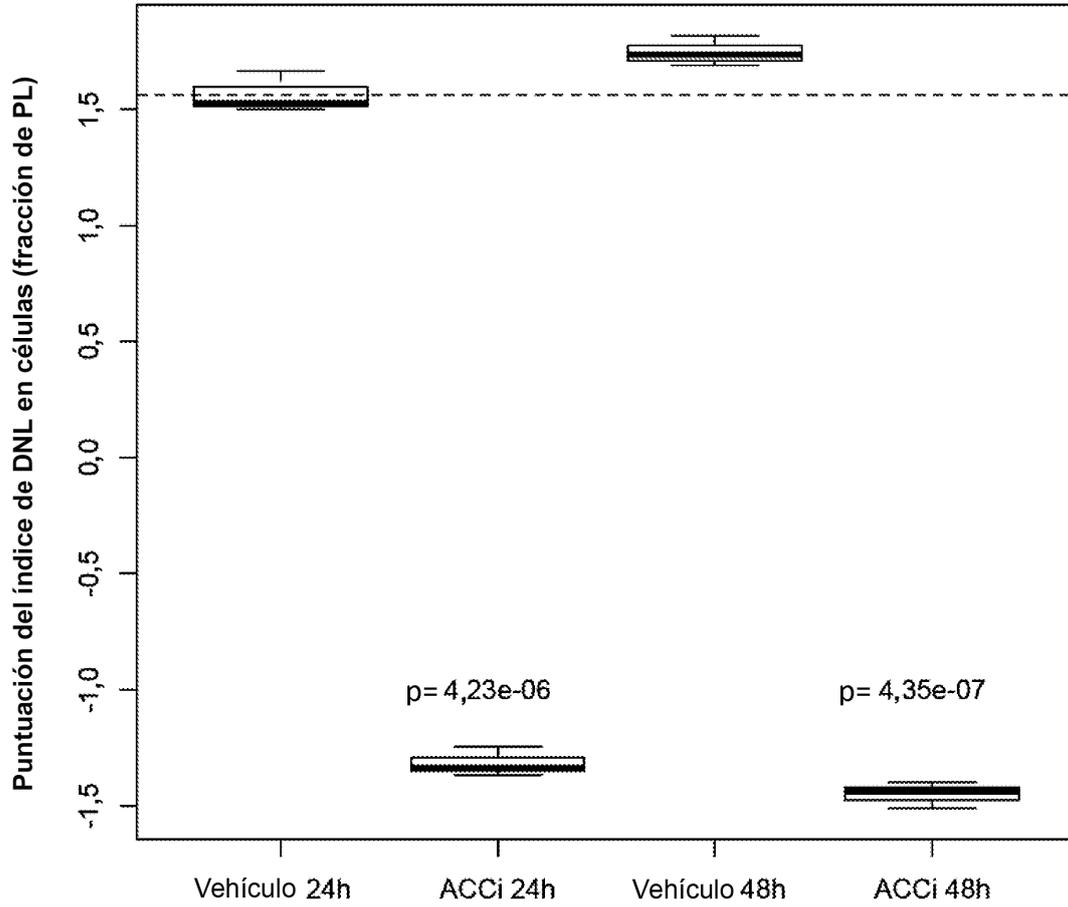


Figura 2

Efecto de la inhibición