

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 246**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/497** (2006.01)

**A61B 5/08** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/JP2014/056699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14142248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14763271 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2975400**

54 Título: **Composición para su uso en un método para medir la razón de combustión azúcar/ácido graso**

30 Prioridad:

**15.03.2013 JP 2013053979**

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

**16.04.2020**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**INADA, MAKOTO;  
KUNIZAKI, JUN-ICHI;  
TOBITA, KAZUKI;  
MOTONARI, HIROSHI y  
SATO, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 754 246 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

Composición para su uso en un método para medir la razón de combustión azúcar/ácido graso.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba usando una prueba del aliento con C marcado y a una composición usada de manera adecuada para el método.

10

**Antecedentes de la técnica**

La tolerancia anómala a la glucosa designa generalmente un estado en el que la glucemia en ayunas está en un intervalo de 110 mg/dl a menos de 126 mg/dl, o un estado en el que el valor a las 2 horas en una prueba oral de tolerancia a la glucosa es de 140 mg/dl a 199 mg/dl, y también se denomina prediabetes. Aunque los pacientes con prediabetes tienen glucemias anómalas, no se considera exactamente que tengan diabetes; sin embargo, si los pacientes dejan el estado sin tratar, es muy probable que se vuelvan diabéticos. El estado se denomina por tanto prediabetes. Además, se sabe que la arteriosclerosis avanza en esta fase. Por tanto, también en cuanto a la medicina preventiva, es importante detectar a los pacientes en una fase prediabética.

15

20

En el diagnóstico de la diabetes, en primer lugar se realiza generalmente detección primaria se realiza generalmente con un análisis de glucosa en la orina o una prueba de glucemia en ayunas, y, si tales pruebas son positivas, se realiza una prueba de tolerancia a la glucosa para realizar un diagnóstico preciso. En los últimos años, también puede someterse a prueba la HbA1C o fructosamina en la sangre antes de una prueba de tolerancia a la glucosa usando glucosa.

25

Sin embargo, los efectos secundarios producidos por la administración de una gran cantidad de glucosa se han indicado con respecto a la prueba de tolerancia a la glucosa usando glucosa. Además, la prueba requiere sujetos de prueba que van a controlarse durante varias horas, y que se recoja sangre de manera repetida. Debido a esto, impone por tanto una gran carga física sobre los sujetos de prueba, la prueba sólo puede llevarse a cabo realmente en un número limitado de sujetos de prueba. Además, los resultados de la HbA1C o fructosamina no pueden conocerse hasta la siguiente consulta hospitalaria, lo que plantea por tanto el inconveniente de una rapidez insuficiente. Las pruebas realizadas antes de estas pruebas, tales como el análisis de glucosa en la orina o la prueba de glucemia en ayunas, tienen una baja sensibilidad problemática debido a que a menudo muestran resultados negativos de glucosa en la orina o resultados normales de glucemias a pesar de que los sujetos de prueba sean diabéticos; por tanto, se pierden muchos casos de pacientes diabéticos. Por consiguiente, estos métodos conocidos para diagnosticar diabetes son incapaces de determinar una fase prediabética en la que la diabetes aún no se ha desarrollado, tal como la prediabetes, o un estado incluso antes de la prediabetes (un estado que tiene resistencia a la insulina o hiperinsulinemia sin resistencia a la insulina).

30

35

40

En los últimos años, como un método de diagnóstico de la diabetes, se ha sugerido un método de administración por vía intravenosa de ácido acético, ácido oleico o ácido palmítico marcado con  $^{13}\text{C}$ , y la medición de la tasa de aumento de la concentración de  $^{13}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  en el aire espirado con una prueba del aliento, diagnosticando de ese modo la diabetes tipo hiposecreción de insulina (documento de patente 1). Sin embargo, se desconoce si este método es capaz de diagnosticar un estado incluso antes de la prediabetes (un estado que tiene resistencia a la insulina o hiperinsulinemia sin resistencia a la insulina).

45

Los ejemplos de enfermedades subyacentes que muestran resistencia a la insulina incluyen hepatopatías. En particular, los pacientes con cirrosis hepática tienen un estado patológico nutricional típico de malnutrición proteica y energética (PEM). Además, un porcentaje significativo de los pacientes con cirrosis hepática también tiene resistencia a la insulina concomitante. Por tanto, también se ha notificado una correlación entre la resistencia a la insulina concomitante y el cáncer de hígado. Sin embargo, no se ha establecido un método para diagnosticar la resistencia a la insulina concomitante en pacientes con cirrosis hepática. Para el diagnóstico del grado de PEM, se ha usado calorimetría indirecta para detectar la razón de combustión sacáridos/lípidos. La razón de combustión sacáridos/lípidos puede calcularse como un cociente respiratorio. Se ha notificado que el pronóstico de cirrosis hepática o cáncer de hígado empeora cuando el cociente respiratorio se disminuye a 0,85 o menos mediante una disminución en la combustión de sacáridos y/o un aumento en la combustión de grasas. Además, también se ha notificado que el cociente respiratorio disminuye significativamente con el aumento en la gravedad de la cirrosis hepática (documento no de patente 1). Más específicamente, midiendo la razón de combustión sacáridos/lípidos, es posible determinar el pronóstico o la gravedad de la cirrosis hepática, el cáncer de hígado, etc. Sin embargo, los métodos conocidos que usan el cálculo del cociente respiratorio tienen escasa viabilidad, y se considera imposible captar fácilmente la situación nutricional de manera objetiva.

50

55

60

Mientras tanto, se ha propuesto la aplicación de la denominada prueba del aliento con C marcado, que es un método de medición del  $^{13}\text{CO}_2$  excretado en el aire espirado como dióxido de carbono después de la administración de glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$ , para el diagnóstico de diabetes (documentos de patente 2 a 4). Más específicamente, el

65

documento de patente 2 divulga un método para diagnosticar la presencia o ausencia de diabetes, así como el tipo de diabetes (diabetes tipo I o diabetes tipo II) realizando una prueba del aliento usando glucosa en la que el carbono en una posición específica se sustituye por  $^{13}\text{C}$ , y determinando el grado de aumento en la concentración de  $^{13}\text{CO}_2$  excretado en el aire espirado. Además, los documentos de patente 3 y 4 divulgan la realización de una prueba del aliento que usa glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  como en el documento de patente 2 y el diagnóstico de un paciente diabético o un paciente resistente a la insulina basándose en un índice de tal manera que la razón de  $^{13}\text{C}$  con respecto a  $^{12}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en el aire espirado que es menor que la razón de un sujeto sano, calculándose la razón a partir de la concentración de  $^{13}\text{CO}_2$  excretado en el aire espirado.

Sin embargo, estos documentos no divulgan o sugieren en ninguna parte la combinación de una prueba del aliento con C marcado usando glucosa con una prueba del aliento con C marcado usando ácido graso, permitiendo de ese modo una detección muy precisa de una razón de combustión sacáridos/lípidos que puede reemplazar el cociente respiratorio.

## 15 **Lista de referencias**

### Documentos de patente

Documento de patente 1: JPH11-124343A (que corresponde a los documentos JP 4007653 B2 y US 6.599.002 B1)

Documento de patente 2: JPH10-67689A

Documento de patente 3: JP2002-513911A

Documento de patente 4: JP2008-292506A

### Documentos no de patente

Documento no de patente 1: "Eiyo: Hyoka to Chiryō" Japanese Journal of Nutritional Assessment, vol. 29, n.º 1, páginas 37-40

El documento US 2009/131810 se refiere a un método de evaluación de un estado hepático de un sujeto, el método incluye el cálculo de un parámetro de fluctuación a partir de una prueba del aliento hepático basándose en al menos una de una curva de porcentaje de recuperación de dosis (PDR) y una curva delta con respecto al nivel inicial (DOB) de metacetina marcada con un isótopo, o una sal o un derivado de la misma, y la evaluación de al menos un estado hepático del sujeto, basándose al menos en el parámetro de fluctuación.

El documento US 2010/041082 describe métodos para determinar el metabolismo de uno o más azúcares y/o ácidos grasos, y aplicaciones de los mismos. Las aplicaciones incluyen la determinación de la tasa de síntesis de glucógeno y glucólisis, que se cree que son marcadores tempranos para predecir un riesgo elevado de diabetes y enfermedad cardiovascular. Otras aplicaciones incluyen métodos para seleccionar fármacos que afectan al metabolismo de azúcares y/o ácidos grasos.

El documento WO 2008/138993 se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, al menos una hormona elegida de 3,5-diyodotironina (3,5-T2), 3',3-diyodotironina (3',3-T2), 3',5-diyodotironina (3',5-T2), 3'-yodotironina (3'-T), 3-yodotironina (3-T) o 5-yodotironina (5-T), en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## 50 **Sumario de la invención**

### Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en un método para detectar una razón de combustión azúcar/ácido graso y resistencia a la insulina en un sujeto de prueba con alta precisión combinando un resultado de una prueba del aliento con C marcado usando un ácido graso  $\text{C}_{12-38}$  marcado con isótopos con un resultado de una prueba del aliento con C marcado usando glucosa marcada con isótopos o una glucemia.

### Solución al problema

Los presentes inventores realizaron una extensa investigación para alcanzar los objetos anteriores, y encontraron que la resistencia a la insulina en un sujeto de prueba puede medirse de manera rápida y con alta precisión basándose en el comportamiento de la cantidad del dióxido de carbono marcado con isótopos ( $\text{CO}_2$ ) excretado en el aire espirado después de la administración oral de ácido graso  $\text{C}_{12-38}$  marcado con isótopos y el comportamiento de la abundancia del dióxido de carbono contenido en el aire espirado (la razón de la cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  no marcado, o la razón de la cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de

CO<sub>2</sub> total), calculándose la abundancia a partir de la cantidad de dióxido de carbono marcado con isótopos (CO<sub>2</sub>) excretado en el aire espirado. Los presentes inventores encontraron además que es posible realizar un juicio sobre si un sujeto de prueba tiene resistencia a la insulina o hiperinsulinemia sin resistencia a la insulina, basándose en los resultados de la medición obtenidos a partir del sujeto de prueba.

Los presentes inventores también confirmaron que la razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba puede medirse con alta precisión combinando el resultado de una prueba del aliento usando ácido graso C<sub>12-38</sub> marcado con isótopos con el resultado de una prueba del aliento que usa glucosa marcada con isótopos o una glucemia, y que la resistencia a la insulina en un sujeto de prueba también puede medirse a partir de la razón de combustión azúcar/ácido graso con alta precisión.

La presente invención se ha realizado basándose en estos hallazgos, e incluye las siguientes realizaciones:

(1) una composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba,

comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C,

comprendiendo el método determinar el área bajo una curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t obtenida mediante un método de medición de la capacidad de metabolismo de la glucosa que tiene las siguientes etapas (i) y (ii) a continuación (denominada a continuación en el presente documento "AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]"),

determinar el área bajo una curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t obtenida mediante el método que tiene las siguientes etapas (a) y (b) a continuación (denominada a continuación en el presente documento "AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"),

y usar un valor (AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) obtenido dividiendo la AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado] entre la AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] como índice para la razón de combustión azúcar/ácido graso:

método para determinar AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]:

(i) administrar por vía intravenosa una composición a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, comprendiendo la composición, como principio activo, glucosa marcada con al menos un isótopo de C, de manera que la glucosa se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

(ii) determinar la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado;

método para determinar AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]:

(a) administrar por vía intravenosa la composición que comprende el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, de manera que el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

(b) determinar la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado.

(2) Una composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba,

comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C,

comprendiendo el método determinar el área bajo una curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t obtenida mediante el método que tiene las etapas (a) y (b) a continuación (denominada en el presente documento "AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"),

y usar un valor (1/glucemia/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) determinado dividiendo la inversa de una glucemia (1/glucemia) del sujeto de prueba entre la AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] como índice para la razón de combustión azúcar/ácido graso:

método para determinar  $AUC_i$ [ácido graso con C marcado]:

(a) administrar por vía intravenosa la composición que comprende el ácido graso  $C_{12-38}$  o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, de manera que el ácido graso  $C_{12-38}$  o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

(b) determinar la razón de la cantidad de  $CO_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $CO_2$  no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de  $CO_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $CO_2$  total contenido en el aire espirado.

(3) Una composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba,

comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso  $C_{12-38}$  o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C,

comprendiendo el método determinar  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min) de  $\Delta$ -C marcado (‰) obtenido mediante el método que tiene las etapas (a) y (b) a continuación,

y usar un valor ( $[1/\text{glucemia}]/C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min)) determinado dividiendo la inversa de una glucemia (1/glucemia) del sujeto de prueba entre  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min) como índice para la razón de combustión azúcar/ácido graso:

método para determinar  $AUC_i$ [ácido graso con C marcado]:

(a) administrar por vía intravenosa la composición que comprende el ácido graso  $C_{12-38}$  o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, de manera que el ácido graso  $C_{12-38}$  o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

(b) determinar la razón de la cantidad de  $CO_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $CO_2$  no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de  $CO_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $CO_2$  total contenido en el aire espirado.

(4). La composición para su uso según uno cualquiera de los puntos (1) a (3), en la que el isótopo es  $^{13}C$ .

(5) La composición para su uso según uno cualquiera de los puntos (1) a (4), en la que el ácido graso  $C_{12-38}$  es un ácido graso  $C_{12-18}$  saturado o un ácido graso  $C_{18}$  insaturado.

6. La composición para su uso según uno cualquiera de los puntos (1) a (5), en la que el ácido graso  $C_{12-38}$  es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico.

7. La composición para su uso según uno cualquiera de los puntos (1) a (6), en la que el sujeto de prueba tiene al menos un estado seleccionado del grupo que consiste en prediabetes, diabetes tipo II, cirrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica y esteatosis hepática no alcohólica.

### Efectos ventajosos de la invención

Combinando una prueba del aliento usando un ácido graso  $C_{12-38}$  marcado con isótopos y una prueba del aliento usando glucosa marcada con isótopos, es posible medir la razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba. Este método permite la medición sobre si el sujeto de prueba usa un azúcar o un ácido graso como fuente de energía en lugar de, y de manera más sensible que, el cociente respiratorio. Además, la resistencia a la insulina en un sujeto de prueba también puede evaluarse con alta precisión a partir de la "razón de combustión azúcar/ácido graso" obtenida con la composición para su uso según la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la transición de  $\Delta^{13}C$  (‰) en el aire espirado medida después de la administración oral (v.o.) (-○-) o inyección intravenosa (i.v.) (-■-) de una disolución de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio a ratas Zucker en ayunas. El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}C$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de medición (t minutos) después de la administración de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 1).

La figura 2 muestra la transición de  $\Delta^{13}C$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de  $U-^{13}C$ -glucosa a ratas ZDF en un estado de ayuno o alimentación (delgadas y obesas). La figura 2(A) muestra los resultados de ratas delgadas (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 2(B) muestra los

resultados de ratas obesas (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de disolución de U- $^{13}\text{C}$ -glucosa (ejemplo experimental 2).

5 La figura 3 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -acetato de sodio a ratas ZDF en un estado de ayuno o alimentación (delgadas y obesas). La figura 3(A) muestra los resultados de ratas delgadas (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 3(B) muestra los resultados de ratas obesas (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -acetato de sodio (ejemplo experimental 2).

10 La figura 4 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio a ratas ZDF en un estado de ayuno o alimentación (delgadas y obesas). La figura 4(A) muestra los resultados de ratas delgadas (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 4(B) muestra los resultados de ratas obesas (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio (ejemplo experimental 2).

15 La figura 5 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -ácido láurico a ratas ZDF en un estado de ayuno o alimentación (delgadas y obesas). La figura 5(A) muestra los resultados de ratas delgadas (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 5(B) muestra los resultados de ratas obesas (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -ácido láurico (ejemplo experimental 2).

20 La figura 6 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas ZDF en un estado de ayuno o alimentación (delgadas y obesas). La figura 6(A) muestra los resultados de ratas delgadas (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 6(B) muestra los resultados de ratas obesas (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 2).

25 La figura 7 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -ácido oleico a ratas ZDF en un estado de ayuno o alimentación (delgadas y obesas). La figura 7(A) muestra los resultados de ratas delgadas (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 7(B) muestra los resultados de ratas obesas (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -ácido oleico (ejemplo experimental 2).

30 La figura 8 muestra transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la administración intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a cada grupo (grupos en ayunas y con alimentación) de ratas LETO y OLETF. La figura 8(A) indica los resultados de ratas LETO (en ayunas: -◆-, con alimentación: -◇-), y la figura 8(B) indica los resultados de ratas OLETF (en ayunas: -■-, con alimentación: -□-). El eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 3).

35 La figura 9(A) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas ZDF en un estado de ayuno (delgadas: -◆-, obesas: -■-). La figura 9(B) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas ZDF en un estado de alimentación (delgadas: -◇-, obesas: -□-). En las figuras 9(A) y 9(B), el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 3).

40 La figura 10(A) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas LETO (-◆-) y ratas OLETF (-■-) en un estado de ayuno. La figura 10(B) muestra la transición de la  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas LETO (-◇-) y rata OLETF (-□-) en un estado de alimentación. En las figuras 10(A) y 10(B), el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 3).

45 La figura 11(A) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de 1- $^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas ZDF en un estado de alimentación (delgadas: -◇-, obesas: -□-). La

figura 11(B) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas ZDF en un estado de ayuno (delgadas:  $-\blacklozenge-$ , obesas:  $-\blacksquare-$ ). En las figuras 11(A) y 11(B), el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 4).

La figura 12(A) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas LETO ( $-\diamond-$ ) y ratas OLETF ( $-\square-$ ) en un estado de alimentación. La figura 12(B) muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la inyección intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas LETO ( $-\blacklozenge-$ ) y ratas OLETF ( $-\blacksquare-$ ) en un estado de ayuno. En las figuras 12(A) y 12(B), el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (ejemplo experimental 4).

La figura 13 muestra el valor promedio  $\pm$ DE medido del cociente respiratorio (RQ) de ratas ZDF en estados de ayuno y alimentación (delgadas:  $-\blacklozenge-$ , obesas:  $-\square-$ ) (ejemplo experimental 4).

La figura 14 muestra una comparación entre un estado de ayuno y un estado de alimentación con respecto a una razón  $\text{AUC}[U\text{-}^{13}\text{C}\text{-glucosa}] / \text{AUC}[1\text{-}^{13}\text{C}\text{-palmitato de sodio}]$  de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)AUC (120 minutos) obtenida mediante (a) la administración de una disolución de  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa (estado de ayuno, estado de alimentación) con respecto a  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) AUC (60 minutos) obtenida mediante (f) la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (estado de ayuno, estado de alimentación) obtenida en el ejemplo experimental 2 usando ratas ZDF (delgadas y obesas).

La figura 15 muestra una comparación entre un estado de ayuno y un estado de alimentación con respecto a una razón  $([1/\text{glucemia}] / \text{AUC}[1\text{-}^{13}\text{C}\text{-palmitato de sodio}])$  de la inversa de la glucemia (estado de ayuno, estado de alimentación) con respecto a  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)AUC (60 minutos) obtenida mediante (f) la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (estado de ayuno, estado de alimentación) en el ejemplo experimental 2 usando ratas ZDF (delgadas y obesas).

La figura 16 muestra una comparación entre un estado de ayuno y un estado de alimentación con respecto a la razón  $([1/\text{glucemia}] / C_{\text{máx}}[1\text{-}^{13}\text{C}\text{-palmitato de sodio}])$  de la inversa de la glucemia (estado de ayuno, estado de alimentación) con respecto a  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)  $C_{\text{máx}}$  obtenida mediante (f) la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (estado de ayuno, estado de alimentación) en el ejemplo experimental 2 usando ratas ZDF (delgadas y obesas).

