

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 509**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/493 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 31/733 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/EP2014/054909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO2014154492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14709665 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2979097**

54 Título: **Trimetilamina como biomarcador de la eficacia prebiótica para la prevención de la ganancia de peso**

30 Prioridad:
28.03.2013 EP 13161510

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2017

73 Titular/es:
**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:
**MARTIN, FRANÇOIS-PIERRE;
COLLINO, SEBASTIANO y
MONTOLIU ROURA, IVAN**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 616 509 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

Trimetilamina como biomarcador de la eficacia prebiótica para la prevención de la ganancia de peso

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere en general al campo de la nutrición y la salud. En particular, la presente invención se refiere a un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención de la ganancia de peso inducida por una dieta, y a biomarcadores que son útiles en tal método.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La obesidad es un problema importante de salud pública, ya que aumenta el riesgo de sufrir varias enfermedades crónicas de prevalencia creciente. La obesidad resulta de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, asociado con una inflamación crónica de bajo grado. Se sabe que contribuye al riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), cáncer, osteoartritis y enfermedad cardiovascular (ECV). La obesidad es el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales, tal como una dieta alta en calorías y falta de actividad física, y las investigaciones recientes también han sugerido que la microbiota intestinal puede jugar un papel en el desarrollo de la obesidad. Una dieta desequilibrada rica en grasas y/o carbohidratos está asociada con el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo, el músculo, el hígado y el corazón. También se piensa que la deposición de grasa ectópica, particularmente en una distribución central, contribuye a una gama de trastornos metabólicos tales como hipertrigliceridemia, hipertensión, alto nivel de glucosa en ayunas y resistencia a la insulina (RI).

20 Se considera que los microbios intestinales contribuyen a la regulación del peso corporal y a los trastornos relacionados influyendo en las funciones metabólicas e inmunes del huésped. La microbiota intestinal en su conjunto mejora la capacidad del huésped para extraer y almacenar energía de la dieta lo que conduce al aumento de peso corporal, mientras que los microbios comensales específicos parecen ejercer efectos beneficiosos sobre las sales biliares, las lipoproteínas y el metabolismo del colesterol. La microbiota intestinal y algunos probióticos también regulan las funciones inmunes, protegiendo al huésped contra infecciones e inflamación crónica. Por el contrario, la disbiosis y la endotoxemia pueden ser factores inflamatorios responsables del desarrollo de la resistencia a la insulina y del aumento de peso corporal. A la luz del vínculo entre la microbiota intestinal, el metabolismo y la inmunidad, es probable que el uso de estrategias dietéticas para modular la composición de microbiota sea eficaz en el control de los trastornos metabólicos. Aunque hasta ahora sólo unos pocos estudios clínicos y preclínicos han demostrado los efectos de microbios intestinales específicos y prebióticos en marcadores biológicos de estos trastornos, los hallazgos indican que los avances en este campo podrían ser de valor en la lucha contra la obesidad y sus trastornos metabólicos asociados (Sanz y colaboradores, 2008).

35 Los datos recientes, tanto a partir de modelos experimentales como de estudios en humanos, apoyan los efectos beneficiosos de determinados productos alimenticios con propiedades prebióticas sobre la homeostasis energética, la regulación de la saciedad y el aumento de peso corporal. Junto con los datos en animales y pacientes obesos, estos estudios apoyan la hipótesis de que la composición de la microbiota intestinal (especialmente el número de bifidobacterias) puede contribuir a modular los procesos metabólicos asociados con el síndrome X, especialmente la obesidad y la diabetes tipo 2. Es plausible, aunque no exclusivo, que estos efectos están vinculados a los cambios inducidos por la microbiota y es posible concluir que sus mecanismos encajan en el efecto prebiótico. Sin embargo, el papel de tales cambios en estos beneficios para la salud aún no está definitivamente probado. Como resultado de la actividad de investigación que siguió a la publicación del concepto prebiótico hace 15 años, se ha puesto de manifiesto que los productos que causan una modificación selectiva en la composición y/o actividad(es) de la microbiota intestinal y que por lo tanto fortalecen la normobiosis podrían o bien inducir efectos fisiológicos beneficiosos en el colon y también en compartimentos fuera del intestino, o contribuir a reducir el riesgo de disbiosis y patologías intestinales y sistémicas asociadas (Roberfroid y colaboradores, 2010).