de ACC sobre la puntuación del índice de DNL en células

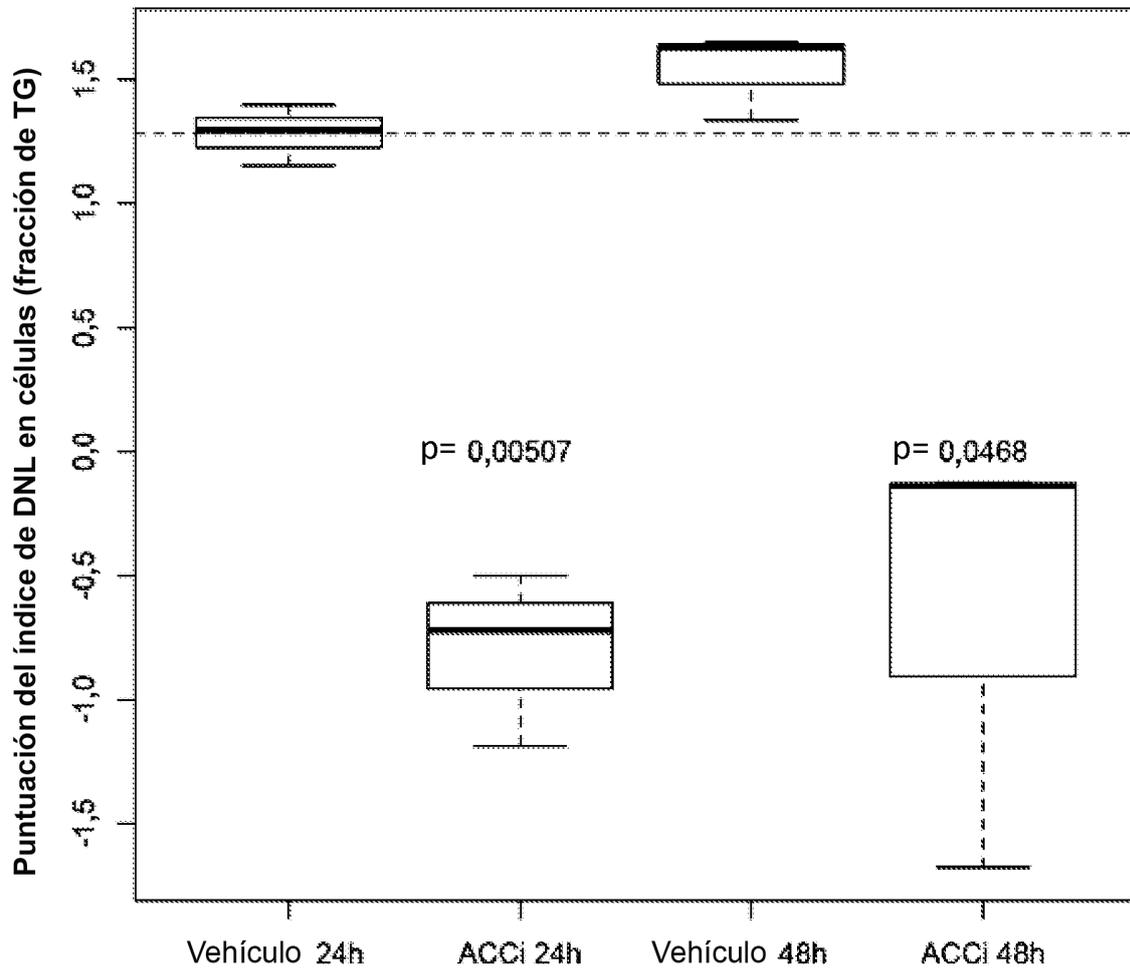
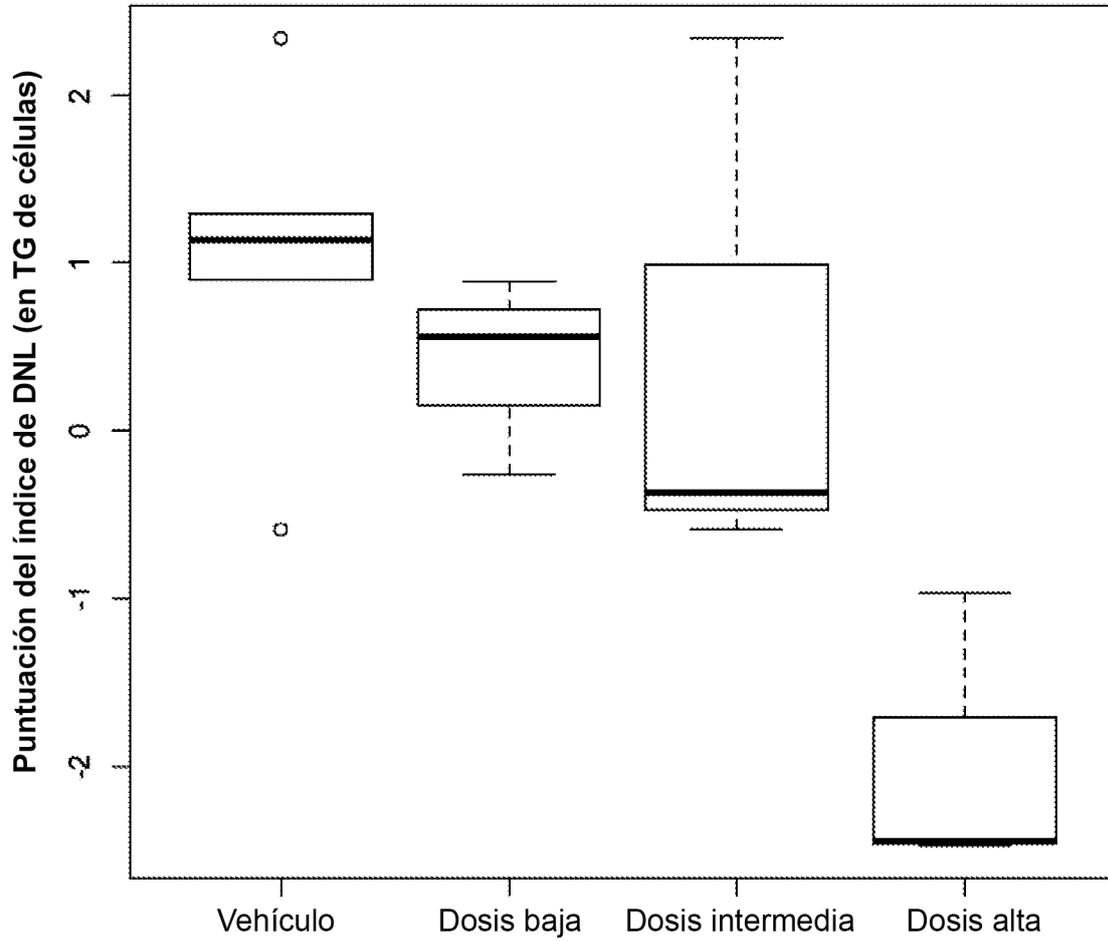