La figura 17 muestra las transiciones de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) calculadas a partir de las concentraciones de  $^{13}\text{CO}_2$  medidas mediante la prueba del aliento después de administrar por vía intravenosa una disolución mixta de  $3\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa y  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a, de izquierda a derecha, un grupo de control (glucemia en condiciones de alimentación: 108 mg/dl), un grupo con diabetes leve (glucemia en condiciones de alimentación: 166 mg/dl), y un grupo con diabetes grave (glucemia en condiciones de alimentación: 281 mg/dl).

### Descripción de las realizaciones

#### (I) Descripción de términos y métodos de análisis relacionados con la prueba del aliento con C marcado

El método para medir la razón de combustión azúcar/ácido graso se basa en el uso de una prueba del aliento con C marcado, tal como una prueba del aliento con  $^{13}\text{C}$ . Por tanto, antes de la descripción de la presente invención, se describen los términos y métodos de análisis de la misma relacionados con una prueba del aliento con C marcado.

En el presente documento, se describe  $^{13}\text{C}$  como un ejemplo de "isótopo C" usado en la presente invención.

#### (1) Valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

Las abundancias de isótopos se expresan en cuanto a la razón isotópica (R) en la que el isótopo más abundante del mismo elemento se usa como el denominador. Por tanto, con respecto al carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ), el valor de R se expresa mediante la siguiente fórmula en la que el carbono 12 ( $^{12}\text{C}$ ) se usa como el denominador.

$$R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \quad \dots \dots \dots \text{(Fórmula 1)}$$

Debido a que R es un valor numérico muy pequeño, es difícil medirlo directamente. Cuando se usa un espectrómetro de masas para una cuantificación más precisa, se realiza siempre la comparación con una sustancia patrón. El resultado de la medición se representa mediante el valor de  $\delta$  definido mediante la siguiente fórmula.

$$\delta^{13}\text{C} = ([R_{\text{SAM}}/R_{\text{STD}}]-1) \times 1000 \quad \dots\dots\dots \text{(Fórmula 2)}$$

$\delta^{13}\text{C}$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

5  $R_{\text{SAM}}$ : abundancia de  $^{13}\text{C}$  en un gas de muestra

$R_{\text{STD}}$ : abundancia de  $^{13}\text{C}$  en un gas patrón

Cuando se usa dióxido de carbono derivado de piedra caliza (PDB) como gas patrón,  $R_{\text{STD}}$  es  $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$ .

10 (2) Valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

El "valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)" significa un valor ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) obtenido restando el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  antes de la administración de un reactivo (es decir, el valor de  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  que se produce de manera natural) como fondo a partir del valor de  $\delta^{13}\text{C}$  después de la administración del reactivo, tal como se muestra en la siguiente fórmula.

$$\Delta^{13}\text{C} = (\delta^{13}\text{C})_t - (\delta^{13}\text{C})_0 \quad \dots\dots\dots \text{(Fórmula 3)}$$

$\Delta^{13}\text{C}$ : cantidad de cambio en el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

20  $(\delta^{13}\text{C})_t$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  a las t h después de la administración del reactivo (‰)

$(\delta^{13}\text{C})_0$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  a las 0 h antes de la administración del reactivo (‰)

25 (3) Concentración de  $^{13}\text{C}$  en el aire espirado (% $^{13}\text{C}$ : % de átomos)

La concentración de  $^{13}\text{C}$  en el aire espirado (% $^{13}\text{C}$ : % de átomos) se define mediante la siguiente fórmula.

$$\%^{13}\text{C} = [^{13}\text{C}/(^{13}\text{C} + ^{12}\text{C})] \times 100$$

30 Para convertir el valor relativo de  $\delta^{13}\text{C}$  definido en (1) en la concentración de  $^{13}\text{C}$  (%) en el carbono total, que es un concepto habitual de concentración, puede usarse el siguiente método.

35 En primer lugar, el numerador y el denominador en el lado derecho de la fórmula anterior se dividen entre  $^{12}\text{C}$ , y se convierte en R basándose en la (Fórmula 1). Por tanto, se obtiene la siguiente fórmula.

$$\%^{13}\text{C} = [R/(R + 1)] \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{(Fórmula 4)}$$

40 Si el  $R_{\text{SAM}}$  obtenido en la (Fórmula 2) se sustituye en el R anterior y se reordena, se obtiene la siguiente fórmula. La concentración de  $^{13}\text{C}$  (% $^{13}\text{C}$ ) puede expresarse usando el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$ .

$$\%^{13}\text{C} = \{[(\delta^{13}\text{C}/1000)+1] \times R_{\text{PDB}} \times 100\} / \{[(\delta^{13}\text{C}/1000)+1] \times R_{\text{PDB}} + 1\} \quad \dots\dots\dots \text{(Fórmula 5)}$$

45 % $^{13}\text{C}$ : concentración de  $^{13}\text{C}$  (% de átomos)

$\delta^{13}\text{C}$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

$R_{\text{PDB}}$ : abundancia de  $^{13}\text{C}$  en el gas patrón de PDB = 0,0112372

50 (4) Cantidad de cambio en la concentración de  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta\%^{13}\text{C}$ )

Tal como se define en la siguiente fórmula, la cantidad de cambio en la concentración de  $^{13}\text{C}$  (% $^{13}\text{C}$ ) en el aire espirado ( $\Delta\%^{13}\text{C}$ ) se determina restando la concentración de  $^{13}\text{C}$  a las 0 h antes de la administración [(% $^{13}\text{C}$ )<sub>0</sub>] de la concentración de  $^{13}\text{C}$  a las t h después de la administración [(% $^{13}\text{C}$ )<sub>t</sub>].

$$\Delta\%^{13}\text{C} = (\%^{13}\text{C})_t - (\%^{13}\text{C})_0 \quad \dots\dots\dots \text{(Fórmula 6)}$$

$\Delta\%^{13}\text{C}$ : cantidad de cambio en la concentración de  $^{13}\text{C}$  (% de átomos)

60 (% $^{13}\text{C}$ )<sub>t</sub>: concentración de  $^{13}\text{C}$  a las t h después de la administración del reactivo (% de átomos)



(%<sup>13</sup>C)<sub>0</sub>: concentración de <sup>13</sup>C a las 0 h antes de la administración del reactivo (% de átomos)

(5) Relación entre el valor de Δ<sup>13</sup>C (‰) y la cantidad de cambio en la concentración de <sup>13</sup>C (Δ%<sup>13</sup>C)

5 La abundancia natural (R) de <sup>13</sup>C es de aproximadamente 0,011, e incluso cuando se administra un reactivo marcado, la cantidad aumentada en el aire espirado es de sólo aproximadamente +0,001 a 0,002. Por tanto, la abundancia natural puede considerarse como R→0, y la (Fórmula 4), que expresa el %<sup>13</sup>C usando R, puede aproximarse mediante la siguiente fórmula.

10 
$$\%^{13}\text{C} = [R / (R + 1)] \times 100 \doteq R \times 100$$

Usando esta expresión aproximada, puede obtenerse una aproximación que determina la concentración de <sup>13</sup>C (Fórmula 7) de la siguiente manera: en primer lugar, R<sub>SAM</sub> se determina mediante la (Fórmula 2), que define δ<sup>13</sup>C, sustituido en R en la fórmula anterior, y reordenando.

15 
$$\%^{13}\text{C} = [(\delta^{13}\text{C}/1000) + 1] \times R_{\text{PDB}} \times 100 \dots\dots (Fórmula 7)$$

Cuanto esto se sustituye en la (Fórmula 6), Δ%<sup>13</sup>C puede calcularse a partir de Δ<sup>13</sup>C, tal como se muestra en la (Fórmula 8) a continuación.

20 
$$\begin{aligned} \Delta\%^{13}\text{C} &= (\%^{13}\text{C})_t - (\%^{13}\text{C})_0 \\ &= \{[(\delta^{13}\text{C})_t - (\delta^{13}\text{C})_0] / 1000\} \times R_{\text{PDB}} \times 100 \\ &= (\Delta^{13}\text{C} \times R_{\text{PDB}}) / 10 \dots\dots (Fórmula 8) \end{aligned}$$

Δ%<sup>13</sup>C: cantidad de cambio en la concentración de <sup>13</sup>C (% de átomos)

25 Δ<sup>13</sup>C: cantidad de cambio en el valor de δ<sup>13</sup>C (‰)

R<sub>PDB</sub>: abundancia de <sup>13</sup>C en el gas patrón de PDB = 0,0112372

(II) Composición para su uso según la presente invención

30 La composición para su uso según la presente invención comprende, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C, en la que el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en gas de CO<sub>2</sub> marcado que se excreta en el aire espirado. El ácido graso con C marcado o una sal del mismo usado en la presente invención tiene una característica tal que, después de administrarse a un sujeto de prueba, el ácido graso con C marcado o una sal del mismo se metaboliza según la capacidad de metabolismo de lípidos en el cuerpo y se excreta en el aire espirado en forma de dióxido de carbono que contiene C marcado, lo que refleja el grado de capacidad de metabolismo de lípidos del sujeto de prueba.

40 Tal como se mencionó anteriormente, los ejemplos del ácido graso usado en la presente invención incluyen ácidos grasos C<sub>12-38</sub>. Los ejemplos de tales ácidos grasos incluyen ácidos grasos de cadena media que tienen de 12 a menos de 18 átomos de carbono, ácidos grasos de cadena larga que tienen de 18 a menos de 24 átomos de carbono, ácidos grasos de cadena muy larga que tienen de 24 a 28 átomos de carbono, y ácidos grasos de cadena ultralarga que tienen de 30 a 38 átomos de carbono. Preferiblemente, el ácido graso es un ácido graso C<sub>12-28</sub> de cadena media, larga o muy larga, más preferiblemente ácido graso de cadena media o larga que tiene de 12 a menos de 24 átomos de carbono. Más específicamente, los ejemplos incluyen ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido pentadecílico (C15), ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido araquídico y ácidos grasos saturados similares; ácido palmitoleico (C16), ácido oleico (C18), ácido vaccénico (C18), ácido nervónico (C24) y ácidos grasos insaturados similares que tienen un doble enlace; ácido linoleico (C18), ácido 8,11-icosadienoico y ácidos grasos insaturados similares que tienen dos dobles enlaces; ácido linolénico (C18), ácido araquidónico (C20) y ácidos grasos insaturados similares que tienen tres o más dobles enlaces. Los ejemplos preferibles incluyen ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados que tienen un doble enlace; entre ellos, son preferibles ácido láurico (C12:0), ácido esteárico (C18:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido oleico (C18:1). Son más preferibles el ácido esteárico (C<sub>18</sub>) y el ácido palmítico (C16).

55 No existe limitación particular en los isótopos usados en el marcaje de átomos de carbono de ácido graso, y los ejemplos específicos incluyen <sup>13</sup>C y <sup>14</sup>C. Tales isótopos pueden ser radiactivos o no radiactivos; sin embargo, desde el punto de vista de la seguridad, son preferibles los isótopos no radiactivos. Por ejemplo, <sup>13</sup>C es deseable para su uso como un isótopo de este tipo.

60 El ácido graso marcado con isótopos se marca de tal manera que al menos una parte del CO<sub>2</sub> formado a través de la

ruta metabólica de los lípidos (ruta metabólica de los ácidos grasos) se marca con isótopos. Los ejemplos de tal ácido graso marcado con isótopos incluyen compuestos en los que el átomo de carbono en la posición 1 del ácido graso se marca con un isótopo. Los ejemplos específicos incluyen ácido graso marcado en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ . Puede usarse un ácido graso en el que al menos el átomo de carbono en la posición 1 se marca con isótopos; es decir, además del átomo de carbono en la posición 1, uno o más de los otros átomos de carbono o de todos los átomos de carbono pueden marcarse con isótopos. No existe limitación particular en el método para marcar compuestos tales como ácido graso con isótopos tales como  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ , y puede emplearse una amplia variedad de métodos usados habitualmente (Sasaki, "5.1 Antei Doitai no Rinsho Shindan heno Oyo [5.1 Application of Stable Isotopes in Clinical Diagnosis]": Kagaku no Ryoiki [Journal of Japanese Chemistry] 107, "Antei Doitai no I/Yakugaku Seibutsugaku heno Oyo [Application of Stable Isotopes in Medicine, Pharmacy, and Biology]," págs. 149-163 (1975), Nankodo: Kajiwara, RADIOISOTOPES, 41, 45-48 (1992), etc.). Tales compuestos marcados con isótopos, particularmente ácido láurico marcado en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ , ácido palmítico marcado en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ , ácido esteárico marcado en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ , ácido oleico marcado en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ , y sales de los mismos descritos en los ejemplos, están disponibles comercialmente como productos comerciales que pueden usarse de manera apropiada.

Las sales del ácido graso  $\text{C}_{12-38}$  pueden ser cualquier sal farmacéuticamente aceptable que puede administrarse a organismos vivos. Los ejemplos de las mismas incluyen sal de metal alcalino de sodio, potasio, o similar; y sal de metal alcalinotérreo de magnesio, calcio, o similar. Son preferibles las sales de metal alcalino. Es particularmente preferible la sal de sodio.

No existe limitación particular en la composición usada en presente invención en cuanto a su forma, componentes distintos del ácido graso con C marcado, proporción de cada componente, método de preparación de la composición, etc., siempre que el ácido graso con C marcado se absorba en el cuerpo después de la administración, y se excrete en el aire espirado en forma de dióxido de carbono marcado después del metabolismo.

Tal como se indica en el ejemplo experimental 1 descrito más adelante, las formas de dosificación son formas de dosificación inyectables, en particular, formas de dosificación intravenosas desde el punto de vista de asegurar una elevación rápida de " $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)," es decir, excreción de alta velocidad en el aire espirado como  $^{13}\text{CO}_2$  después de la administración de ácidos grasos marcados con C. Los ejemplos de formas de dosificación inyectables incluyen inyecciones y gotas (en forma de líquido, suspensión o emulsión).

La composición puede consistir sustancialmente en el ácido graso con C marcado, que es un principio activo; sin embargo, siempre que las funciones y los efectos de la presente invención no se afecten de manera adversa, puede añadirse cualquier portador y/o aditivo farmacéuticamente aceptable que se usa generalmente en este campo como otros componentes según la forma farmacéutica (forma de dosificación). En este caso, no existe limitación particular en la cantidad del ácido graso con C marcado contenido como principio activo. Por ejemplo, la cantidad del ácido graso con C marcado está en el intervalo del 1 al 99% en peso basándose en el peso total (100% en peso) de la composición, y se controla de manera adecuada dentro de este intervalo.

Más específicamente, cuando la composición se prepara en una forma inyectable tal como líquido, suspensión o emulsión, por ejemplo, pueden usarse diversos portadores y/o aditivos adecuados para tales formas junto con agua purificada o agua destilada para inyección. Los ejemplos de aditivos incluyen aditivos usados habitualmente, tales como agentes de ajuste de la tonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, etc.), ajustadores del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etc.), tampones (por ejemplo, ácido bórico, monohidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, etc.), y espesantes (por ejemplo, polímeros de carboxivinilo, etc.). Siempre que la composición pueda convertirse en una forma inyectable cuando se use, puede tener una forma sólida, tal como una preparación liofilizada o una preparación secada por pulverización, que va a disolverse en agua destilada para inyección o similar cuando se use.

En el método de medición descrito más adelante, la composición se usa como una muestra de administración (muestra de prueba) que va a administrarse a un sujeto de prueba. Más específicamente, la composición se usa como una muestra de prueba que va a administrarse a un sujeto de prueba para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en el sujeto de prueba.

Todos estos métodos de medición se realizan administrando por vía intravenosa la composición a un sujeto de prueba (incluyendo un humano y un animal), recogiendo el aire espirado, midiendo la abundancia de dióxido de carbono contenido en el aire espirado (la razón de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  no marcado o la razón de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  total), y usando la abundancia como índice. Los detalles se describen en (III) a continuación.

La cantidad del ácido graso con C marcado (principio activo) contenido en la composición para medir la resistencia a la insulina de la presente invención puede seleccionarse de manera adecuada según cada caso. Más específicamente, la dosis puede ajustarse de manera que la cantidad del ácido graso con C marcado (principio activo) por dosis esté en el intervalo de 5 mg/cuerpo a 50 g/cuerpo, y preferiblemente de 10 mg/cuerpo a 25 g/cuerpo.

(III) Método para medir la resistencia a la insulina (Referencia)

El uso de la composición descrita anteriormente para medir la resistencia a la insulina de la presente invención permite la medición de la baja sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina) en un sujeto de prueba (un humano, o un mamífero distinto de los humanos).

Tal como se describe a continuación, la medición de la resistencia a la insulina puede realizarse básicamente a través de la etapa de administrar la composición anterior, que comprende el ácido graso con C marcado como principio activo, a un mamífero incluyendo un humano (sujeto de prueba), y recoger el aire espirado ([etapa (a)], y la etapa de medir la abundancia de dióxido de carbono contenido en el aire espirado (la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total) ([etapa (b)]).

[Etapa (a)] La etapa de administrar una composición a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C, en la que el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado (a continuación en el presente documento tal ácido graso y una sal del mismo se denominan de manera colectiva "ácido graso con C marcado" a menos que se especifique lo contrario); y

[Etapa (b)] La etapa de determinar la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado.

Tal como se describió anteriormente, el ácido graso con C marcado usado en la presente invención tiene una característica tal que, después de administrarse por vía intravenosa a un sujeto de prueba, el ácido graso con C marcado se metaboliza según la capacidad de metabolismo de ácidos grasos del sujeto de prueba y se excreta en el aire espirado en forma de "dióxido de carbono que contiene C marcado", lo que refleja el grado de la capacidad de metabolismo de ácidos grasos.

Tal como se indica en el ejemplo experimental 1, la administración de la composición, que comprende el ácido graso con C marcado como principio activo, se realiza a través de administración intravenosa en cuanto a alta precisión.

La cantidad del ácido graso con C marcado (principio activo) contenido en la composición para medir la resistencia a la insulina puede seleccionarse de manera adecuada según cada caso (diferencia individual del sujeto de prueba, estado del sujeto de prueba tal como si el sujeto de prueba está en un estado de ayuno o un estado de alimentación, etc.). La dosis de una administración intravenosa se ajusta de manera que la cantidad del ácido graso con C marcado (principio activo) en este respecto esté en el intervalo de 5 mg/cuerpo a 50 g/cuerpo, y preferiblemente de 10 mg/cuerpo a 25 g/cuerpo.

Tal como se describió anteriormente, los sujetos de prueba diana de la presente invención son humanos, o mamíferos distintos de los humanos. Los ejemplos de mamíferos distintos de los humanos incluyen ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, gatos, monos, cerdos, ganado vacuno, caballos, y similares. Los mamíferos distintos de los humanos son preferiblemente animales de experimentación tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, perros y monos.

El sujeto de prueba puede estar en un estado de ayuno o estado de alimentación antes de someterse a la etapa (a). Tal como se indica en el ejemplo experimental 2 descrito más adelante, cuando un sujeto de prueba en un estado de alimentación, en vez de un sujeto de prueba en un estado de ayuno, se somete a la etapa (a), "la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total" puede medirse en la etapa (b) con alta precisión durante un corto periodo de tiempo. Por tanto, es preferible un sujeto de prueba en un estado de alimentación.

El caso en el que se usa una composición que comprende ácido graso marcado con <sup>13</sup>C como principio activo (es decir, el caso en el que el CO<sub>2</sub> marcado medido es <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>) se describe a continuación como un ejemplo del método para medir la resistencia a la insulina de un sujeto de prueba basándose en la abundancia de dióxido de carbono contenido en el aire espirado (la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total) determinado en la etapa (b) usando el aire espirado recogido en la etapa (a).