45 Por lo tanto, sería deseable proporcionarle a la técnica un método que permita identificar sujetos tempranamente - idealmente en riesgo - de aumentar de peso (por ejemplo, después del inicio de un programa de pérdida de peso). En particular, sería deseable proporcionar un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por una dieta, especialmente en una etapa temprana después de iniciar la administración de prebióticos.

50 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método que permita la estratificación temprana de los sujetos de acuerdo con si es probable o no que respondan a una intervención basada en prebióticos para prevenir el aumento de peso inducido o relacionado con una dieta con alto contenido de grasa.

SUMARIO DE LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta, que comprende determinar un nivel de trimetilamina en una muestra de orina obtenida de un sujeto que ha consumido prebióticos y comparar el nivel de trimetilamina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, en donde un mayor nivel de trimetilamina o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina en la muestra de orina comparado con el valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es efectiva en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta en el sujeto.

En una realización, la dieta es una dieta rica en grasas.

En una realización, el método comprende además las etapas de:

a) determinar el nivel de al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina, y

b) comparar el nivel en el sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia predeterminado,

en donde un menor nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o alfa-ceto-isovalerato, o una ausencia de cambio en el nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina, y/o alfa-ceto-isovalerato, en la muestra de orina comparado con los valores de referencia predeterminados, indica que la administración de prebióticos será eficaz en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta en el sujeto.

En una realización, los niveles de los biomarcadores en la muestra de orina se determinan mediante RMN ¹H y/o espectrometría de masas.

En una realización, el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de trimetilamina en orina en una población de control de sujetos que consumen una dieta rica en grasas. En otra realización, el valor de referencia predeterminado es el nivel de trimetilamina en la orina en el sujeto antes de consumir los prebióticos.

En una realización, el nivel de trimetilamina y/o de otros biomarcadores se determina en una muestra de orina obtenida del sujeto después de al menos tres días consecutivos de consumo prebiótico. Preferiblemente, el sujeto ha consumido los prebióticos en una cantidad de al menos 2 g/día durante este periodo o más.

En una realización, el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en oligosacáridos, que contienen opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, en particular fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de los mismos. Preferiblemente, los prebióticos se seleccionan del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos (FOS); galacto-oligosacáridos (GOS); isomalto-oligosacáridos; xilo-oligosacáridos; oligosacáridos de leche de bovino (BMOS); glicosilacarosa (GS); lactosacarosa (LS); lactulosa (LA); palatinosa-oligosacáridos (PAO); malto-oligosacáridos (MOS); gomas y/o hidrolizados de las mismas; pectinas y/o hidrolizados de las mismas; y combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, los prebióticos comprenden oligosacáridos de leche de bovino (BMOS), más preferiblemente oligosacáridos-galactooligosacáridos de leche de vaca (CMOS-GOS). En otra realización preferida, los prebióticos comprenden inulina y fructooligosacáridos (FOS).

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero tal como un humano; una especie no humana, incluyendo un primate; animales de ganado tales como una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un burro o una cabra; un animal para ensayos de laboratorio tal como un ratón, rata, conejo, conejillo de indias o hámster; o un animal de compañía como un perro o un gato.

En una realización, el método se utiliza para crear una dieta estratificada para un grupo de sujetos o una dieta personalizada para el sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para prevenir la ganancia de peso inducida por la dieta en un sujeto, que comprende:

a) llevar a cabo un método como el descrito anteriormente; y

b) administrar prebióticos al sujeto si el nivel de trimetilamina en la muestra de orina aumenta o no cambia en comparación con el valor de referencia predeterminado.

En una realización, la administración de prebióticos al sujeto se continúa durante al menos un mes.

En una realización, si el nivel de trimetilamina en la muestra de orina disminuye en comparación con la muestra de referencia predeterminada, no se administran prebióticos al sujeto. Preferiblemente, se proporciona un tratamiento alternativo para la prevención de la ganancia de peso al sujeto, seleccionado el tratamiento de la restricción de calorías, reducción de la ingesta de grasas en la dieta, un producto de pérdida de peso no prebiótico o un programa de ejercicio.