Figura 3

**Efecto de la dosificación del inhibidor de la ACC  
sobre la puntuación del índice de DNL**



**Figura 4**

Uso del índice de DNL en NASH y NAFLD humanos

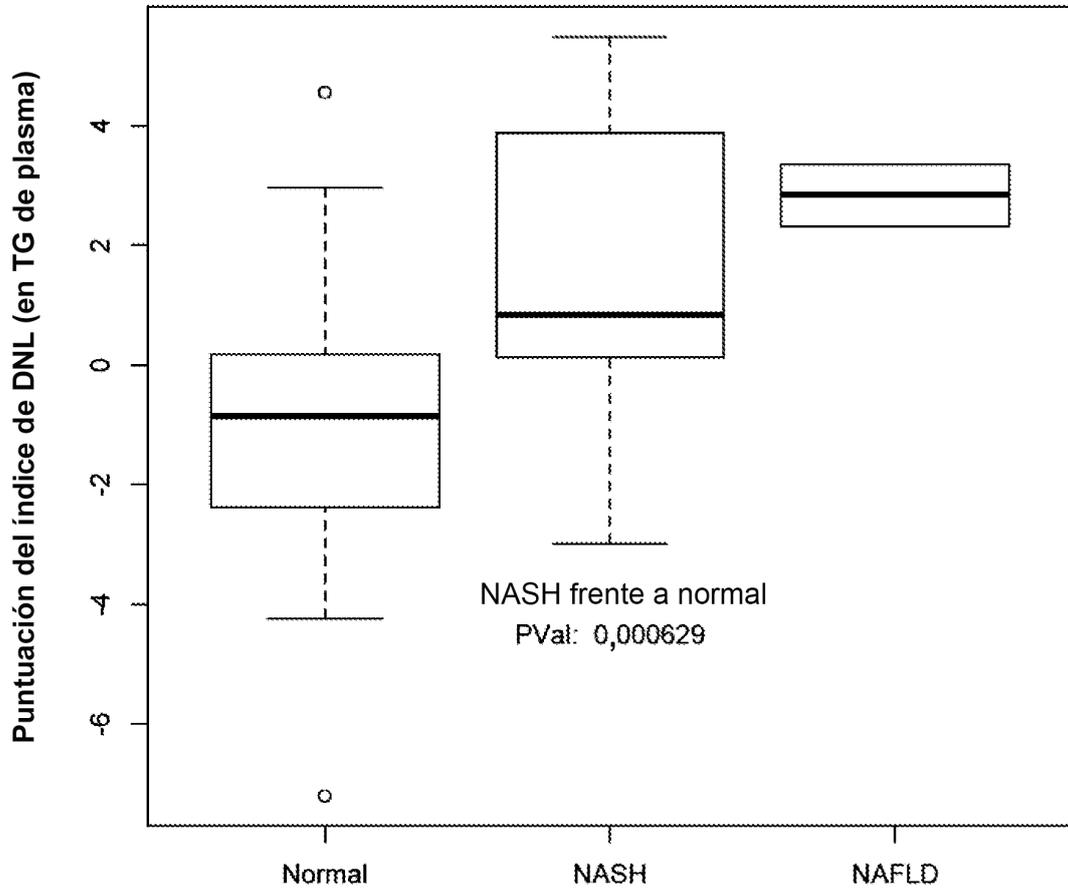


Figura 5

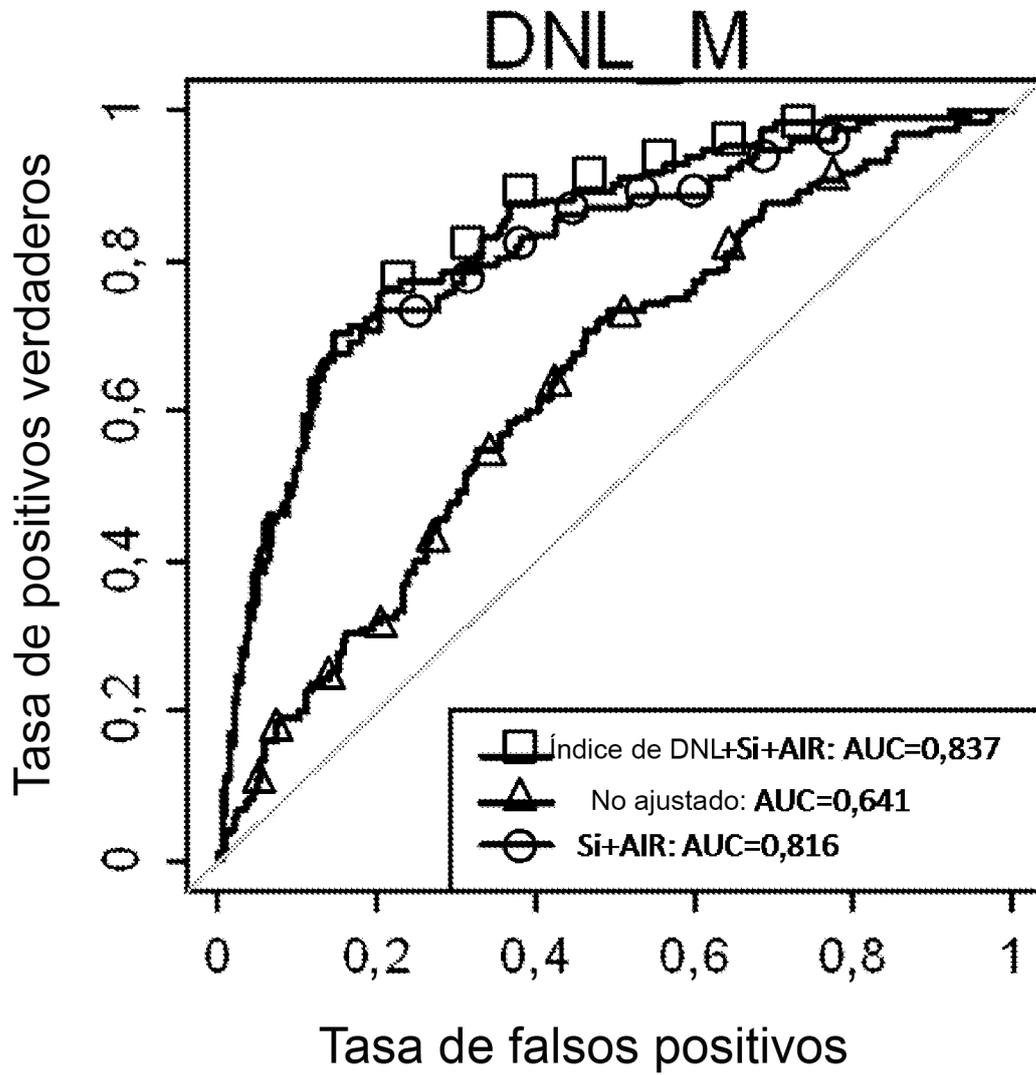
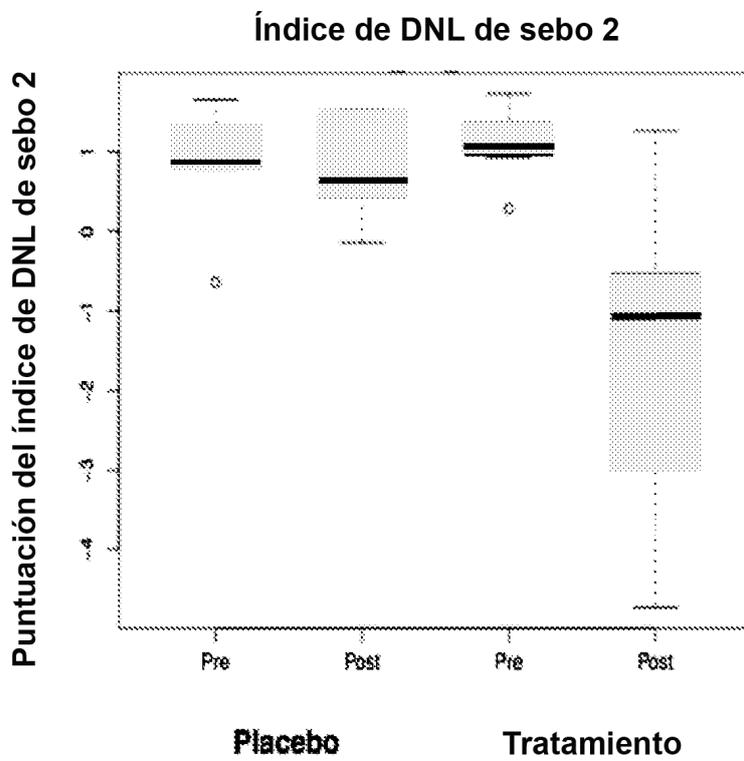