(1) La abundancia de dióxido de carbono contenido en el aire espirado recogido (la razón de la cantidad de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total) se calcula según el método descrito a continuación como la cantidad de cambio en la concentración de <sup>13</sup>C ( $\Delta\%^{13}\text{C}$ ), que se obtiene restando la concentración de <sup>13</sup>C (% de átomos) [ $(\%^{13}\text{C})_0$ ] antes de la administración del ácido graso marcado con <sup>13</sup>C.

Se determina la concentración de <sup>13</sup>C (% de átomos) en el carbono total contenido en el aire espirado [concentración

de  $^{13}\text{C}$  ( $\%^{13}\text{C}$ ) en el aire espirado ( $\%^{13}\text{C}$ ); además, la concentración de  $^{13}\text{C}$  (% de átomos) antes de la administración del compuesto marcado con  $^{13}\text{C}$  [ $(\%^{13}\text{C})_0$ ] se resta según la fórmula 6, obteniendo de ese modo la cantidad de cambio en la concentración de  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta\%^{13}\text{C}$ ).

5 
$$\text{Concentración de } ^{13}\text{C} (\% \text{ de átomos}) = \left[ \frac{^{13}\text{C}}{(^{13}\text{C} + ^{12}\text{C})} \right] \times 100$$

$$\Delta\%^{13}\text{C} = (\%^{13}\text{C})_t - (\%^{13}\text{C})_0 \quad \dots\dots\dots (\text{Fórmula 6})$$

$\Delta\%^{13}\text{C}$ : cantidad de cambio en la concentración de  $^{13}\text{C}$  (% de átomos)

10  $(\%^{13}\text{C})_t$ : concentración de  $^{13}\text{C}$  a las t h después de la administración del reactivo (% de átomos)

$(\%^{13}\text{C})_0$ : concentración de  $^{13}\text{C}$  a las 0 h antes de la administración del reactivo (% de átomos)

15 (2) Si es necesario, la cantidad de cambio en la concentración de  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta\%^{13}\text{C}$ ) puede convertirse en el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) [cantidad de cambio en el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) o DOB(‰)] basándose en la fórmula 5 y la fórmula 3.

$$\%^{13}\text{C} = \left\{ \left[ \left( \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \times R_{\text{PDB}} \times 100 \right] / \left\{ \left[ \left( \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \times R_{\text{PDB}} \right] + 1 \right\} \right\} \dots\dots\dots (\text{Fórmula 5})$$

20  $\%^{13}\text{C}$ : concentración de  $^{13}\text{C}$  (% de átomos)

$\delta^{13}\text{C}$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

$R_{\text{PDB}}$ : abundancia de  $^{13}\text{C}$  en el gas patrón de PDB = 0,0112372

25 
$$\Delta^{13}\text{C} = (\delta^{13}\text{C})_t - (\delta^{13}\text{C})_0 \quad \dots\dots\dots (\text{Fórmula 3})$$

$\Delta^{13}\text{C}$  (‰): cantidad de cambio en el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

30  $(\delta^{13}\text{C})_t$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  a las t h después de la administración del reactivo (‰)

$(\delta^{13}\text{C})_0$ : valor de  $\delta^{13}\text{C}$  a las 0 h antes de la administración del reactivo (‰)

35 La concentración de C marcado excretado en el aire espirado después de que se administra la composición para medir la resistencia a la insulina, que comprende el ácido graso con C marcado como principio activo, o la  $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) correspondiente reflejan la resistencia a la insulina en un sujeto de prueba, tal como se indica en los ejemplos experimentales descritos más adelante. El método de la presente invención, que usa la composición, permite que se mida la resistencia a la insulina en un sujeto de prueba de manera rápida y con alta precisión.

40 La medición y el análisis del dióxido de carbono marcado contenido en la muestra de aire espirado varía dependiendo de si el isótopo usado es radiactivo o no radiactivo. Sin embargo, la medición y el análisis puede realizarse mediante un método de análisis usado de manera habitual, tal como el método de contador de centelleo líquido, espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja, espectrometría de emisión o el método del espectro de resonancia magnética. Desde el punto de vista de la precisión de la medición, son preferibles espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas.

45 La resistencia a la insulina en un sujeto de prueba puede determinarse mediante el siguiente método, usando, como índice, "la razón de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  total contenido en el aire espirado" ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) obtenida en la etapa (b) descrita anteriormente.

50 (c-1) "La razón de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  total contenido en el aire espirado" ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos)) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) obtenida en el sujeto de prueba en la etapa (b) (valor del sujeto de prueba) se compara con "la razón correspondiente de la cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  no marcado contenido en el aire espirado o la razón correspondiente de cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado con respecto a la cantidad de  $\text{CO}_2$  total contenido en el aire espirado" ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) de un sujeto sano (valor de control).

60 (c-2) Como resultado de la comparación, cuando el valor del sujeto de prueba es más alto que el valor de control se determina que se disminuye la sensibilidad a la insulina del sujeto de prueba, más específicamente, que el sujeto de

prueba es “resistente a la insulina.” Si el valor del sujeto de prueba es igual a o menor que el valor de control, se determina que la sensibilidad a la insulina del sujeto de prueba es normal o que no disminuye.

En el presente documento, el sujeto sano significa un sujeto con sensibilidad a la insulina sana (normal). Más específicamente, el sujeto sano no tiene ninguna anomalía en la secreción de insulina, y no tiene ningún trastorno metabólico de la glucosa (incluyendo hiperinsulinemia) tal como diabetes (incluyendo diabetes tipo II y diabetes gestacional), prediabetes o hepatopatía (cirrosis hepática, NASH, NAFLD, etc.).

Usando métodos de diagnóstico conocidos o convencionales (medición de la glucemia tal como una prueba de tolerancia a la glucosa de 75 g, prueba de resistencia a la insulina, hemoglobina A1c, etc.) en el campo, es posible determinar si el sujeto de prueba es un sujeto sano o no. Por ejemplo, en la prueba de tolerancia a la glucosa de 75 g, se determina que la capacidad de metabolismo de la glucosa es normal cuando la glucemia con el estómago vacío es menor de 110 mg/dl, y la glucemia dos horas después de que se cargue la glucosa es menor de 140 mg/dl.

Tal como se muestra en el ejemplo experimental 2 (figura 2), la capacidad de metabolismo de la glucosa de un modelo de sujeto de prueba (sujeto de prueba resistente a la insulina) (ZDF obesas en la figura 2) que ha desarrollado diabetes o en una fase prediabética es menor que la de un sujeto sano (ZDF delgadas en la figura 2). Administrando el ácido graso con C marcado al modelo de sujeto de prueba y realizando la etapa (b), tal como se muestra en la figura 6(B) (una figura que corresponde a ZDF obesas), “la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado” ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) (valor del sujeto de prueba) determinada en la etapa (b) es generalmente superior (aumentada) tanto en el estado de ayuno como en el estado de alimentación que “la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado” ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) en un sujeto sano (valor de control) (figura 6(A) (una figura referente a las ZDF delgadas)) (ejemplo experimental 2). Se obtuvieron resultados similares en un experimento usando ratas OLETF como animales de experimentación en lugar de ratas ZDF obesas (véase el ejemplo experimental 3, figura 7). La rata OLETF es un animal modelo de diabetes tipo II que desarrolla diabetes acompañada por obesidad o/y esteatosis hepática y complicaciones de la diabetes. La diferencia en el incremento (aumento) en  $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) del sujeto de prueba resistente a la insulina con respecto al sujeto sano es más significativa en el estado de alimentación (véase el ejemplo experimental 3, comparación entre la figura 8(A) y 8(B), y comparación entre la figura 9(A) y 9(B)). Esto muestra que la capacidad de metabolismo de ácidos grasos de un sujeto de prueba (sujeto de prueba resistente a la insulina), que desarrolló diabetes o está en una fase prediabética y tiene baja sensibilidad a la insulina, es superior (aumentada) que la de un sujeto sano. Por tanto, el método de la presente invención hace posible medir indirectamente la resistencia a la insulina en un sujeto de prueba a partir de la capacidad de metabolismo de ácidos grasos del sujeto de prueba. Como resulta evidente a partir de las figuras 8(B) y 9(B) que muestran los resultados del experimento en un estado de alimentación, este método de la presente invención se caracteriza en la diferencia clara entre el valor ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) obtenido de un sujeto de prueba con baja sensibilidad a la insulina y el valor de control obtenido de un sujeto sano, y los resultados muy precisos que pueden obtenerse justo después de la recogida del aire espirado (en un plazo de 1 a 30 minutos, preferiblemente en un plazo de 1 a 15 minutos).

Además, tal como se muestra en el ejemplo experimental 4 (figuras 10 y 11), la capacidad de metabolismo de ácidos grasos se disminuye en un modelo de sujeto de prueba que tiene “hiperinsulinemia no resistente a la insulina” (figura 10: rata ZDF obesa, figura 11: rata OLETF) en el que la sensibilidad a la insulina no se disminuye a pesar de la hiperinsulinemia, en comparación con un sujeto sano (figura 10: rata ZDF delgada, figura 11: rata LETO). Administrando ácido graso con C marcado al sujeto de prueba con “hiperinsulinemia no resistente a la insulina” preferiblemente en un estado de alimentación, y realizando la etapa (b), tal como se muestra en las figuras 10(A) y 11(A) (figura 10: gráfico de rata ZDF obesa, figura 11: gráfico de rata OLETF), “la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado” ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) (valor del sujeto de prueba) obtenida en la etapa (b) es menor (disminuida) que “la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado” ( $\Delta\%^{13}\text{C}$  (% de átomos) o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰)) obtenida de un sujeto sano (valor de control) (figura 10: rata ZDF delgada, figura 11: rata LETO) (ejemplo experimental 4). Esto revela que el metabolismo de ácidos grasos en un sujeto de prueba que tiene hiperinsulinemia sin resistencia a la insulina (hiperinsulinemia no resistente a la insulina) es menor que el de un sujeto sano. Más específicamente, el método hace posible medir indirectamente la presencia o ausencia de resistencia a la insulina en un sujeto de prueba con hiperinsulinemia a partir de la capacidad de metabolismo de ácidos grasos del sujeto de prueba, discriminando de ese modo entre “hiperinsulinemia no resistente a la insulina” e “hiperinsulinemia resistente a la insulina”. Este método también se caracteriza en los resultados muy precisos que pueden obtenerse justo después de la recogida del aire espirado (en un plazo de 1 a 30 minutos, preferiblemente en un plazo de 1 a 15 minutos), como resulta evidente en las figuras 10 y 11 que muestran los resultados del ejemplo experimental 4, en particular, las figuras 10(A) y 11(A) que muestran los resultados en un estado de alimentación.

La medición de la capacidad de metabolismo de la glucosa conocida o convencional en este campo (tal como la medición de glucemia, prueba de resistencia a la insulina y medición de HbA1c) puede realizarse en paralelo con método descrito anteriormente, que usa una prueba del aliento. Además, realizando la medición de la de capacidad de metabolismo de la glucosa, es posible juzgar y determinar además si el sujeto de prueba, que se ha determinado que es resistente a la insulina, tiene prediabetes o diabetes (diabetes tipo II, diabetes gestacional) acompañada por resistencia a la insulina. Además, la medición de la hepatopatía/función hepática conocida o convencional en este campo puede realizarse en paralelo con el método descrito anteriormente, que usa una prueba del aliento. Además, usando los resultados de la medición con respecto a la hepatopatía y/o la función hepática, es posible juzgar y determinar si un sujeto de prueba, que se ha determinado que es resistente a la insulina mediante el método de la presente invención, tiene hepatopatía (cirrosis hepática, NASH, NAFLD) acompañada por resistencia a la insulina.

En este caso, los ejemplos del sujeto de prueba incluyen humanos o mamíferos distintos de humanos que tienen las enfermedades anteriores (prediabetes, diabetes, hepatopatía, disfunción hepática, etc., acompañada por resistencia a la insulina), o pueden tener estas enfermedades. Además, el método de la presente invención puede aplicarse de manera amplia a humanos o mamíferos distintos de humanos con el fin de detectar la presencia o ausencia de resistencia a la insulina, o con el fin de detectar la adquisición de estas enfermedades junto con la presencia o ausencia de resistencia a la insulina. Con su alta precisión, el método puede usarse de manera eficaz para juzgar y determinar si un sujeto de prueba, que no se considera normal pero que no tiene diabetes o prediabetes, tiene un estado de baja sensibilidad a la insulina; y si un sujeto de prueba, que no se considera normal pero que no tiene baja sensibilidad a la insulina, tiene hiperinsulinemia.

Basándose en un valor de medición de un índice diferente (glucemia), el sujeto de prueba se diagnostica como con "prediabetes" o bien cuando la glucemia en ayunas es de 100 mg/dl a menos de 126 mg/dl, preferiblemente de 110 mg/dl a menos de 126 mg/dl, o bien cuando el valor a las 2 horas de la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT de 75 g) es de 140 mg/dl a 199 mg/dl. Además, el sujeto de prueba se diagnostica como "diabético" o bien cuando (1) la glucemia en ayunas es de 126 mg/dl o más, cuando (2) el valor a las 2 horas de la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT de 75 g) es de 200 mg/dl o más, cuando (3) la glucemia aleatoria es de 200 mg/dl o más, o cuando (4) la hemoglobina A1c es del 6,5% o más.

#### (IV) Método para medir la razón de combustión azúcar/ácido graso

La razón de combustión de metabolismo de azúcares/lípidos en el cuerpo puede evaluarse a partir del cociente respiratorio que se calcula generalmente a partir de la cantidad de oxígeno y la cantidad de dióxido de carbono excretados en el aire espirado según la fórmula a continuación.

Cociente respiratorio (RQ) = cantidad de excreción de dióxido de carbono por tiempo unitario/cantidad de ingesta de oxígeno por tiempo unitario

Más específicamente, el cociente respiratorio tras la ingesta del sacárido es RQ=1,0, y el cociente respiratorio tras la ingesta del lípido es RQ=0,7. Usando estos valores de cociente respiratorio, es posible determinar qué azúcares y lípidos se usan en el cuerpo en qué proporción (razón de combustión).

La presente invención se refiere a una composición para su uso en un método para medir la razón de combustión azúcar/ácido graso (método de medición de la razón de combustión azúcar/ácido graso), que es un método para medir una razón de combustión entre azúcar y ácido graso (razón de combustión azúcar/ácido graso) en el cuerpo. Este método es útil debido a que el método es capaz de determinar una razón de combustión azúcar/ácido graso deseada de un sujeto de prueba en lugar del cociente respiratorio conocido hasta ahora, y con mayor precisión que la del cociente respiratorio conocido.

El método para medir la razón de combustión azúcar/ácido graso puede clasificarse aproximadamente en los siguientes tres métodos.

(1) Un método para determinar la razón  $AUC_i[\text{glucosa con C marcado}]/AUC_i[\text{ácido graso con C marcado}]$ , que es una razón de  $AUC(t)$  de  $\Delta\text{-C marcado}$  (‰) en un sujeto de prueba obtenida en una prueba del aliento después de la administración de glucosa con C marcado con respecto a  $AUC(t)$  de  $\Delta\text{-C marcado}$  (‰) del sujeto de prueba obtenida en una prueba del aliento después de la administración de un ácido graso con C marcado (t representa un tiempo de recogida de aire espirado, es decir, un tiempo desde la administración de ácido graso con C marcado hasta la recogida del aire espirado; lo mismo a continuación en el presente documento).

(2) Un método para determinar la razón  $[1/\text{glucemia}]/AUC_i[\text{ácido graso con C marcado}]$ , que es una razón de la inversa de la glucemia ( $1/\text{glucemia}$ ) de un sujeto de prueba con respecto a la  $AUC(t)$  de  $\Delta\text{-C marcado}$  (‰) del sujeto de prueba obtenida en una prueba del aliento después de la administración de un ácido graso con C marcado.

(3) Un método para determinar la razón  $[1/\text{glucemia}]/C_{\text{máx}}[\text{ácido graso con C marcado}]$ , que es una razón de la inversa de la glucemia ( $1/\text{glucemia}$ ) de un sujeto de prueba con respecto al valor máximo ( $C_i$ ) (t = de 1 a 30 min) de  $\Delta\text{-C marcado}$  (‰) del sujeto de prueba obtenida en una prueba del aliento después de la administración de un ácido

graso con C marcado.

Estos tres métodos se describen a continuación.

5 (1) Método para determinar "AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"

(1-1) Método para determinar AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]

10 En este método, AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] significa [un área bajo la curva Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t] (AUC<sub>t</sub>) obtenida en la prueba del aliento mencionada anteriormente con administración de un ácido graso con C marcado.

15 El "área bajo la curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t" (AUC<sub>t</sub>) puede obtenerse a partir de un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo de Δ-C marcado (‰) obtenidos mediante la prueba del aliento con administración de un ácido graso con C marcado. Más específicamente, el "área bajo la curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t" (AUC<sub>t</sub>) puede obtenerse calculando el área bajo la curva (AUC<sub>t</sub>) de un gráfico en el que la Δ<sup>13</sup>C (‰) obtenida mediante la prueba del aliento con administración de un ácido graso con C marcado se representa en el eje de ordenadas, y el intervalo de tiempo después de la administración de un ácido graso con C marcado (tiempo de recogida de aire espirado: t) (min) se representa en el eje de abscisas.

20 El ácido graso con C marcado, las formas de dosificación y los métodos de administración del ácido graso con C marcado, y el método de cálculo de Δ-C marcado (‰) son tal como se explicó anteriormente en (III); las descripciones anteriores también pueden aplicarse en el presente documento.

25 El tiempo de recogida de aire espirado (t) es un punto de tiempo arbitrario en el plazo de 1 a 60 minutos después de la administración de un ácido graso con C marcado, y puede seleccionarse cualquier punto de tiempo dentro de este intervalo. El tiempo de recogida de aire espirado (t) está preferiblemente en el plazo de 1 a 30 minutos, más preferiblemente en el plazo de 1 a 15 minutos, después de la administración de un ácido graso con C marcado.

30 (1-2) Método para determinar AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]

35 Además, en este método, AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado] significa [un área bajo la curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t] (AUC<sub>t</sub>) que se obtiene mediante una prueba del aliento con administración de glucosa con C marcado. El "área bajo la curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t" (AUC<sub>t</sub>) puede obtenerse a partir de un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo de Δ-C marcado (‰) obtenidos administrando glucosa con C marcado en lugar de ácido graso con C marcado en la prueba del aliento mencionada anteriormente. Más específicamente, el "área bajo la curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t" (AUC<sub>t</sub>) puede obtenerse calculando el área bajo la curva de un gráfico en el que la Δ<sup>13</sup>C (‰) obtenida mediante la prueba del aliento con administración de glucosa con C marcado se representa en el eje de ordenadas, y el intervalo de tiempo después de la administración de glucosa con C marcado (tiempo de recogida de aire espirado: t) (min) se representa en el eje de abscisas.

40 El tiempo de recogida de aire espirado (t) es un punto de tiempo arbitrario en el plazo de 1 a 120 minutos después de la administración de glucosa con C marcado, y puede seleccionarse cualquier punto de tiempo dentro de este intervalo. El tiempo de recogida de aire espirado (t) está preferiblemente en el plazo de 1 a 60 minutos, más preferiblemente en el plazo de 1 a 30 minutos, después de la administración de glucosa con C marcado. Sin embargo, para determinar "AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]," se usa el mismo tiempo de recogida de aire espirado (t) que el que se usa en el cálculo de AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado].