También se describe un biomarcador en orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a prebióticos en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta, en donde el biomarcador es trimetilamina.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de trimetilamina como biomarcador en orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de sujetos a prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Gráfico que describe las curvas de peso corporal de los animales

Figura 2: Perfiles dependientes del tiempo de los metabolitos con respuesta específica con prebiótico y relacionados con el aumento de peso. A: Controles; B: Controles con alto contenido en grasa; C: GOS con alto contenido en grasa; D: GOSCMOS con alto contenido en grasa; E: Prebio1 con alto contenido en grasa; F: Azúcares con alto contenido en grasa. El eje vertical corresponde a la concentración relativa en los metabolitos obtenida por integración del área del pico, los datos se presentan como área bajo la curva (AUC).

Figura 3: Perfiles dependientes del tiempo de los metabolitos con respuesta específica con prebiótico y relacionados con el aumento de peso. TMA, trimetilamina; TMAO, trimetilamina-N-óxido. A: Controles; B: Controles con alto contenido de grasa; C: GOS con alto contenido en grasa; D: GOSCMOS con alto contenido en grasa; E: Prebio1 con alto contenido en grasa; F: Azúcares con alto contenido en grasa. El eje vertical corresponde a la concentración relativa en los metabolitos obtenida por integración del área del pico, los datos se presentan como área bajo la curva (AUC).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores han utilizado un enfoque de metabonómica para lograr el objetivo de la presente invención. La metabonómica se utiliza para caracterizar el fenotipo metabólico, que comprende la influencia de diversos factores tales como medio ambiente, fármacos, dieta, estilo de vida, genética, y microbioma. A diferencia de la expresión génica y los datos proteómicos que indican el potencial de cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios de concentración dinámica dentro de las células, tejidos y órganos, representan los puntos finales reales de los procesos de regulación fisiológica.

Por lo tanto, es un enfoque adecuado investigar los cambios metabólicos graduales relacionados con diversas intervenciones dietéticas y desarrollo de enfermedades. Recientemente, los descubrimientos basados en la metabolómica y la lipidómica han acelerado nuestra comprensión de los procesos de la enfermedad y proporcionarán nuevas vías para la prevención y el manejo nutricional de los trastornos subclínicos asociados al síndrome metabólico. En particular, los datos "ómicos" han puesto de relieve la contribución del metabolismo energético (ciclo de Krebs), el procesamiento de lípidos y aminoácidos, así como las señales inflamatorias al inicio de la obesidad y la RI.

Utilizando una combinación de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹H) de muestras de orina recogidas a través del tiempo y controlando el aumento de peso, los inventores han identificado nuevos biomarcadores metabólicos indicativos de la eficacia de la intervención prebiótica para la prevención del aumento de peso en un modelo de ratón C57BL/6 bien definido de obesidad inducida por la dieta. Los presentes inventores han caracterizado la adaptación metabólica gradual (por ejemplo, en forma semanal durante un período de 13 semanas) de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta con alto contenido en grasa (HFD) con y sin prebióticos usando dietas isocalóricas. Los inventores han establecido las firmas metabólicas específicas asociadas con el desarrollo gradual de la obesidad bajo diferentes condiciones nutricionales y la variabilidad del fenotipo dentro de la dinámica del aumento de peso corporal.

Mediante el uso de un enfoque metabonómico, los inventores han demostrado que las rutas metabólicas mitocondriales (oxidación de ácidos grasos β, catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, metabolismo de butanoato, ruta del dinucleótido de nicotinamida adenina y el ciclo de Krebs) son rápidamente sobre reguladas mediante una alimentación con alto contenido de grasa que podría reflejar una saturación de ácidos grasos de las mitocondrias y un deterioro del metabolismo energético. Además, el análisis metabonómico mostró una importante remodelación del metabolismo microbiano intestinal, como se observa a través de cambios en las metilaminas, carbohidratos dietéticos y fermentación de proteínas.

5 Los inventores podrían demostrar que se impidió el aumento de peso corporal en los grupos de animales que recibieron una intervención basada en prebióticos y que las firmas metabólicas asociadas a la diferencia en el fenotipo de peso corporal están asociadas con una modulación específica de la obesidad inducida con alto contenido de grasa que depende de procesos biológicos, incluyendo las rutas oxidativas mitocondriales (oxidación de ácidos grasos β) y el metabolismo bacteriano intestinal (metilaminas, carbohidratos dietéticos y fermentación de proteínas).