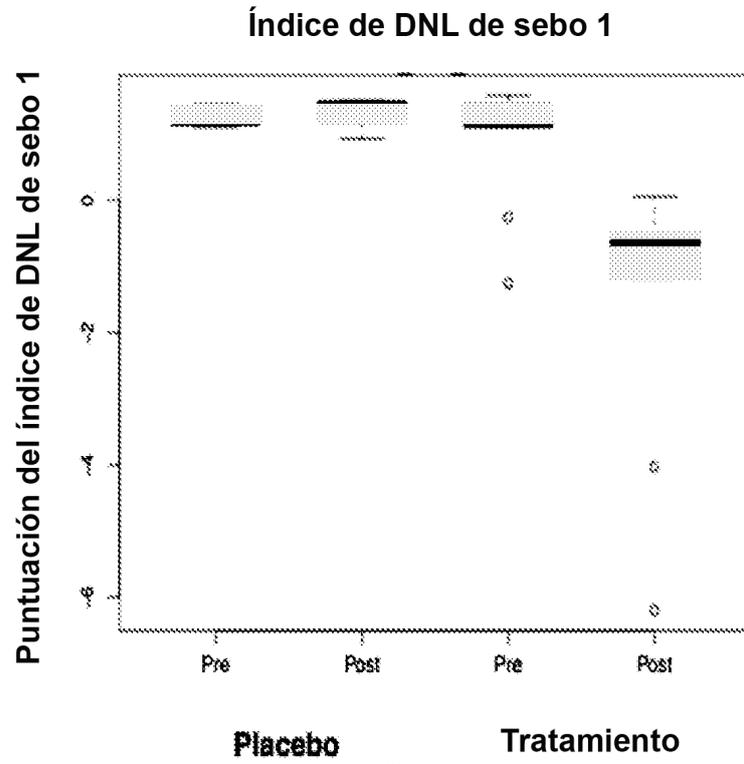
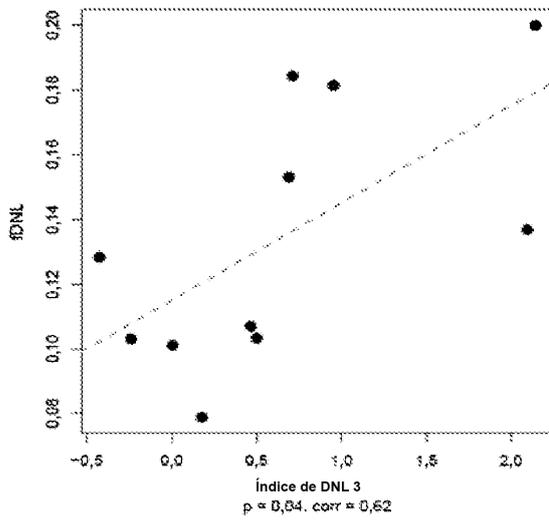
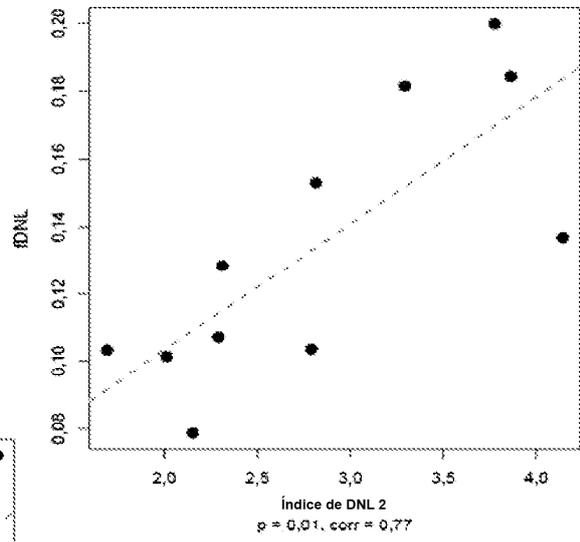
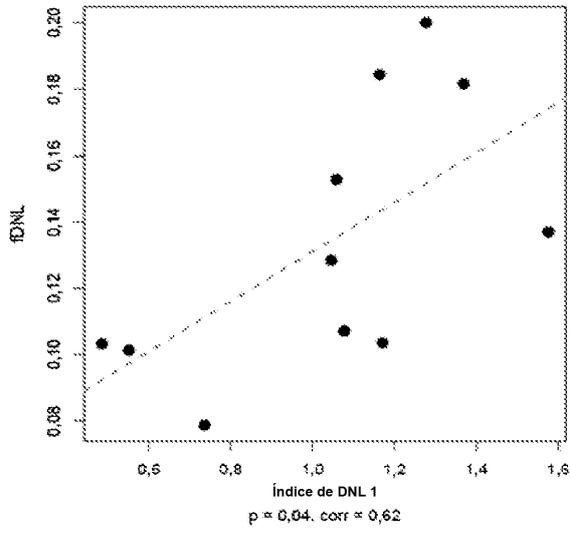