45 La glucosa con C marcado puede ser cualquier glucosa marcada con al menos un isótopo de C, en la que la glucosa se convierte en el cuerpo en gas de CO<sub>2</sub> marcado que se excreta en el aire espirado. La glucosa con C marcado tiene una característica tal que, después de administrarse a un sujeto de prueba, la glucosa con C marcado se metaboliza según la capacidad de metabolismo de la glucosa en el cuerpo y se excreta en el aire espirado en forma de dióxido de carbono que contiene el C marcado, lo que refleja el grado de capacidad de metabolismo de la glucosa del sujeto de prueba. No existe limitación particular en los isótopos usados en el marcaje de átomos de carbono de glucosa, y los ejemplos específicos incluyen <sup>13</sup>C y <sup>14</sup>C. Tales isótopos pueden ser radiactivos o no radiactivos; sin embargo, desde el punto de vista de la seguridad, son preferibles isótopos no radiactivos. Por ejemplo, es deseable <sup>13</sup>C para su uso como isótopo de este tipo.

50 La glucosa marcada con isótopos se marca de tal manera que al menos una parte del CO<sub>2</sub> formado a través de la ruta metabólica de la glucosa se marca con isótopos. Los ejemplos de dicha glucosa incluyen compuestos en los que el átomo de carbono en al menos una de la posición 1 o la posición 6, la posición 2 o la posición 5, y la posición 3 o la posición 4 de la glucosa se marca con un isótopo. Los ejemplos específicos incluyen glucosa marcada en 1-<sup>13</sup>C, glucosa marcada en 2-<sup>13</sup>C y glucosa marcada en 3-<sup>13</sup>C. Puede usarse glucosa en la que todos los átomos de carbono en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se marcan con isótopos. Son preferibles la glucosa en la que el átomo de

carbono en la posición 3 o la posición 4 se marca con isótopos (por ejemplo, glucosa marcada en 3-<sup>13</sup>C y glucosa marcada en 4-<sup>13</sup>C) y glucosa en la que todos los átomos de carbono en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se marcan con isótopos.

5 No existe limitación particular en el método para marcar compuestos tales como glucosa con isótopos tales como <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C, y puede emplearse una amplia variedad de métodos usados de manera habitual. Tales compuestos marcados con isótopos, particularmente la glucosa marcada con <sup>13</sup>C descrita en el ejemplo 2, están disponibles comercialmente como productos comerciales que pueden usarse de manera conveniente

10 En la prueba del aliento, una composición que contiene glucosa con C marcado puede administrarse como una muestra de prueba a un sujeto de prueba. No existe limitación particular en la composición de la presente invención en cuanto a su forma, componentes distintos de la glucosa con C marcado, proporción de cada componente, método de preparación de la composición, etc., siempre que la glucosa con C marcado se absorba en el cuerpo después de la administración, y se excrete en el aire espirado en forma de dióxido de carbono marcado después del metabolismo. Por ejemplo, la forma de la composición puede ser una forma de dosificación oral o una forma de dosificación intravenosa. Los ejemplos de formas de dosificación oral incluyen cualquier forma de dosificación oral, tal como disoluciones (incluyendo jarabe), suspensiones, emulsiones y líquidos similares; comprimidos (con y sin recubrimiento), comprimidos masticables, cápsulas, píldoras, pulvis (polvos), partículas finas, gránulos, y sólidos similares. Los ejemplos de las formas de dosificación intravenosas incluyen cualquier forma de dosificación intravenosa, tal como inyecciones y gotas (en forma de líquido, suspensión o emulsión). Las formas de dosificación oral son preferibles debido a que son métodos de medición no invasivos; sin embargo, desde el punto de vista de la obtención de una alta precisión de medición, son preferibles las formas de dosificación intravenosa. En este caso, cuando la composición de la presente invención se prepara en forma de líquido, suspensión o emulsión, por ejemplo, gotas o inyecciones, pueden usarse diversos portadores y/o aditivos adecuados para tales formas junto con agua purificada o agua para inyección. Los ejemplos de aditivos incluyen aditivos usados de manera habitual, tales como agentes de ajuste de la tonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, etc.), ajustadores del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etc.), tampones (por ejemplo, ácido bórico, monohidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, etc.), y espesantes (por ejemplo, polímeros de carboxivinilo, etc.).

20 La forma de la composición no se limita a una preparación farmacéutica, siempre que la composición contenga la glucosa con C marcado y no afecte de manera adversa los efectos de la presente invención. La glucosa con C marcado puede combinarse con cualquier producto alimenticio y formar un alimento sólido, un alimento fluido o un alimento líquido. La composición de la presente invención puede consistir sustancialmente sólo en la glucosa con C marcado, que es un principio activo; sin embargo, siempre que los efectos de la presente invención no se afecten de manera adversa, puede añadirse cualquier portador y/o aditivo farmacéuticamente aceptable que se usa generalmente en este campo como otros componentes según una forma farmacéutica (forma de dosificación). En este caso, no existe limitación particular en la cantidad de la glucosa con C marcado contenida como principio activo. Por ejemplo, la cantidad de la glucosa con C marcado está en el intervalo del 1 al 95% en peso basándose en el peso total (100% en peso) de la composición, y se controla de manera adecuada dentro de este intervalo.

45 La dosis de la glucosa con C marcado puede ajustarse de manera adecuada para cada caso; por ejemplo, la cantidad de la glucosa con C marcado por dosis, por ejemplo, está en el intervalo de 5 mg/cuerpo a 50 g/cuerpo, y preferiblemente de 10 mg/cuerpo a 25 g/cuerpo.

50 (1-3) "AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado]"

Una razón de combustión azúcar/ácido graso de un sujeto de prueba puede medirse a partir de la razón de AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado] con respecto a AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado] (AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado]) obtenida anteriormente.

55 Por ejemplo, en la comparación de la "AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado]" de un sujeto de prueba con la "AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado]" de un sujeto sano que tiene capacidad de metabolismo de la glucosa normal y capacidad del metabolismo de lípidos normal (capacidad de metabolismo de ácidos grasos), si "AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado]" del sujeto de prueba es menor, puede determinarse que la capacidad de metabolismo de la glucosa del sujeto de prueba se disminuye, o que la capacidad del metabolismo de lípidos (capacidad de metabolismo de ácidos grasos) del sujeto de prueba se aumenta.

60 La medición se describe más específicamente a continuación basándose en la figura 13 que muestra los resultados del ejemplo experimental 5 descrito más adelante.

65 La figura 13 del ejemplo experimental 5 muestra los resultados de la comparación entre una razón de AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado] con respecto a AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado] (AUC<sub>i</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>i</sub>[ácido graso con C marcado]) de un sujeto de prueba con diabetes animal (rata ZDF obesa) que tiene un trastorno metabólico de la glucosa (resistencia a la insulina) obtenida mediante el método anterior y una razón (AUC<sub>i</sub>[glucosa con C



marcado]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) de un sujeto sano animal (rata ZDF delgada) que tiene una capacidad de metabolismo de la glucosa normal (sensibilidad a la insulina) obtenida mediante el método anterior; la comparación se realizó en un estado de ayuno y un estado de alimentación.

5 Tal como se muestra en la figura 13, la razón "AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]" obtenida del sujeto de prueba con diabetes (rata ZDF obesa) era significativamente menor que la del sujeto sano (rata ZDF delgada) tanto en el estado de ayuno como en el estado de alimentación; la diferencia entre ellos es muy clara. Esto reveló que la capacidad de metabolismo de la glucosa (sensibilidad a la insulina) del sujeto de prueba con diabetes es menor que la del sujeto sano, o que la capacidad del metabolismo de lípidos (capacidad de metabolismo de ácidos grasos) del sujeto de prueba con diabetes se aumenta para compensar la disminución.

10 (2) Método para determinar "[1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"

15 (2-1) Método para determinar AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]

El método para determinar AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] es tal como se describió anteriormente; las descripciones anteriores del método también pueden aplicarse en el presente documento.

20 (2-2) Método para determinar [1/glucemia]

La glucemia de un sujeto de prueba puede determinarse según el método habitual. Más específicamente, la glucemia de un sujeto de prueba puede medirse mediante un dispositivo para el método del electrodo enzimático (sensor Life Check: Gunze Limited) usando glucosa deshidrogenasa (GDH).

25 [1/glucemia] puede obtenerse a partir de la inversa de la glucemia así obtenida anteriormente.

(2-3) "[1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"

30 Una razón de combustión azúcar/ácido graso de un sujeto de prueba puede medirse a partir de la razón de [1/glucemia] con respecto a AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] ([1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) obtenida anteriormente.

35 Por ejemplo, en la comparación de "[1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]" de un sujeto de prueba con "[1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]" de un sujeto sano que tiene capacidad de metabolismo de la glucosa normal (sensibilidad a la insulina) y capacidad del metabolismo de lípidos normal (capacidad de metabolismo de ácidos grasos), si "[1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]" del sujeto de prueba es menor, puede determinarse que la capacidad de metabolismo de la glucosa (sensibilidad a la insulina) del sujeto de prueba se disminuye, o que la capacidad del metabolismo de lípidos (capacidad de metabolismo de ácidos grasos) del sujeto de prueba se aumenta.

40 La medición se describe más específicamente a continuación basándose en la figura 14 que muestra los resultados del ejemplo experimental 5 descrito más adelante.

45 La figura 14 del ejemplo experimental 5 muestra los resultados de la comparación entre una razón de [1/glucemia] con respecto a AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] ([1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) de un sujeto de prueba animal (rata ZDF obesa) que tiene un trastorno metabólico de la glucosa (resistencia a la insulina) obtenida mediante el método anterior y una razón ([1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) de un sujeto sano animal (rata ZDF delgada) que tiene capacidad de metabolismo de la glucosa normal (sensibilidad a la insulina) obtenida mediante el método anterior; la comparación se realizó en un estado de ayuno y un estado de alimentación.

50 Tal como se muestra en la figura 13, la razón "[1/glucemia]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]" obtenida del sujeto de prueba con diabetes (rata ZDF obesa) era significativamente menor que la del sujeto sano (rata ZDF delgada) tanto en el estado de ayuno como en el estado de alimentación; la diferencia entre ellos es muy clara. Esto reveló que la capacidad de metabolismo de la glucosa (sensibilidad a la insulina) del sujeto de prueba con diabetes es menor que la del sujeto sano, o que la capacidad del metabolismo de lípidos (capacidad de metabolismo de ácidos grasos) del sujeto de prueba con diabetes se aumenta para compensar la disminución.

55 (3) Método para determinar "[1/glucemia]/C<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado](t=1-30 min)"

60 (3-1) Método para determinar [1/glucemia]

El método para determinar [1/glucemia] es tal como se describió anteriormente; las descripciones anteriores del método también pueden aplicarse en el presente documento.

65 (3-2) Método para determinar C<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado](t=1-30 min)

En este método,  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min) significa el valor ( $C_i$ ) de  $\Delta$ -C marcado (‰) en un tiempo de recogida de aire espirado ( $t$ ) arbitrario, que está en el plazo de 1 a 30 minutos a partir de la administración de un ácido graso con C marcado y se obtiene mediante la prueba del aliento mencionada anteriormente con administración de un ácido graso con C marcado. El tiempo de recogida de aire espirado ( $t$ ) no está limitado, y puede ser cualquier punto de tiempo en la medida en que sea al menos un punto de tiempo entre 1 y 30 minutos después de la administración de un ácido graso con C marcado. El tiempo de recogida de aire espirado ( $t$ ) es preferiblemente al menos un punto de tiempo en el plazo de 1 a 15 minutos, más preferiblemente en el plazo de 1 a 10 minutos después de la administración de glucosa con C marcado. El  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min) incluye el valor máximo ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de  $\Delta$ -C marcado (‰).

Puede determinarse  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min) calculando  $\Delta$ -C marcado (‰) usando aire espirado obtenido en el plazo de 1 a 30 minutos, preferiblemente de 1 a 15 minutos, más preferiblemente de 1 a 10 minutos a partir de la administración de un ácido graso con C marcado en la prueba del aliento con administración de un ácido graso con C marcado de la presente invención.

Además, para determinar el valor máximo ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de  $\Delta$ -C marcado (‰) como una realización de  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min), puede usarse un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo de  $\Delta$ -C marcado (‰) obtenido en la prueba del aliento con administración de un ácido graso con C marcado. Más específicamente, basándose en un gráfico en el que la  $\Delta^{13}C$  (‰) obtenida mediante la prueba del aliento con administración de un ácido graso con C marcado se representa en el eje de ordenadas, y el intervalo de tiempo después de la administración de un ácido graso con C marcado (tiempo de recogida de aire espirado:  $t$ , en el que  $t=1-30$  (min)) se representa en el eje de abscisas, el pico del valor máximo de  $\Delta^{13}C$  (‰) se determina como  $C_{m\acute{a}x}$ [ácido graso con C marcado].

El ácido graso con C marcado, las formas de dosificación y los métodos de administración del ácido graso con C marcado, y el método de cálculo de  $\Delta$ -C marcado (‰) son tal como se explicaron anteriormente en (III); las descripciones anteriores también pueden aplicarse en el presente documento.

### (3-3) "[1/glucemia]/ $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$ min)"

Una razón de combustión azúcar/ácido graso de un sujeto de prueba puede determinarse a partir de la razón de [1/glucemia] con respecto a  $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min) ([1/glucemia]/ $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min)) obtenida anteriormente.

Por ejemplo, en la comparación de "[1/glucemia]/ $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min)" de un sujeto de prueba con "[1/glucemia]/ $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min)" de un sujeto sano que tiene capacidad de metabolismo de la glucosa normal (sensibilidad a la insulina) y capacidad del metabolismo de lípidos normal (capacidad de metabolismo de ácidos grasos), si "[1/glucemia]/ $C_i$ [ácido graso con C marcado]( $t=1-30$  min)" del sujeto de prueba es inferior, puede determinarse que la capacidad de metabolismo de la glucosa (sensibilidad a la insulina) del sujeto de prueba se disminuye, o que la capacidad del metabolismo de lípidos (capacidad de metabolismo de ácidos grasos) del sujeto de prueba se aumenta.

### **Ejemplos**

Los ejemplos y ejemplos experimentales se describen a continuación para clarificar adicionalmente la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos, etc.

#### Ejemplo experimental 1

##### (1) Preparación de disolución de $1-^{13}C$ -palmitato de sodio

Se disolvió  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio en etanol acuoso a aproximadamente  $80^{\circ}C$  a una concentración de  $500 \mu\text{mol/ml}$ . Se añadió la disolución resultante a BSA al 20% que se había calentado hasta  $37^{\circ}C$  y se agitó y se disolvió de manera que la concentración de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio era de  $20 \mu\text{mol/2 ml}$ , preparando de ese modo una disolución de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio (el mismo procedimiento se usó en los ejemplos experimentales a continuación).

##### (2) Método del experimento

Se usaron ratas (macho, rata Zucker) como animales de experimentación. Se dividieron las ratas que se habían sometido a ayuno desde el día previo a la prueba en dos grupos: grupo de administración oral y grupo de administración intravenosa (cada grupo,  $n=3$ ), y se administró la disolución de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio ( $20 \mu\text{mol/2 ml}$ ) preparada en (1) por vía oral y por vía intravenosa a una dosificación de  $2 \text{ ml/kg}$ . Se recogió el aire espirado en cada punto de tiempo ( $t$  minutos) desde un punto de tiempo antes de la administración (0 minutos) hasta un punto de tiempo 180 minutos después de la administración, y se determinó  $\Delta^{13}C$  (‰) a partir de la concentración

de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado usando un espectrómetro de masas de análisis de aire espirado (ABCA: producto de SerCon).

5 Se determinó el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) midiendo una razón de concentración  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  en el aire espirado (valor de  $\delta^{13}\text{C}$ ) en cada punto de tiempo (t minutos) desde un punto de tiempo antes de la administración de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (0 minutos) hasta un punto de tiempo después de la administración, y calculando el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) a partir de la diferencia entre el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}_t$ ) en cada punto (t) y el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  antes de la administración ( $\delta^{13}\text{C}_0$ ) ( $\delta^{13}\text{C}_t - \delta^{13}\text{C}_0$ ) (el mismo cálculo se usó en los ejemplos experimentales a continuación).

### 10 (3) Resultados del experimento

La figura 1 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado medida después de la administración oral (v.o.) o la administración intravenosa (i.v.) de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio.

20 Tal como se muestra en la figura 1, en el grupo de administración oral (-○-), el valor de medición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) tenía una pequeña variación entre los respectivos tiempos de medición; sin embargo, en el grupo de administración intravenosa (-■-), se observó un pico de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en un punto de tiempo relativamente temprano (en el plazo de 10 minutos después de la administración).

25 Los resultados revelaron que el  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio se excreta en el aire espirado como  $^{13}\text{CO}_2$ . Los resultados también revelaron que la combustión de grasas en condiciones de ayuno puede determinarse administrando por vía intravenosa una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio, es decir, no administrando por vía oral una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio.

Ejemplo experimental 2: evaluación de la resistencia a la insulina usando diversos compuestos marcados con  $^{13}\text{C}$  (ejemplo de referencia)

### 30 (1) Preparación de diversas disoluciones que contienen compuestos marcados con $^{13}\text{C}$

#### (a) Disolución de $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosa

35 Se disolvió  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosa en solución salina fisiológica a una concentración de  $50\ \mu\text{mol/ml}$ , preparando de ese modo una disolución de  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosa.

#### (b) Disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato de sodio

40 Se disolvió  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato de sodio en solución salina fisiológica a una concentración de  $50\ \mu\text{mol/ml}$ , preparando de ese modo una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato de sodio.

#### (c) Disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio

45 Se disolvió  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio en solución salina fisiológica a una concentración de  $50\ \mu\text{mol/ml}$ , preparando de ese modo una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio.

#### (d) Disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico

50 Se disolvió  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico en etanol acuoso a aproximadamente  $80^\circ\text{C}$  a una concentración de  $500\ \mu\text{mol/ml}$ . Se añadió la disolución resultante a BSA al 20% que se había calentado hasta  $37^\circ\text{C}$ , y se agitó y se disolvió de manera que la concentración de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico era de  $20\ \mu\text{mol}/2\ \text{ml}$ , preparando de ese modo una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico.

#### (e) Disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio

55 Usando el mismo método que en el ejemplo experimental 1, se disolvió  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio en etanol acuoso a una concentración de  $20\ \mu\text{mol}/2\ \text{ml}$ , preparando de ese modo una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio.

#### (f) Disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido oleico

60 Se colocaron en un tubo de plástico  $0,5\ \text{g}$  de ácido oleico,  $0,5\ \text{g}$  de aceite de soja y  $0,12\ \text{g}$  de lecitina de yema de huevo purificada. Tras la disolución, se añadió una disolución de glicerina ( $24,7\ \text{mg/ml}$ ) en una cantidad de  $0,5\ \text{ml}$  en el momento hasta que se emulsionó la mezcla. Tras obtener una emulsión de aproximadamente  $9\ \text{ml}$ , se filtró la emulsión con un filtro de  $1,2\ \mu\text{m}$ , y se diluyó con agua en un tubo graduado hasta un total de  $10\ \text{ml}$ .

65

Se midió el contenido en ácido oleico del líquido, y se diluyó con una disolución de glicerina (22 mg/ml), obteniendo de ese modo una disolución de 5,65 mg/ml (20  $\mu$ mol/ml).

## (2) Evaluación de la resistencia a la insulina

5

### (2-1) Método del experimento

Se usaron los animales (A) y (B) a continuación como animales de experimentación.

10 (A) Rata ZDF (macho, delgada (18 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno fueron de 73 mg/dl y 1,0 ng/ml, respectivamente, la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación fueron de 98 mg/dl y 3,9 ng/ml, respectivamente), y obesa (18 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno fueron de 369 mg/dl y 1,7 ng/ml, respectivamente, y la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación fueron de 474 mg/dl y 13,6 ng/ml, respectivamente)).

15

(B) Rata ZDF (macho, delgada (13 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno fueron de 63,8 mg/dl y 0,21 ng/ml, respectivamente, y la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación fueron de 111,5 mg/dl y 2,26 ng/ml, respectivamente), y obesa (13 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno fueron de 240,3 mg/dl y 1,97 ng/ml, respectivamente, y la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación fueron de 595,8 mg/dl y 2,77 ng/ml, respectivamente)).