10 En particular, en los experimentos descritos aquí, los ratones alimentados con una HFD mostraron una disminución urinaria de trimetilamina a lo largo del tiempo. La disminución de la trimetilamina está fuertemente correlacionada con el aumento final de peso corporal. Cuando se alimentaba con HFD y prebióticos (CMOS-GOS e inulina/FOS), se atenuó o evitó significativamente la disminución de la trimetilamina, mientras que la trimetilamina todavía estaba fuertemente correlacionada con el aumento final de peso corporal.

15 Estos resultados enfatizan el papel de las mitocondrias y la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y muestran que la probabilidad de responder beneficiosamente a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta se puede determinar a partir de una firma metabólica temprana usando un conjunto específico de biomarcadores definidos aquí.

20 Los inventores pudieron demostrar que la respuesta metabólica en la orina después de una semana con una alimentación con alto contenido de grasa con cualquiera de los prebióticos (Día 7) permite la predicción del aumento final de peso corporal para cada individuo (Día 70). Por lo tanto, el presente método permite la predicción y/o cuantificación de la respuesta de los animales a la intervención dietética en una etapa temprana después del inicio de la administración de prebióticos.

Predicción y/o cuantificación de la respuesta de un sujeto a los prebióticos

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta en el sujeto.

25 Por ejemplo, en una realización el método puede usarse para predecir si es probable que la administración futura o en curso de prebióticos es eficaz para prevenir el aumento de peso. Por lo tanto, el método puede usarse, por ejemplo, para proporcionar una indicación de si se debe continuar con un tratamiento con prebióticos para la prevención del aumento de peso, o si se debe cambiar al sujeto a un esquema de tratamiento alternativo.

30 En una realización alternativa, el método puede usarse para determinar o cuantificar el efecto del consumo previo de prebióticos por parte del sujeto. Por ejemplo, el método puede usarse para proporcionar una indicación de si la administración de prebióticos ha impedido el aumento de peso, en particular cuando esto no puede determinarse simplemente determinando el peso del sujeto. Por ejemplo, dentro de un período de ensayo especificado no se puede saber si el sujeto habría ganado o perdido peso en ausencia de administración de prebióticos, particularmente si el valor calorífico de la dieta del sujeto es variable y/o desconocido.

Sujeto

35 El método de la presente invención se puede llevar a cabo en sujetos de cualquier peso, con el fin de predecir la eficacia de los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta. Por lo tanto, el sujeto puede ser un sujeto con bajo peso, peso normal, con sobrepeso u obeso.

40 En particular, en el caso de sujetos con bajo peso, sobrepeso u obesos, el método de la presente invención puede dilucidar la predisposición genética y metabólica del sujeto hacia el aumento de peso. Con base en ello, e idealmente bajo una consideración adicional de su estado general de salud y estilo de vida, pueden desarrollarse regímenes nutricionales personalizados que pueden ayudar a mantener o recuperar un estado saludable.

45 En una realización, el sujeto a analizar es susceptible a una ganancia de peso inducida por la dieta, particularmente en ausencia de tratamiento con prebióticos. Por ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto con sobrepeso u obesidad, para quien se indica la administración de prebióticos para evitar el aumento de peso. En algunas realizaciones, el sujeto puede consumir una dieta alta en grasas, o una dieta alta en calorías.

50 El "sobrepeso" se define para un ser humano adulto cuando tiene un IMC comprendido entre 25 y 30. Por "índice de masa corporal" o "IMC" se entiende la relación de peso en kg dividida por la altura en metros al cuadrado. La "obesidad" es una condición en la cual la reserva natural de energía, almacenada en el tejido adiposo de los animales, en particular los humanos y otros mamíferos, se incrementa hasta un punto en el que se asocia con ciertas condiciones de salud o aumento de la mortalidad. Un ser humano adulto se define como "obeso" cuando tiene un IMC mayor a 30. El "peso normal" para un ser humano adulto se define como un IMC de 18,5 a 25, mientras que el "bajo peso" puede definirse como un IMC inferior a 18,5.

Una dieta rica en grasas puede definirse como una dieta a partir de la cual el sujeto deriva aproximadamente más del 20% de sus calorías totales de la grasa. En algunas realizaciones, la dieta rica en grasas puede contener aproximadamente más del 30% de sus calorías totales de la grasa. En otras realizaciones, el sujeto puede derivar aproximadamente más del 40% de sus calorías totales a partir de grasa.