Figura 6



**Figura 7**



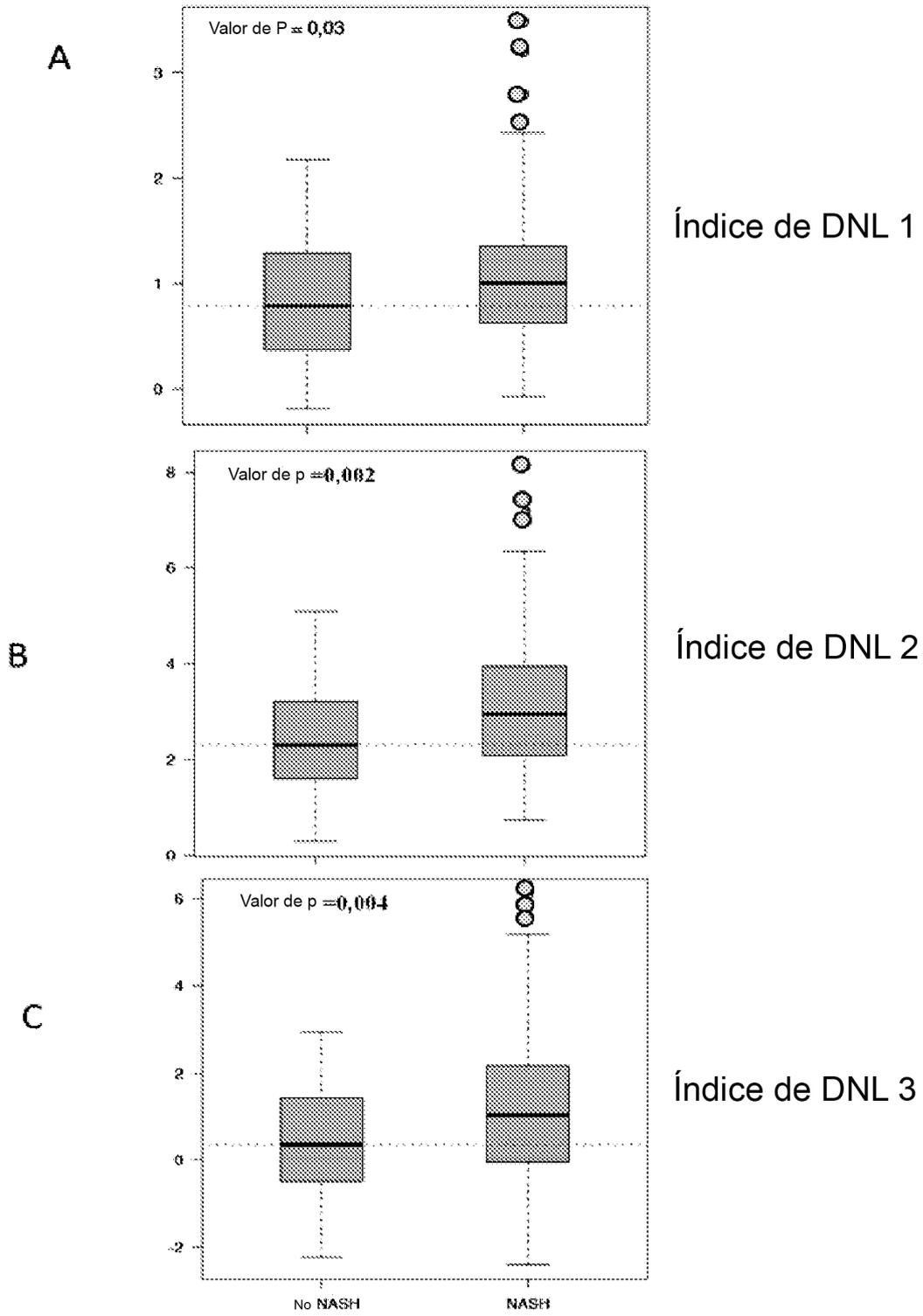