20

La rata ZDF obesa es un sujeto de prueba animal resistente a la insulina que tiene una baja sensibilidad a la insulina, y desarrolla un estado patológico similar a la diabetes tipo II de adultos humanos y las complicaciones de la diabetes. En cambio, la rata ZDF delgada es un sujeto animal sano que tiene glucemia normal y sensibilidad a la insulina normal. Se dividieron las ratas delgadas y obesas (A) en un grupo en ayunas en las que las ratas se sometieron a ayuno desde el día previo, y un grupo con alimentación. Cada grupo se dividió adicionalmente en 5 grupos, y se administró por vía intravenosa (a) disolución de U-<sup>13</sup>C-glucosa, (b) disolución de 1-<sup>13</sup>C-acetato de sodio, (c) disolución de 1-<sup>13</sup>C-octanoato de sodio, (f) disolución de 1-<sup>13</sup>C-ácido oleico (todas a 1 ml/kg cada una), (d) disolución de 1-<sup>13</sup>C-ácido láurico o (e) disolución de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio (2 ml/kg cada una) preparadas anteriormente. Para (a) a (e), se recogió el aire espirado de las ratas (A), y para (f), se recogió el aire espirado de las ratas (B) (cada grupo, n=3).

25

30

Se obtuvo el aire espirado en puntos de tiempo (t minutos) desde un punto de tiempo antes de la administración de disoluciones (a) a (f) (0 minutos) hasta un punto de tiempo 60 minutos después de la administración, y se determinó  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) a partir de la concentración de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> en el aire espirado usando un espectrómetro de masas de análisis de aire espirado (ABCA: producto de SerCon).

35

### (2-2) Resultados del experimento

#### (2-2-1) Administración de una disolución de U-<sup>13</sup>C-glucosa

40

La figura 2 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de U-<sup>13</sup>C-glucosa a ratas ZDF (delgadas y obesas). La figura 2(A) muestra los resultados de ratas delgadas, y la figura 2(B) muestra los resultados de ratas obesas. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de U-<sup>13</sup>C-glucosa.

45

Tal como se muestra en los resultados de la figura 2, debido a que las ratas delgadas son sujetos sanos, usan los sacáridos en el pienso como fuente de energía en condiciones de alimentación. Por tanto, el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) es mayor que el de en condiciones en ayunas. En cambio, debido a que las ratas obesas son sujetos de prueba resistentes a la insulina y no pueden usar sacárido por razones genéticas, existió una pequeña diferencia en la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) entre el estado de ayuno y el estado de alimentación, es decir, la transición fue casi la misma.

50

#### (2-2-2) Administración de una disolución de 1-<sup>13</sup>C-acetato de sodio

55

La figura 3 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de 1-<sup>13</sup>C-acetato de sodio a ratas ZDF (delgadas y obesas). La figura 3(A) muestra los resultados de ratas delgadas y la figura 3(B) muestra los resultados de ratas obesas. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de U-<sup>13</sup>C-acetato de sodio. Tal como se muestra en los resultados de la figura 3, existió una pequeña diferencia entre los resultados de ratas delgadas y los resultados de ratas obesas, es decir, la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) fue casi la misma en cada grupo.

60

#### (2-2-3) Administración de una disolución de 1-<sup>13</sup>C-octanoato de sodio

65

La figura 4 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio a ratas ZDF (delgadas y obesas). La figura 4(A) muestra los resultados de ratas delgadas, y la figura 4(B) muestra los resultados de ratas obesas. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -octanoato de sodio. Tal como se muestra en los resultados de la figura 4, existe una pequeña diferencia entre los resultados de ratas delgadas y los resultados de ratas obesas, es decir, la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) fue casi la misma en cada grupo.

#### (2-2-4) Administración de una disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico

La figura 5 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico a ratas ZDF (delgadas y obesas). En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico. La figura 5(A) muestra los resultados de ratas delgadas, y la figura 5(B) muestra los resultados de ratas obesas. Tal como se muestra en la figura 5, aunque la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) fue diferente entre el grupo en ayunas y el grupo con alimentación de los sujetos sanos (delgados) después de la administración intravenosa de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido láurico, en particular, durante un periodo hasta 10 minutos después de la administración intravenosa, no existió diferencia entre el grupo en ayunas y el grupo con alimentación de sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos). En la comparación entre sujetos sanos (delgados) y sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos), su diferencia fue particularmente significativa en la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) en el grupo con alimentación, en particular, durante un periodo de hasta 15 minutos después de la administración intravenosa, que muestra una tendencia que  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) de los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) fue superior que la de los sujetos sanos (delgados).

#### (2-2-5) Disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio

La figura 6 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a ratas ZDF (delgadas y obesas). La figura 6(A) muestra los resultados de ratas delgadas, y la figura 6(B) muestra los resultados de ratas obesas. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio.

#### (2-2-6) Administración de una disolución de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido oleico

La figura 7 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido oleico a ratas ZDF (delgadas y obesas). La figura 7(A) muestra los resultados de ratas delgadas, y la figura 7(B) muestra los resultados de ratas obesas. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido oleico.

Tal como se muestra en la figura 6, con respecto a la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) después de la administración intravenosa de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio, los valores de  $^{13}\text{C}$  (‰) de los sujetos sanos (delgados) y los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) fueron ambos mayores en el estado de ayuno (hambre) que en el estado de alimentación. Por tanto, se reveló que existe una diferencia en el uso de la energía en el cuerpo entre el estado de alimentación y el estado de ayuno. Una comparación entre sujetos sanos (delgados) y sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) reveló que su diferencia era particularmente significativa en la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) en el grupo con alimentación, en particular, durante un periodo de hasta 15 minutos después de la administración intravenosa, que muestra una tendencia que  $^{13}\text{C}$  (‰) de los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) era mayor que la de los sujetos sanos (delgados).

Tal como se muestra en la figura 7, con respecto a la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) después de la administración intravenosa de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido oleico, los valores de  $^{13}\text{C}$  (‰) de los sujetos sanos (delgados) y los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) fueron ambos mayores en el estado de ayuno (hambre) que en el estado de alimentación. Por tanto, se reveló que existía una diferencia en el uso de energía en el cuerpo entre el estado de alimentación y el estado de ayuno. En la comparación entre los sujetos sanos (delgados) y los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos), su diferencia fue particularmente significativa en la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) en el grupo con alimentación, en particular, durante un periodo de hasta 30 minutos después de la administración intravenosa, que muestra una tendencia que  $^{13}\text{C}$  (‰) de los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) era mayor que la de los sujetos sanos (delgados).

Además, la diferencia en el uso de la energía en el cuerpo entre el estado de ayuno y el estado de alimentación es más clara que el caso de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa en (2-2-1). Por tanto, el cambio de fuente de energía puede monitorizarse de una manera más precisa. Estos resultados revelaron que administrando por vía intravenosa  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido palmítico o una sal del mismo, o  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido oleico o una sal del mismo en un estado de ayuno y un estado de alimentación, preferiblemente en un estado de alimentación, y realizando una prueba del

aliento, es posible determinar la presencia o ausencia de resistencia a la insulina.

Ejemplo experimental 3: evaluación de la resistencia a la insulina usando una disolución de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio (ejemplo de referencia)

5 (1) Método del experimento

Se usaron como animales de experimentación ratas LETO (macho) (25 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno: 80 mg/dl y 1,4 ng/ml; la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación: 105 mg/dl y 3,2 ng/ml) y ratas OLETF (macho) (25 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno: 101 mg/dl y 1,1 ng/ml; la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación: 198 mg/dl y 14,4 ng/ml). Las ratas OLETF son sujetos de prueba animal con diabetes tipo II con obesidad o/y esteatosis hepática, y las ratas LETO sirven como un control de las mismas (sujetos sanos). Las ratas OLETF tenían glucemia normal en condiciones de ayuno; sin embargo, tenían hiperinsulinemia e hiperglucemia en condiciones de alimentación. Esto muestra que están en un estado de diabetes oculta. Los resultados revelaron que las ratas OLETF son ratas con hiperinsulinemia que tienen baja sensibilidad a la insulina, y que por tanto, se consideran como sujetos de prueba animal resistentes a la insulina.

20 Estas ratas se dividieron en un grupo en ayunas en el que las ratas se sometieron a ayuno desde el día previo, y un grupo con alimentación. Se administró por vía intravenosa una disolución de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio preparada en el ejemplo experimental 2 (2 ml/kg) a cada grupo (cada grupo, n=3). Se recogió el aire espirado en puntos de tiempo (t minutos) desde un punto de tiempo antes de la administración de una disolución de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio (0 minutos) hasta un punto de tiempo 60 minutos después de la administración, y se determinó  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) a partir de la concentración de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> en el aire espirado usando un espectrómetro de masas de análisis de aire espirado (ABCA: producto de SerCon).

(2) Resultados del experimento

30 La figura 8 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio a cada grupo (grupo en ayunas y grupo con alimentación) de ratas LETO como sujetos sanos y ratas OLETF como sujetos de prueba resistentes a la insulina. (A) indica los resultados de ratas LETO, y (B) indica los resultados de ratas OLETF. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio.

35 Tal como se muestra en la figura 8, con respecto a la transición de <sup>13</sup>C (‰) después de la administración intravenosa de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio, los valores de <sup>13</sup>C (‰) de ratas LETO y ratas OLETF fueron ambos mayores en el estado de ayuno (hambre) que, en el estado de alimentación, como en los resultados del ejemplo experimental 2 (2) (2-2-5). Por tanto, se reveló que existe una diferencia en el uso de la energía en el cuerpo entre el estado de alimentación y el estado de ayuno. Una comparación entre los sujetos sanos (LETO) y los sujetos de prueba resistentes a la insulina (OLETF) que tenían hepatopatía reveló que su diferencia fue significativa en la transición de cualquiera de <sup>13</sup>C (‰) en el grupo en ayunas y el grupo con alimentación, en particular, durante un periodo de hasta 15 minutos después de la administración intravenosa, que muestra una tendencia que <sup>13</sup>C (‰) de los sujetos de prueba resistentes a la insulina (OLETF) que tenían hepatopatía fue mayor que la de los sujetos sanos (LETO).

45 Los resultados demostraron que la prueba del aliento usando 1-<sup>13</sup>C-ácido palmítico hace posible monitorizar de manera sensible las resistencias a la insulina de no sólo sujetos de prueba resistentes a la insulina que han desarrollado diabetes, sino también de sujetos de prueba que tienen diabetes oculta acompañada por hepatopatía.

50 Las figuras 9(A) y 9(B) muestran respectivamente las transiciones de <sup>13</sup>C (‰) después de la administración intravenosa de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio a ratas ZDF (macho, delgadas y obesas) en un estado de ayuno y un estado de alimentación. Las figuras 10(A) y 10(B) muestran respectivamente las transiciones de <sup>13</sup>C (‰) después de la administración intravenosa de 1-<sup>13</sup>C-palmitato de sodio a ratas LETO como sujeto sano y ratas OLETF como sujeto de prueba resistente a la insulina que tenían hepatopatía en un estado de ayuno y un estado de alimentación. Tal como se muestra en las figuras 9(A) y 10(A), aunque la diferencia en la capacidad de metabolismo de la glucosa (sensibilidad a la insulina) puede determinarse entre los sujetos sanos y los sujetos de prueba resistentes a la insulina que tenían hepatopatía también en el estado de ayuno, su diferencia puede determinarse basándose en una mayor diferencia adicional realizando la medición en un estado de alimentación, tal como se muestra en las figuras 9(B) y 10(B).

60 Ejemplo experimental 4: evaluación de hiperinsulinemia no acompañada por resistencia a la insulina (hiperinsulinemia no resistente a la insulina) (ejemplo de referencia)

(1) Método del experimento

65 Como animales en una fase de preaparición de resistencia a la insulina (baja sensibilidad a la insulina), se usaron

ratas OLETF (11 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno: 104 mg/dl y 0,6 ng/ml; la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación: 124 mg/dl y 2,7 ng/ml), y ratas ZDF obesas (11 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno: 91 mg/dl y 3,4 ng/ml; la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación: 116 mg/dl y 19,0 ng/ml). Además, como el control (sujetos sanos), se usaron ratas LETO (11 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno: 57 mg/dl y 0,3 ng/ml; la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación: 98 mg/dl y 1,4 ng/ml) y ratas ZDF delgadas (11 semanas, la glucemia y el valor de insulina en una condición de ayuno: 72 mg/dl y 0,3 ng/ml; la glucemia y el valor de insulina en una condición de alimentación: 113 mg/dl y 1,7 ng/ml). Las glucemias de estos animales en una fase de preparación de resistencia a la insulina (ratas OLETF y ratas ZDF obesas) estuvieron dentro de un intervalo normal; sin embargo, los animales tenían hiperinsulinemia. Por tanto, estos animales se denominan sujetos de prueba que tienen hiperinsulinemia no acompañada por resistencia a la insulina, simplemente como "sujetos de prueba con hiperinsulinemia no resistentes a la insulina".

Estas ratas se dividieron en un grupo en ayunas en el que las ratas se sometieron a ayuno desde el día previo, y un grupo con alimentación. Se administró por vía intravenosa una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio preparada en el ejemplo experimental 2 (2 ml/kg) a cada grupo (cada grupo, n=3). Se recogió el aire espirado en puntos de tiempo (t minutos) desde un punto de tiempo antes de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (0 minutos) hasta un punto de tiempo 30 minutos después de la administración, y se determinó  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) a partir de la concentración de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado usando un espectrómetro de masas de análisis de aire espirado (ABCA: producto de SerCon).

## (2) Resultados del experimento

La figura 11 muestra la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado después de la administración intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio a cada grupo de ratas ZDF (macho, delgadas y obesas) (grupo con alimentación, grupo en ayunas). La figura 11 (A) muestra los resultados del grupo con alimentación y la figura 11(B) muestra los resultados del grupo en ayunas. En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio.

La figura 12 muestra las transiciones respectivas de  $^{13}\text{C}$  (‰) de ratas LETO y ratas OLETF después de la administración intravenosa de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio en un estado de alimentación y un estado de ayuno. La figura 12(A) muestra los resultados del grupo con alimentación y la figura 12(B) muestra los resultados del grupo en ayunas.

Tal como se muestra en las figuras 11(B) y 12(B), en la fase de preparación de resistencia a la insulina, se observó una pequeña diferencia en la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) entre el sujeto sano y el sujeto de prueba con hiperinsulinemia no resistente a la insulina en el estado de ayuno. Sin embargo, tal como se muestra en las figuras 11(A) y 12(A), se confirmó que el valor de  $^{13}\text{C}$  (‰) del sujeto de prueba con hiperinsulinemia no resistente a la insulina es significativamente menor que el del sujeto sano en el estado de alimentación. Este patrón es opuesto al patrón mostrado en el ejemplo experimental 2 con respecto al sujeto de prueba resistente a la insulina que ha desarrollado diabetes, y el patrón mostrado en el ejemplo experimental 3 con respecto al sujeto de prueba resistente a la insulina con diabetes oculta acompañada por hepatopatía (el patrón en el que la transición de  $^{13}\text{C}$  (‰) después de la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio es significativamente superior en el sujeto de prueba resistente a la insulina que en un sujeto sano) (figuras 7 a 10). Esto reveló que el metabolismo de ácidos grasos de los pacientes con hiperinsulinemia no resistentes a la insulina se disminuyó, al contrario que los pacientes resistentes a la insulina. Esto reveló que la presencia o ausencia de resistencia a la insulina en pacientes con hiperinsulinemia puede determinarse usando, como índice, la presencia o la ausencia de aumento o disminución en el metabolismo de ácidos grasos. Más específicamente, cuando el metabolismo de ácidos grasos en un paciente con hiperinsulinemia se determina que es mayor que el de un sujeto sano en una prueba del aliento usando un ácido graso con C marcado, el paciente con hiperinsulinemia se determina que tiene baja sensibilidad a la insulina (está presente la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia resistente a la insulina); en cambio, cuando el metabolismo de ácidos grasos en un paciente con hiperinsulinemia es menor que el de un sujeto sano en la misma prueba del aliento, se determina que la sensibilidad a la insulina del paciente con hiperinsulinemia no se disminuye (sin resistencia a la insulina, hiperinsulinemia no resistente a la insulina).

### Ejemplo experimental 5: evaluación de cociente respiratorio

Como animales de experimentación, se dividieron ratas (macho, ratas ZDF, delgadas y obesas) en dos grupos (grupo en ayunas y grupo de administración oral). El grupo en ayunas se sometió a ayuno desde el día previo al experimento. El grupo de administración oral se colocó en una cámara de análisis de aire espirado; que, después de 40 minutos, recibieron glucosa disuelta en agua (2 g/4 ml) mediante administración oral a una dosis de 4 ml/kg (n=1).

Se calculó el cociente respiratorio a partir de la cantidad de oxígeno y la cantidad de dióxido de carbono excretada en el aire espirado en cada grupo según la fórmula a continuación usando un espectrómetro de masas de análisis de biogás (ARCO-2000: Arco System Inc.).

Cociente respiratorio (RQ) = cantidad de excreción de dióxido de carbono por tiempo unitario/cantidad de ingesta de oxígeno por tiempo unitario

5 El cociente respiratorio del sacárido es  $RQ=1,0$ , y el cociente respiratorio del lípido es  $RQ=0,7$ . Por tanto, basándose en el cociente respiratorio obtenido mediante la fórmula anterior, es posible medir qué azúcar y lípido se usan en el cuerpo en qué proporción.

La figura 13 muestra el valor promedio  $\pm$ DE del cociente respiratorio medido para ratas ZDF (delgadas y obesas).

10 Los resultados revelaron que los sujetos sanos (delgados) usan sacáridos como una fuente de energía en el estado de alimentación, mientras que los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) que han desarrollado diabetes no usan sacáridos. Los resultados también muestran que existe una pequeña diferencia entre estos dos grupos en el estado de ayuno.

15 Ejemplo experimental 6: razón de combustión azúcar/ácido graso

Se calculó la razón de combustión azúcar/ácido graso usando los resultados de (a) la administración de una disolución de  $U-^{13}C$ -glucosa y los resultados de (e) la administración de una disolución de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio obtenidos en el ejemplo experimental 2.

(1) Razón de combustión de sacárido/ácido graso (A)

25 La figura 14 muestra una comparación entre un estado de ayuno y un estado de alimentación con respecto a una razón ( $AUC[^{13}C\text{-glucosa}]/AUC[1-^{13}C\text{-palmitato de sodio}]$ ) de AUC (120 minutos) de  $\Delta^{13}C$  (‰) obtenida mediante (a) la administración de una disolución de  $U-^{13}C$ -glucosa (estado de ayuno, estado de alimentación) con respecto a AUC (60 minutos) de  $\Delta^{13}C$  (‰) obtenida mediante (e) la administración de una disolución de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio (estado de ayuno, estado de alimentación) obtenida en el ejemplo experimental 2 usando ratas ZDF (delgadas y obesas). Esta razón ( $AUC[^{13}C\text{-glucosa}]/AUC[1-^{13}C\text{-palmitato de sodio}]$ ) representa una razón de combustión azúcar/ácido graso.

Debido a que la  $U-^{13}C$ -glucosa tiene 6 carbonos, se usó un valor de  $1/6$  AUC120 minutos. Debido a que la cantidad de administración de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio era de  $20 \mu\text{mol/kg}$ , se multiplicó el valor de AUC60 minutos por 2,5 para ser coherente con la cantidad de administración de  $50 \mu\text{mol/kg}$  de  $U-^{13}C$ -glucosa.