5 De este modo, el contenido real de grasa de una dieta rica en grasas puede variar dependiendo del valor calorífico total de la dieta, así como, por ejemplo, del sexo, la edad, el nivel de actividad física, la estructura, la altura y el peso del sujeto. Por lo general, para un hombre de 70 kg con un nivel moderado de actividad física y una ingesta diaria de calorías de 2.700 kcal, se puede considerar que en una dieta rica en grasas se consumen más de 60 g de grasa al día (aproximadamente un valor energético de 540 kcal). Alternativamente, una dieta rica en grasas en un sujeto de este tipo puede definirse como superior a 90 g de grasa/día (810 kcal/día) o 120 g de grasa/día (1080 kcal/día).

15 Una dieta alta en calorías puede definirse como el consumo por parte del sujeto de una ingesta calórica diaria superior a la recomendada, basada por ejemplo en el sexo, la edad, el nivel de actividad física, la estructura, la altura y/o el peso del sujeto. Por ejemplo, una dieta alta en calorías para un hombre típico de 70 kg puede definirse como el consumo de más de 2.700 kcal/día, más de 3.000 kcal/día o más de 3.500 kcal/día. Para las mujeres, una dieta alta en calorías puede contener más de 2.100 kcal/día, más de 2.500 kcal/día o más de 3.000 kcal/día.

El sujeto probado en el método de la presente invención ha consumido prebióticos. Normalmente, el sujeto ha consumido prebióticos como parte de un programa prescrito de control de peso. Por ejemplo, se puede administrar o suministrar una dosis definida de prebióticos al sujeto como un suplemento dietético, con el fin de prevenir el aumento de peso.

20 Preferiblemente, el sujeto ha consumido prebióticos durante un periodo de al menos un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas, un mes, dos meses o tres meses antes de que se obtenga la muestra a ensayar. En realizaciones preferidas, la muestra se obtiene entre 3 y 14 días después de iniciar el consumo de prebióticos, por ejemplo alrededor de 7 días después de comenzar el tratamiento con prebióticos. Por ejemplo, en algunas realizaciones el sujeto ha consumido prebióticos en una cantidad de al menos 1 g/día, al menos 2 g/día, al menos 5 g/día o al menos 10 g/día durante el periodo definido anteriormente.

En una realización, el sujeto es un ser humano. Sin embargo, el método de la presente invención no se limita a seres humanos. También puede usarse en animales no humanos, por ejemplo en animales de compañía como gatos o perros. Sobre esta base pueden diseñarse regímenes nutricionales que contribuirán a una larga vida del animal de compañía en buen estado de salud.

30 En algunas realizaciones, el sujeto es un infante o un niño pequeño. El término "infante" se refiere a un niño menor de 12 meses. La expresión "niño pequeño" se refiere a un niño de entre uno y tres años, también llamado niño. El infante puede ser un bebé a término o un bebé prematuro. Un bebé "antes de término" o "prematuro" se refiere a un bebé que no nació a término. Generalmente se refiere a un bebé nacido antes de las 36 semanas de gestación. En algunas realizaciones, el recién nacido puede nacer por sección en C y/o un bebé pequeño para la edad gestacional y/o un bebé de bajo peso al nacer. Un "niño nacido por sección C" significa un bebé que nació por cesárea, es decir, un bebé que no nació por vía vaginal.

Prebióticos

40 Un prebiótico es un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y por lo tanto mejora la salud del huésped. Tales ingredientes son no digeribles en el sentido de que no se descomponen y se absorben en el estómago o el intestino delgado y por lo tanto pasan intactos al colon, donde son fermentados selectivamente por las bacterias beneficiosas.

45 Ejemplos de prebióticos incluyen ciertos oligosacáridos, tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, BMO (oligosacárido de leche de bovino), glicosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), palatinosa-oligosacáridos (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), gomas y/o hidrolizados de las mismas, pectinas y/o hidrolizados de las mismas y cualquiera de sus mezclas. Los BMO se pueden seleccionar de la lista que comprende oligosacáridos N-acetilados, oligosacáridos sialilados y cualquier de sus mezclas. Los BMO pueden ser "CMOS-GOS" (oligosacáridos -galactooligosacáridos de leche de vaca).

50 Se puede utilizar una combinación de prebióticos tales como 90% de GOS con 10% de fructooligosacáridos de cadena corta tales como el producto vendido bajo la marca registrada Raftilose® o 10% de inulina tal como el producto vendido bajo la marca registrada Raftiline®.