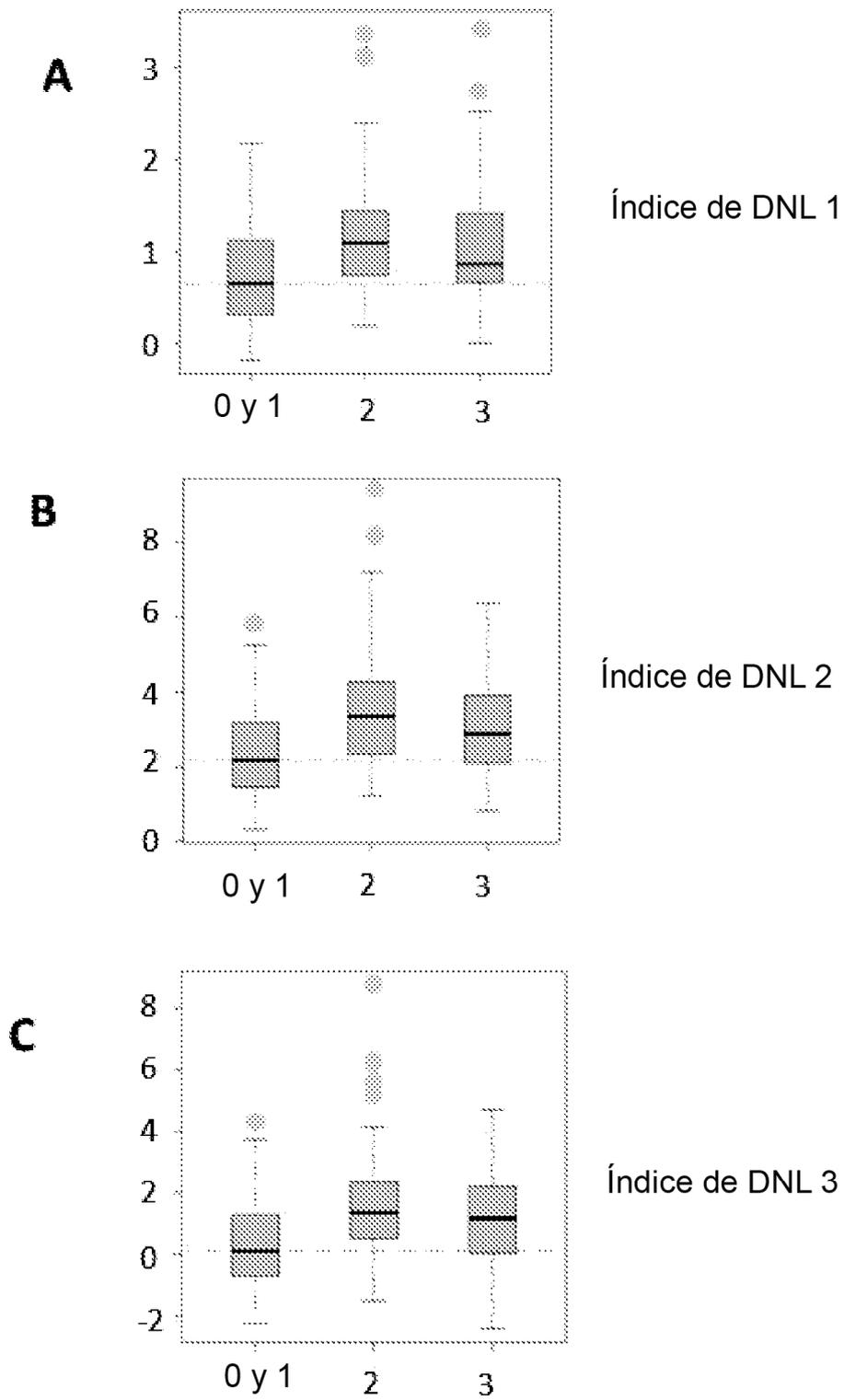


Figura 9



**Figura 10**