35 Tal como se muestra en la figura 14, para el cociente respiratorio (RQ), la diferencia entre los sujetos sanos (delgados) y los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) que han desarrollado diabetes no era clara en el estado de ayuno. Esto revela que el cociente respiratorio (RQ) es incapaz de determinar de manera precisa qué sacárido y ácido graso se usa en el sujeto de prueba como la fuente de energía en el estado de ayuno. En cambio, según la " $AUC[U-^{13}C\text{-glucosa}]/AUC[1-^{13}C\text{-ácido graso}]$ " calculada a partir de los resultados de la prueba del aliento usando glucosa con C marcado y la prueba del aliento usando ácido graso con C marcado, tal como se muestra en la figura 14, la diferencia entre los sujetos sanos (delgados) y los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) que han desarrollado diabetes es clara tanto en el estado de ayuno como en el estado de alimentación. Esto revela que es posible, tanto en el estado de ayuno como en el estado de alimentación, medir de manera precisa qué sacárido y qué ácido graso se usa como la fuente de energía en el sujeto de prueba. Más específicamente, el método anterior hace posible medir qué sacárido y qué ácido graso se usa como la fuente de energía, en lugar de y de manera más sensible que el cociente respiratorio.

45 Además, tal como se muestra en la figura 14, la diferencia en " $AUC[U-^{13}C\text{-glucosa}]/AUC[1-^{13}C\text{-ácido graso}]$ " de los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) que han desarrollado diabetes entre el estado de ayuno y el estado de alimentación es significativamente más pequeña que la de los sujetos sanos (delgados). Por tanto, midiendo la diferencia en " $AUC[U-^{13}C\text{-glucosa}]/AUC[1-^{13}C\text{-ácido graso}]$ " de un sujeto de prueba entre el estado de ayuno y el estado de alimentación, es posible medir la disminución en la sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina) del sujeto de prueba con mayor precisión.

55 (2) Razón de combustión de sacárido/ácido graso (B)

La figura 15 muestra una comparación entre un estado de ayuno y un estado de alimentación con respecto a una razón ( $[1/\text{glucemia}]/AUC[1-^{13}C\text{-palmitato de sodio}]$ ) de la inversa de la glucemia (estado de ayuno, estado de alimentación) con respecto a AUC (60 minutos) de  $\Delta^{13}C$  (‰) obtenida mediante (e) la administración de la disolución de  $1-^{13}C$ -palmitato de sodio (estado de ayuno, estado de alimentación) en el ejemplo experimental 2 usando ratas ZDF (delgadas y obesas). La razón ( $[1/\text{glucemia}]/AUC[1-^{13}C\text{-palmitato de sodio}]$ ) representa una razón de combustión azúcar/ácido graso.

65 Tal como en la figura 14, es posible determinar qué sacárido y qué ácido graso se usa como la fuente de energía en



los sujetos sanos (delgados) y en los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) que han desarrollado diabetes tanto en el estado de ayuno como en el estado de alimentación. Esto revela que realizar simplemente la medición usando  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio sirve como un sustituto para el cociente respiratorio, y que, además, la medición es más sensible que el cociente respiratorio.

Además, tal como se muestra en la figura 15, la diferencia en “[1/glucemia]/AUC[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido graso]” de los sujetos de prueba resistentes a la insulina (obesos) que han desarrollado diabetes entre el estado de ayuno y el estado de alimentación es significativamente más pequeña que la de los sujetos sanos (delgados). Por tanto, midiendo la diferencia en “[1/glucemia]/AUC[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido graso]” de un sujeto de prueba entre el estado de ayuno y el estado de alimentación, es posible medir la tolerancia a la glucosa resistente a la insulina del sujeto de prueba con mayor precisión.

### (3) Razón de combustión de sacárido/ácido graso (C)

La figura 15 muestra una comparación entre un estado de ayuno y un estado de alimentación con respecto a una razón ([1/glucemia]/ $C_t$ [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio]) de la inversa de la glucemia (estado de ayuno, estado de alimentación) con respecto a  $C_t$  de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) obtenida mediante (e) la administración de una disolución de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio (estado de ayuno, estado de alimentación) obtenida en el ejemplo experimental 2 usando ratas ZDF (delgadas y obesas). En el presente documento, el punto de tiempo en el que el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) es máximo se usó como tiempo de recogida de aire espirado (t). Más específicamente, las condiciones  $t=2$  minutos y  $t=5$  minutos se usaron respectivamente para los sujetos sanos (delgados) en un estado de ayuno y un estado de alimentación, y las condiciones  $t=2$  minutos y  $t=5$  minutos se usaron respectivamente para los sujetos de prueba con diabetes (obesos) en un estado de ayuno y un estado de alimentación.

Esta razón ([1/glucemia]/ $C_t$ ) representa una razón de combustión azúcar/ácido graso.

Tal como se muestra en la figura 16, es posible determinar qué sacárido y qué ácido graso se usa como la fuente de energía en los sujetos sanos (delgados) y en el sujeto de prueba con diabetes (obeso) tanto en un estado de ayuno como en un estado de alimentación, tal como en las figuras 14 y 15. Esto revela que realizar simplemente la medición usando  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio en un solo punto de tiempo entre 1 minuto y 30 minutos después de la administración de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio sirve como sustituto para el cociente respiratorio, y que la medición es más sensible que el cociente respiratorio.

Además, tal como se muestra en la figura 16, la diferencia en “[1/glucemia]/ $C_t$ [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido graso]( $t=1\text{-}30$  min)” de los sujetos de prueba con diabetes (obesos) entre el estado de ayuno y el estado de alimentación es significativamente más pequeña que la de los sujetos sanos (delgados). Por tanto, midiendo la diferencia en “[1/glucemia]/ $C_{\text{máx}}$ [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido graso]( $t=1\text{-}30$  min)” de un sujeto de prueba entre el estado de ayuno y el estado de alimentación, es posible medir la disminución en la sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina) del sujeto de prueba con mayor precisión.

### Ejemplo experimental 7

#### (1) Preparación de una disolución mixta de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa y $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio

Se disolvió  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio en etanol acuoso a aproximadamente  $80^\circ\text{C}$  a una concentración de  $500\ \mu\text{mol/ml}$ . Se añadió la disolución resultante a BSA al 20% que se había calentado hasta  $37^\circ\text{C}$ , y se agitó. Además, se le añadió a la misma una disolución de  $3\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa, preparando de ese modo una disolución mixta de  $3\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa ( $50\ \mu\text{mol}/2\ \text{ml}$ ) y  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -palmitato de sodio ( $20\ \mu\text{mol}/2\ \text{ml}$ ) (a continuación, denominada en el presente documento “disolución mixta de glucosa/ácido palmítico”).

#### (2) Método del experimento

Se usaron ratas (LETO macho y OLETF macho) como animales de experimentación. Las ratas OLETF son sujetos de prueba con diabetes con obesidad y esteatosis hepática, es decir, sujetos de prueba resistentes a la insulina, y las ratas LETO sirven como control (sujetos sanos). Se dividieron las ratas en un grupo de control (glucemia en condiciones de alimentación:  $108\ \text{mg/dl}$ ), un grupo con diabetes leve (glucemia en condiciones de alimentación:  $166\ \text{mg/dl}$ ) y un grupo con diabetes grave (glucemia en condiciones de alimentación:  $281\ \text{mg/dl}$ ), y se administró por vía intravenosa la disolución mixta de glucosa/ácido palmítico preparada en (1) a cada grupo en condiciones de alimentación a una dosificación de  $2\ \text{ml/kg}$  ( $n=1$ ).

Después de eso, se recogió el aire espirado en un punto de tiempo antes de la administración intravenosa de la disolución mixta de glucosa/ácido palmítico (0 minutos) y en puntos de tiempo después de la administración (t minutos), y se determinó  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) a partir de la concentración de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado usando un espectrómetro de masas de análisis de aire espirado (ABCA: producto de SerCon).

## (3) Resultados del experimento

La figura 17 muestra los resultados. La figura 17 muestra las transiciones de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) calculadas a partir de las concentraciones de  $^{13}\text{CO}_2$  medidas mediante la prueba del aliento después de administrar por vía intravenosa la disolución mixta de glucosa/ácido palmítico a, de izquierda a derecha, el grupo de control (glucemia en condiciones de alimentación: 108 mg/dl), el grupo con diabetes leve (glucemia en condiciones de alimentación: 166 mg/dl) y el grupo con diabetes grave (glucemia en condiciones de alimentación: 281 mg/dl). En la figura, el eje de ordenadas indica  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) en el aire espirado, y el eje de abscisas indica el tiempo de recogida de aire espirado (t minutos) después de la administración intravenosa.

Los valores medidos mostrados en la figura 17 concuerdan bien con los resultados de la simulación (no mostrados), mostrando de ese modo que el grado de progresión de la diabetes (control  $\rightarrow$  diabetes leve  $\rightarrow$  diabetes grave), es decir, el grado de progresión de la baja sensibilidad a la insulina (aumento en la resistencia a la insulina) puede monitorizarse basándose en la transición de  $\Delta^{13}\text{C}$  (‰) de los valores medidos. Además, realizando el análisis del modelo (farmacocinética) también es posible dividir los valores medidos obtenidos a partir de la administración de la disolución mixta de glucosa/ácido palmítico en reacciones de aire espirado individuales de glucosa y ácido palmítico.

## REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba,

5 comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C,

10 comprendiendo el método determinar el área bajo una curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t obtenida mediante un método de medición de la capacidad de metabolismo de la glucosa que tiene las etapas (i) y (ii) a continuación (denominada a continuación en el presente documento "AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]"),

15 determinar el área bajo una curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t obtenida mediante el método que tiene las etapas (a) y (b) siguientes (denominada a continuación en el presente documento "AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"),

20 y usar un valor (AUC<sub>t</sub> [glucosa con C marcado]/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) obtenido dividiendo la AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado] entre la AUC<sub>t</sub> [ácido graso con C marcado] como índice para la razón de combustión azúcar/ácido graso:

método para determinar AUC<sub>t</sub>[glucosa con C marcado]:

25 (i) administrar por vía intravenosa una composición a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, comprendiendo la composición, como principio activo, glucosa marcada con al menos un isótopo de C, de manera que la glucosa se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

30 (ii) determinar la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado;

método para determinar AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]:

35 (a) administrar por vía intravenosa la composición que comprende el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, de manera que el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

40 (b) determinar la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado.

- 45 2. Composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba,

comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C,

50 comprendiendo el método determinar el área bajo una curva de Δ-C marcado (‰)-tiempo de recogida de aire espirado t obtenida mediante el método que tiene las etapas (a) y (b) a continuación (denominada en el presente documento "AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]"),

55 y usar un valor (1/glucemia/AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]) determinado dividiendo la inversa de la glucemia (1/glucemia) del sujeto de prueba entre la AUC<sub>t</sub> [ácido graso con C marcado] como índice para la razón de combustión azúcar/ácido graso:

método para determinar AUC<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]:

60 (a) administrar por vía intravenosa la composición que comprende el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, de manera que el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y

65 (b) determinar la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de

CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado.

3. Composición para su uso en un método para medir una razón de combustión azúcar/ácido graso en un sujeto de prueba,
- 5 comprendiendo la composición, como principio activo, un ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C,
- 10 comprendiendo el método determinar C<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] (t=1-30 min) de Δ-C marcado (‰) obtenido mediante el método que tiene las etapas (a) y (b) a continuación,
- 15 y usar un valor ([1/glucemia]/C<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] (t=1-30 min)) determinado dividiendo la inversa de la glucemia (1/glucemia) del sujeto de prueba entre C<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado] (t=1-30 min) como índice para la razón de combustión azúcar/ácido graso:
- método para determinar C<sub>t</sub>[ácido graso con C marcado]:
- (a) administrar por vía intravenosa la composición que comprende el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo marcado con al menos un isótopo de C a un sujeto de prueba y recoger el aire espirado, de manera que el ácido graso C<sub>12-38</sub> o una sal del mismo se convierte en el cuerpo en dióxido de carbono marcado que se excreta en el aire espirado; y
- 20 (b) determinar la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> no marcado contenido en el aire espirado o la razón de la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado con respecto a la cantidad de CO<sub>2</sub> total contenido en el aire espirado.
- 25
4. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el isótopo es <sup>13</sup>C.
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el ácido graso C<sub>12-38</sub> es un ácido graso C<sub>12-18</sub> saturado o un ácido graso C<sub>18</sub> insaturado.
- 30
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el ácido graso C<sub>12-38</sub> es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico.
- 35
7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el sujeto de prueba tiene al menos un estado seleccionado del grupo que consiste en prediabetes, diabetes tipo II, cirrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica y esteatosis hepática no alcohólica.

Fig. 1

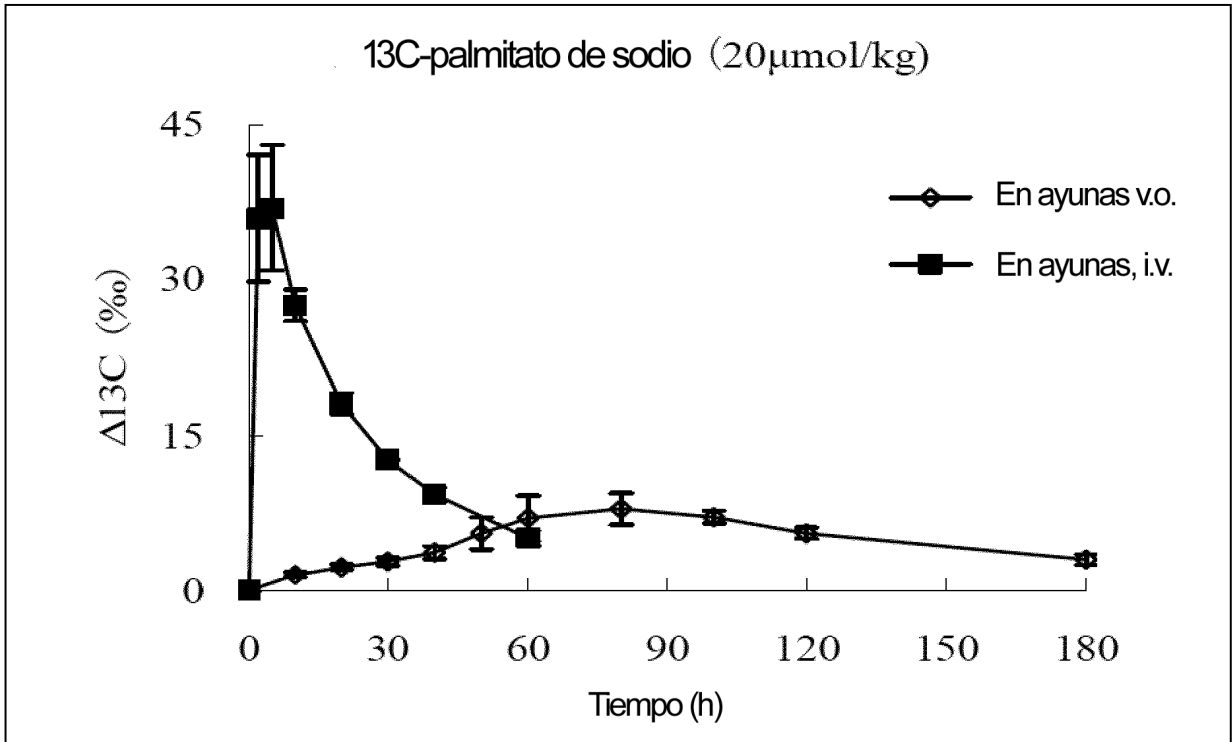


Fig. 2

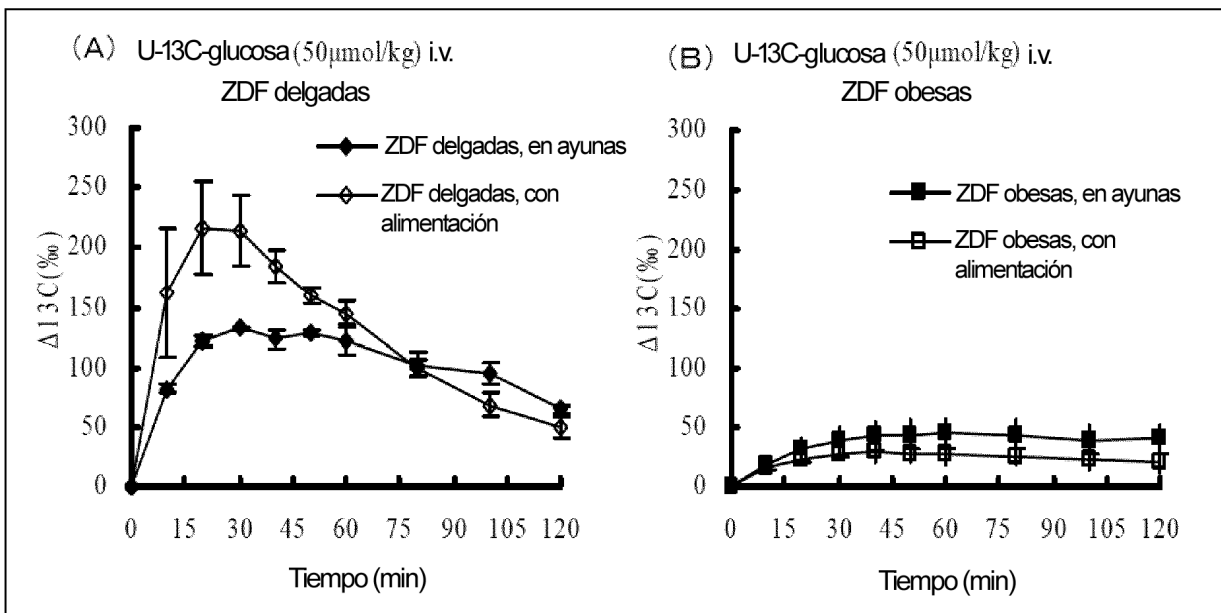


Fig. 3

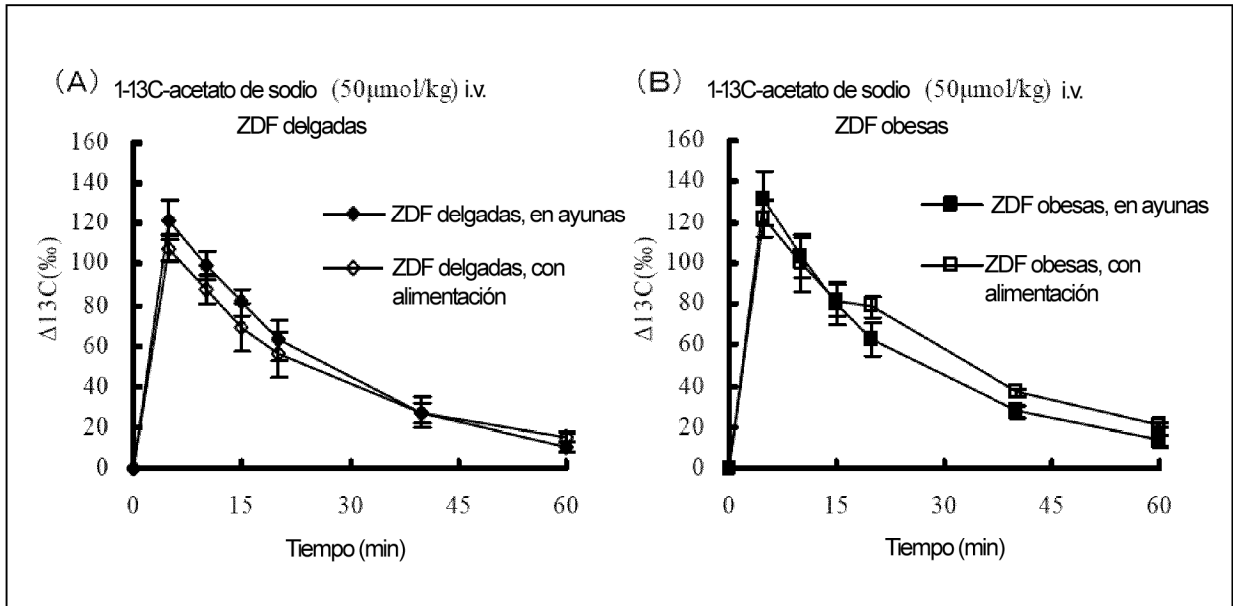


Fig. 4

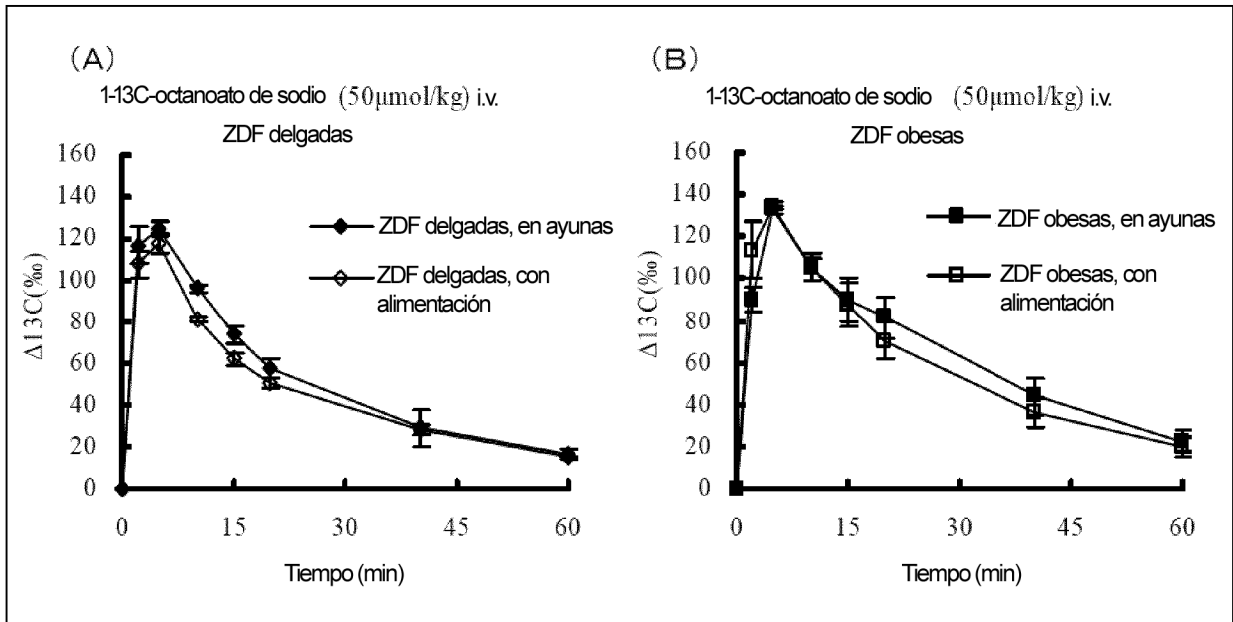


Fig. 5

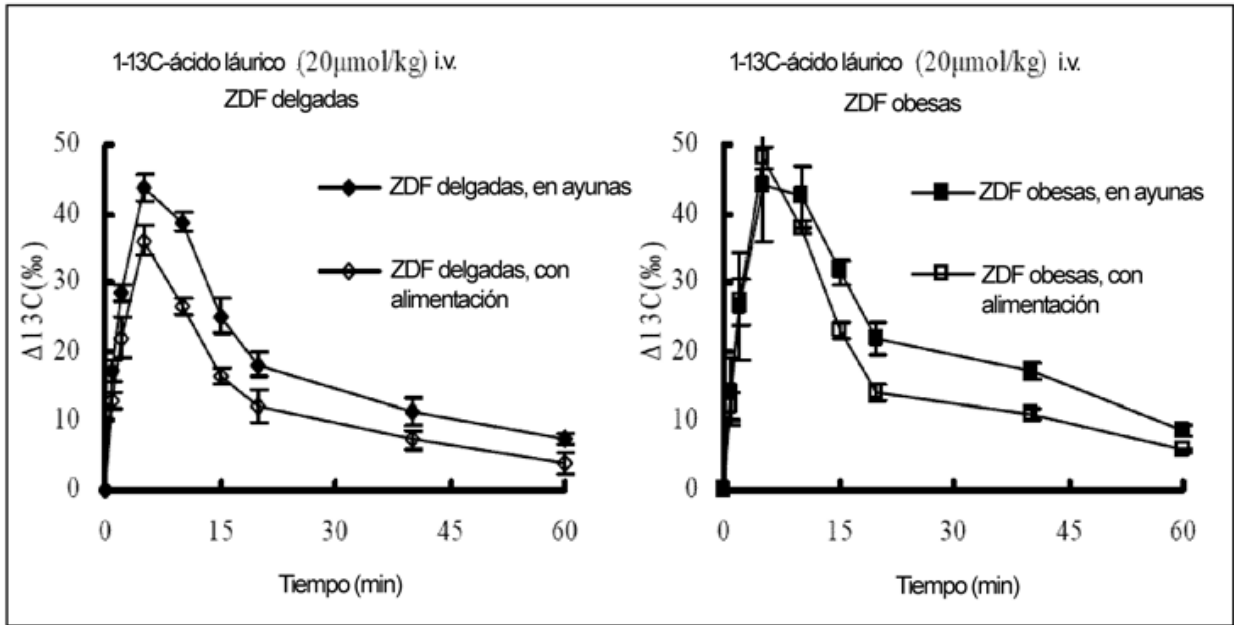


Fig. 6

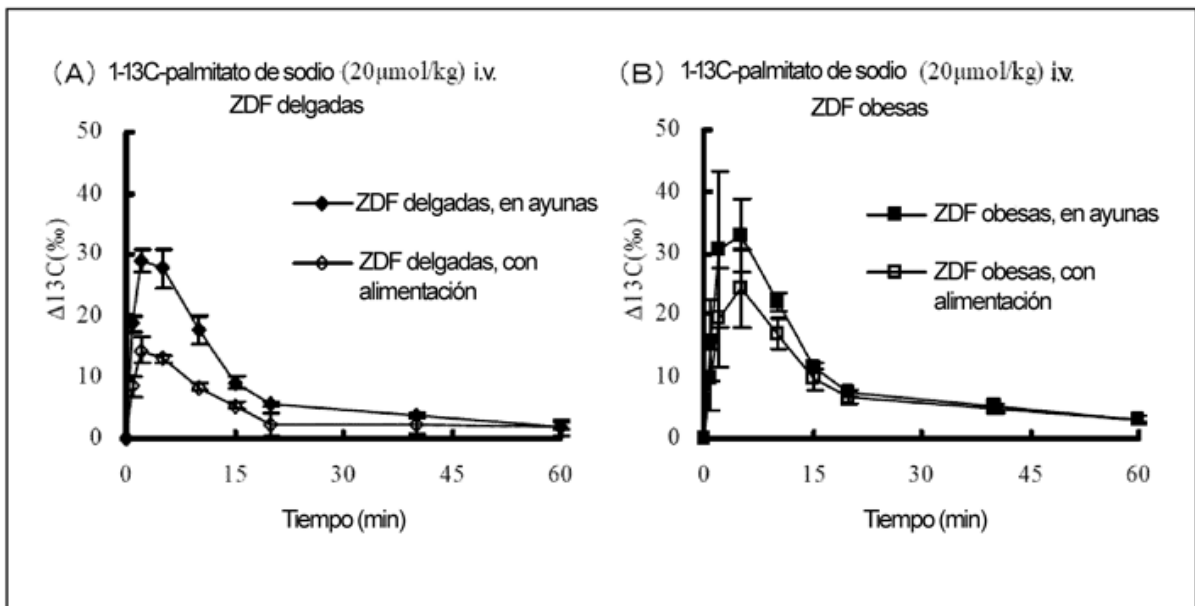


Fig. 7

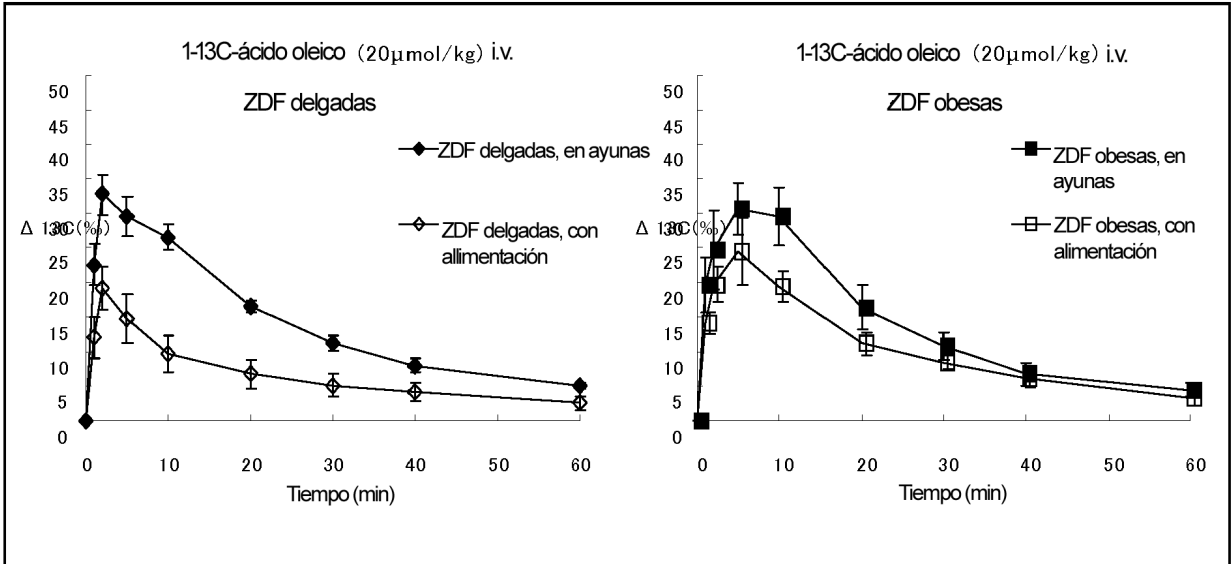


Fig. 8

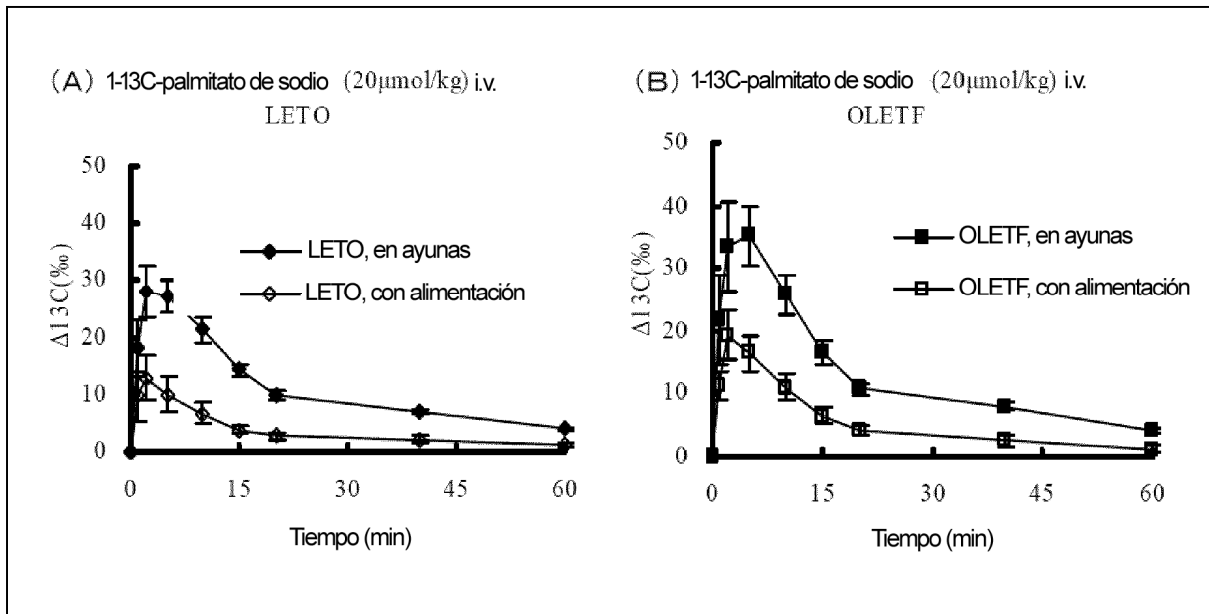
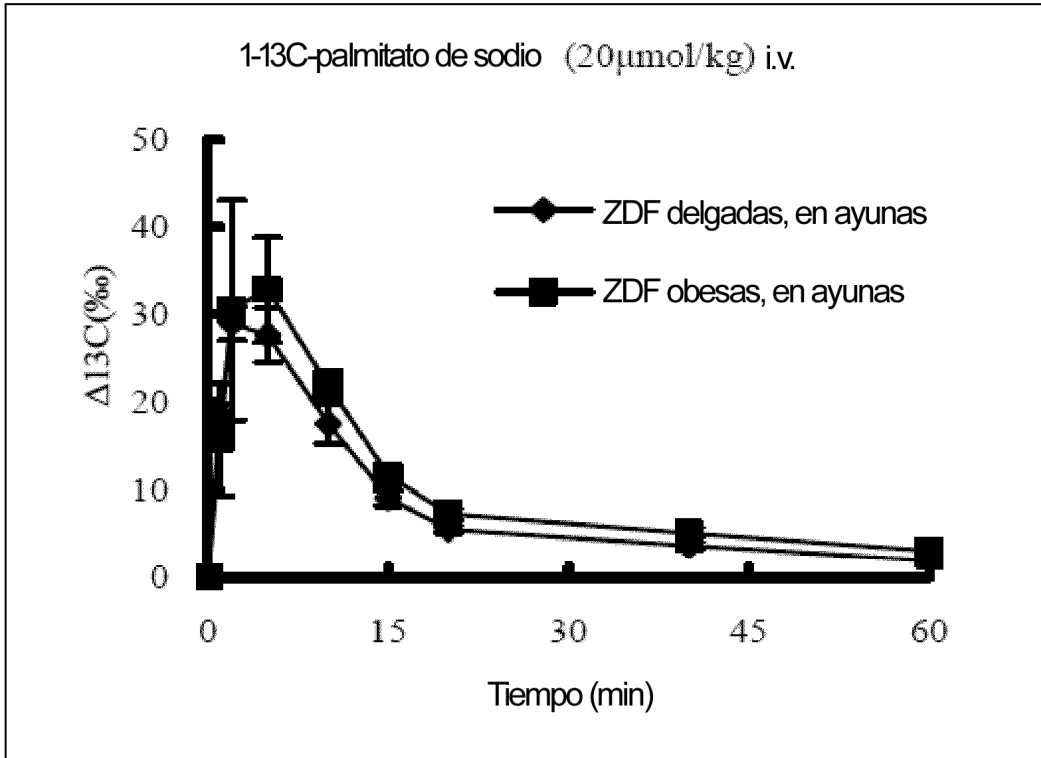




Fig. 9

(A)



(B)

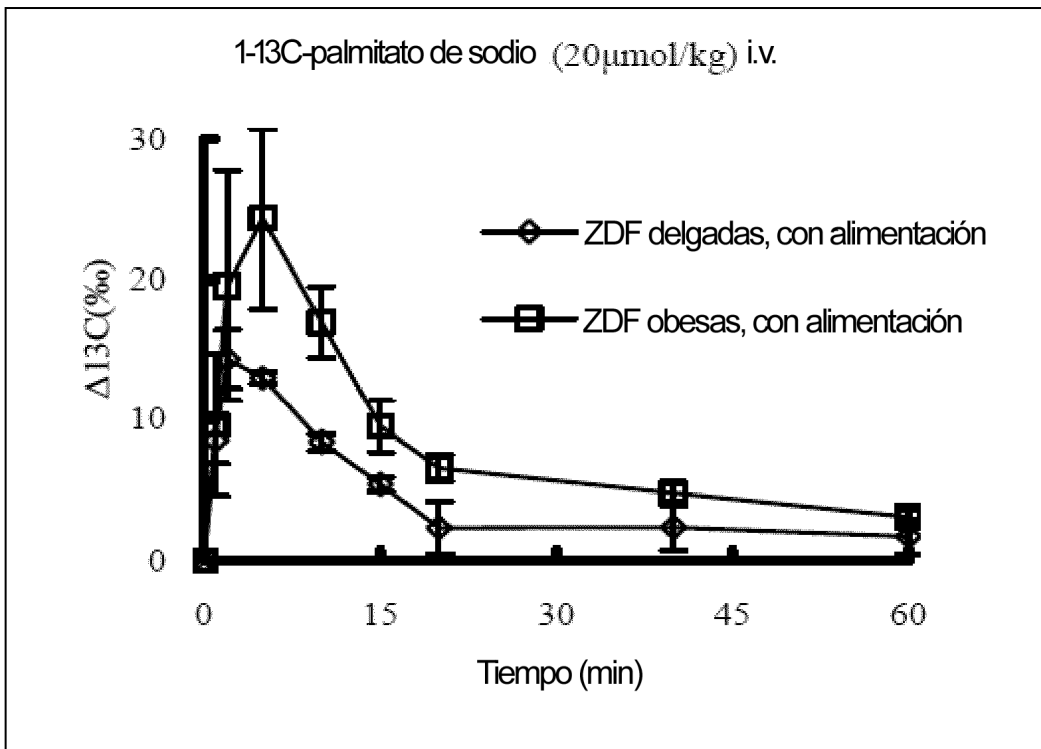
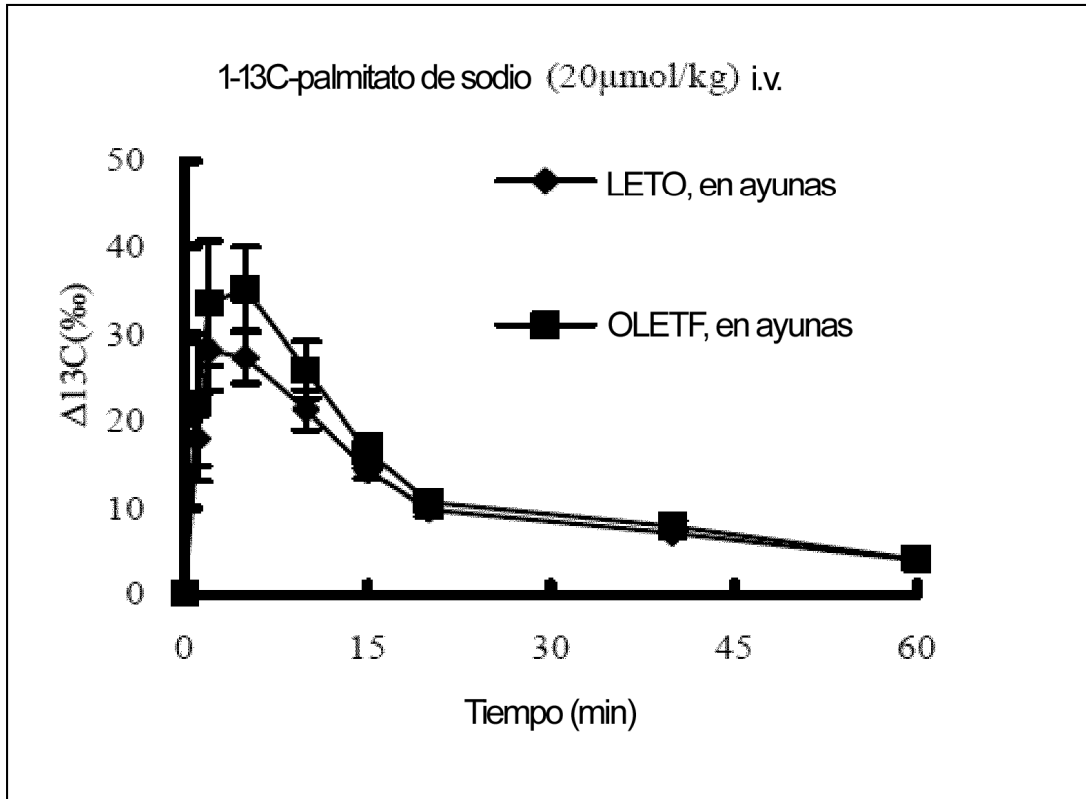


Fig. 10

(A)



(B)

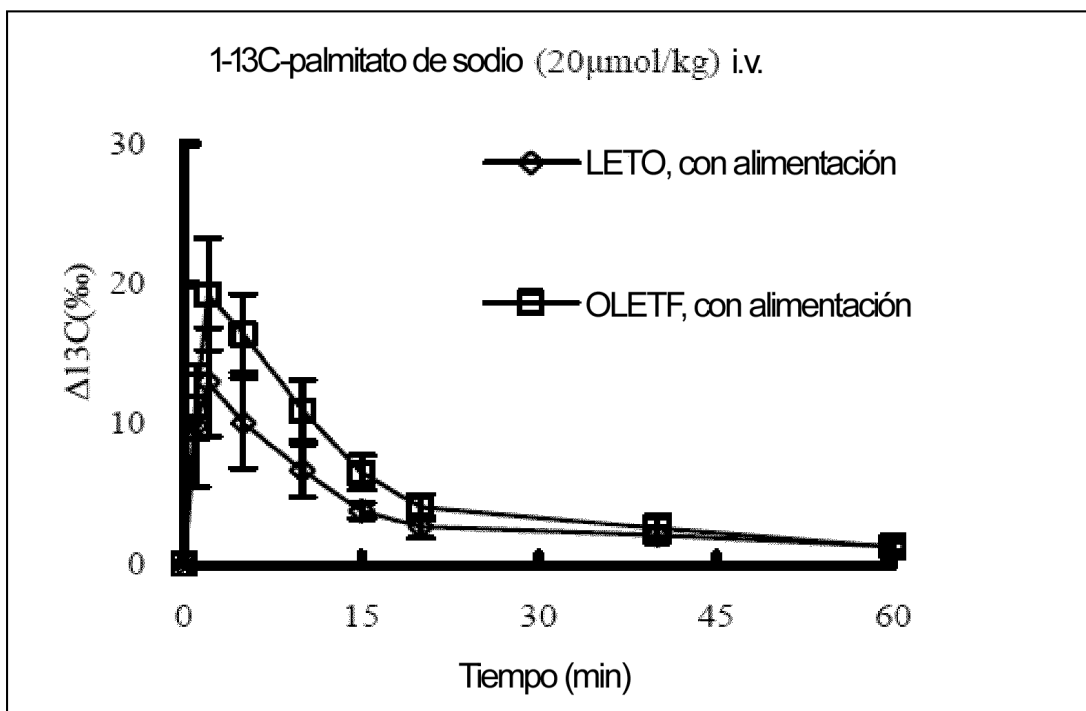


Fig. 11

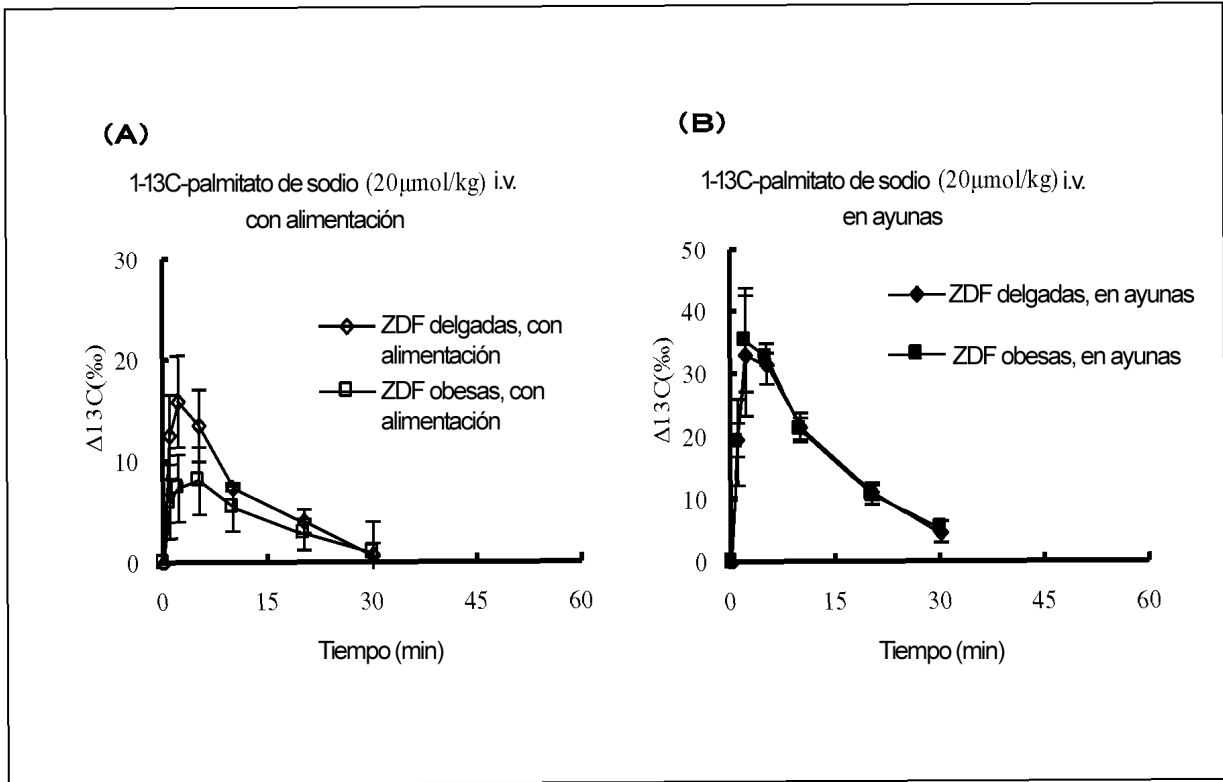


Fig. 12

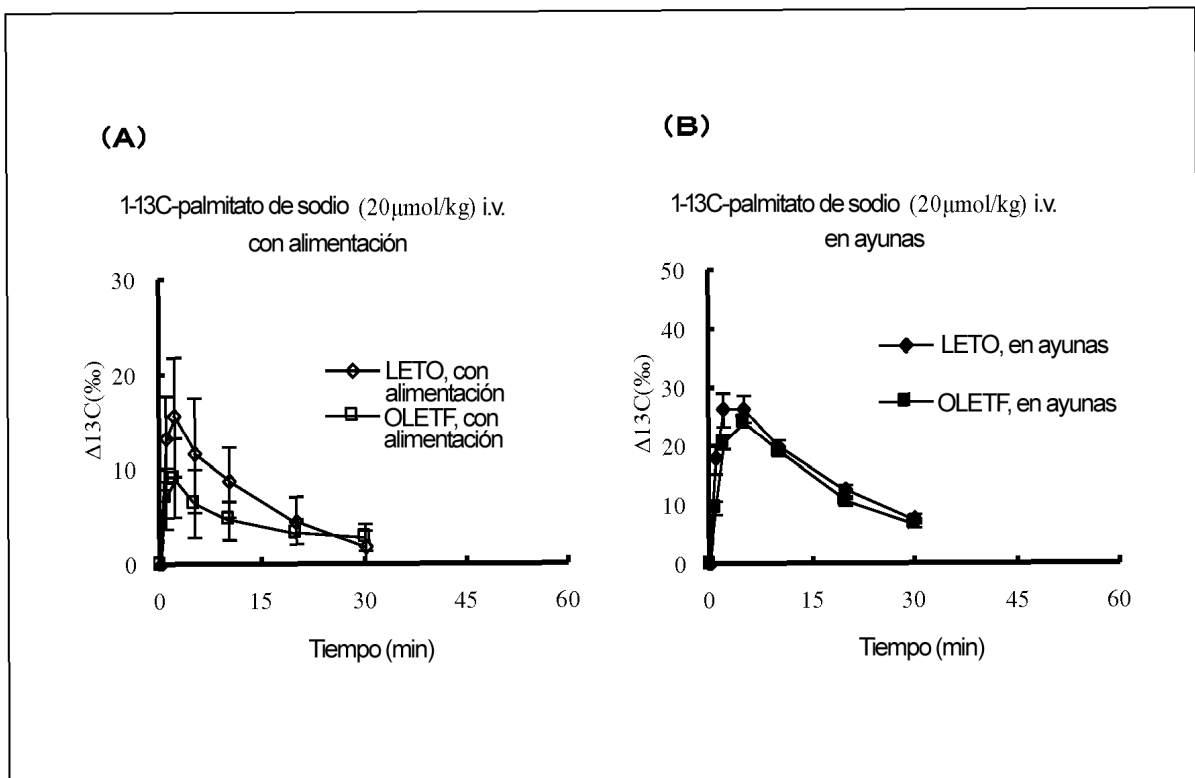


Fig. 13

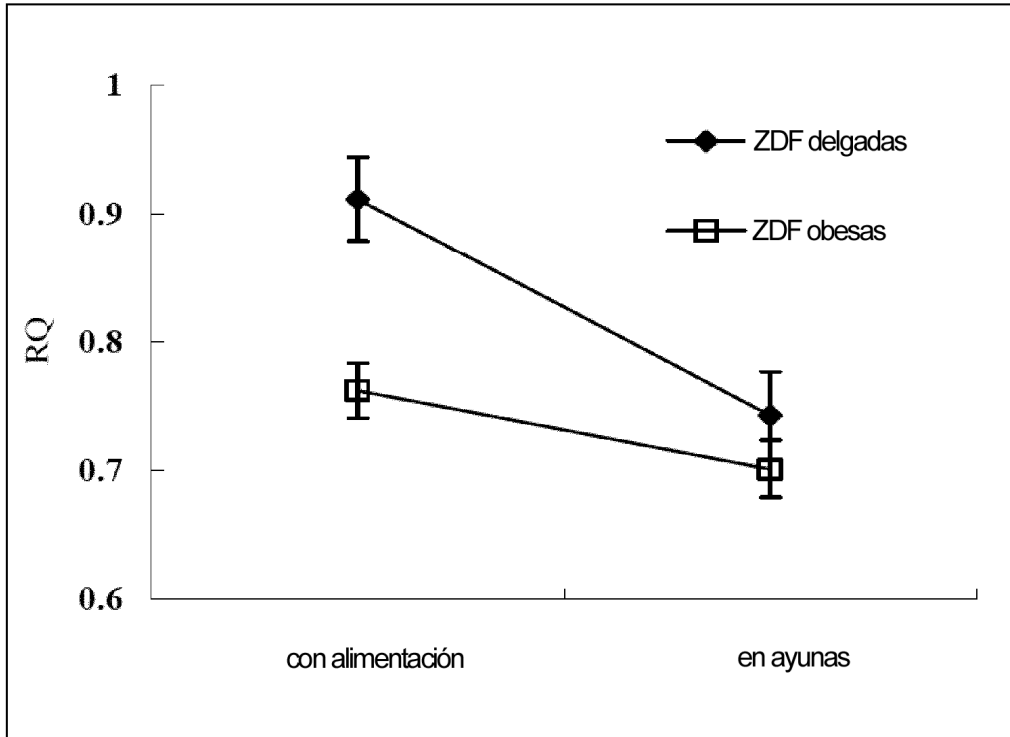


Fig. 14

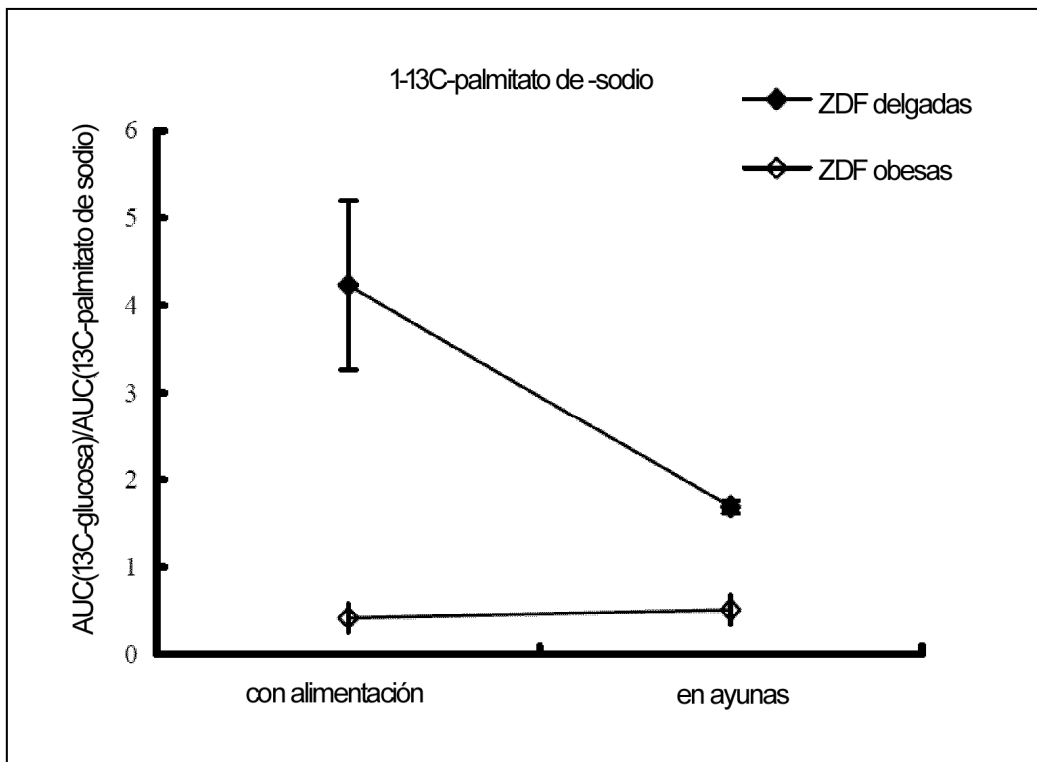


Fig. 15

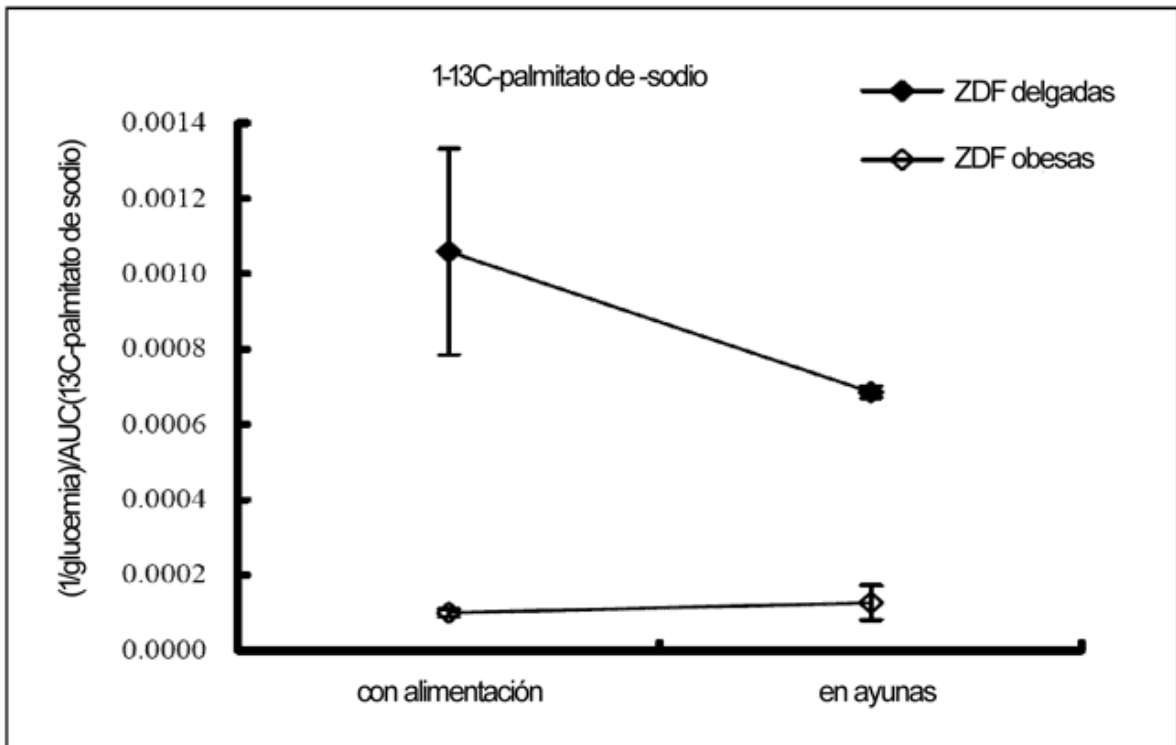


Fig. 16

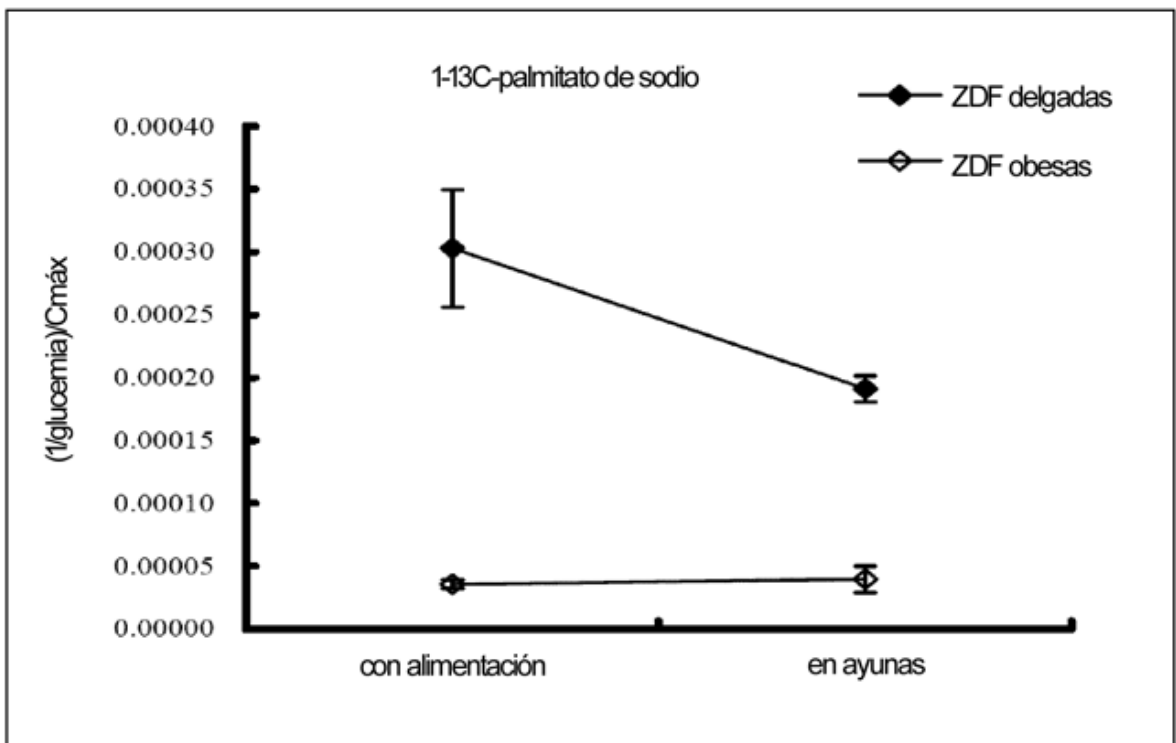


Fig. 17