Un prebiótico particularmente preferido es una mezcla de galacto-oligosacárido(s), oligosacárido(s) N-acetilado(s) y oligosacárido(s) sialilado(s) en los que el(los) oligosacárido(s) N-acetilado(s) comprende(n) (representa(n)) 0,5 a 4,0% de la mezcla de oligosacáridos, el(los) galacto-oligosacárido(s) comprende(n) (representa(n)) 92,0 a 98,5% de la mezcla de oligosacáridos y el(los) oligosacárido(s) sialilado(s) comprende(n) (representa(n)) 1,0 a 4,0% de la mezcla de oligosacáridos. Esta mezcla se denominará en lo sucesivo "CMOS-GOS". Preferiblemente, una composición para uso de acuerdo con la invención contiene de 2,5 a 15,0% en peso de CMOS-GOS sobre una base de materia seca con la condición de que la composición comprenda al menos 0,02% en peso de un oligosacárido N-acetilado, al menos 2,0% en peso de un galacto-oligosacárido y al menos un 0,04% en peso de un oligosacárido sialilado. Los documentos WO2006087391 y WO2012160080 proporcionan algunos ejemplos de producción de "CMOS-GOS".

"Oligosacárido N-acetilado" significa un oligosacárido que tiene un residuo N-acetilo. Los oligosacáridos N-acetilados adecuados incluyen GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc. Los oligosacáridos N-acetilados pueden prepararse por acción de glucosaminidasa y/o galactosaminidasa sobre N-acetil-glucosa y/o N-acetil galactosa. Igualmente, se pueden usar N-acetil-galactosil transferasas y/o N-acetil-glicosil transferasas para este propósito. Los oligosacáridos N-acetilados también pueden producirse mediante tecnología de fermentación utilizando las respectivas enzimas (recombinantes o naturales) y/o fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden expresar ya sea sus enzimas naturales y sustratos o pueden ser modificados para producir sustratos y enzimas respectivas. Pueden utilizarse cultivos microbianos únicos o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos N-acetilados puede iniciarse mediante sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (DP) desde DP = 1 en adelante. Otra opción es la conversión química de ceto-hexosas (por ejemplo fructosa) ya sea libres o unidas a un oligosacárido (por ejemplo lactulosa) en N-acetilhexosamina o un oligosacárido que contiene N-acetilhexosamina como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38: 827-828.

"Galacto-oligosacárido" significa un oligosacárido que comprende dos o más moléculas de galactosa que no tienen carga ni residuo de N-acetilo. Los galacto-oligosacáridos adecuados incluyen Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β ,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Ga β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc. Galacto-oligosacáridos sintetizados tales como Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y mezclas de los mismos están disponibles comercialmente bajo las marcas comerciales Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente, se pueden usar glucosiltransferasas específicas, tales como galactosiltransferasas para producir oligosacáridos neutros.

"Oligosacárido sialilado" significa un oligosacárido que tiene un residuo de ácido siálico con carga asociada. Los oligosacáridos sialilados adecuados incluyen NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc. Estos oligosacáridos sialilados se pueden aislar mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural tal como leches de animales. Alternativamente, también pueden producirse mediante biotecnología utilizando sialil-transferasas específicas ya sea mediante tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas recombinantes o naturales) o mediante tecnología de fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden o bien expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden ser manipulados para producir sustratos y enzimas respectivos. Pueden utilizarse cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de sialil-oligosacáridos puede iniciarse mediante sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (DP) desde DP = 1 en adelante.

En una realización particularmente preferida, los prebióticos comprenden oligosacáridos de leche bovina (BMOS). Más preferiblemente, los prebióticos comprenden oligosacáridos-galactooligosacáridos de leche de vaca (CMOS-GOS). En otra realización preferida, los prebióticos comprenden inulina y fructooligosacáridos (FOS).

Muestra

El presente método comprende una etapa de determinación del nivel de trimetilamina en una muestra de orina obtenida de un sujeto.

Por lo tanto, el presente método se practica típicamente fuera del cuerpo humano o animal, es decir, en una muestra de fluido corporal (orina) que se obtuvo previamente del sujeto a analizar. La utilización de la orina como fluido corporal a analizar tiene la ventaja de que puede obtenerse de forma regular y no invasiva utilizando un procedimiento bien establecido. La muestra también se puede obtener sin el apoyo del personal médico.

Determinación del nivel de trimetilamina en la muestra

El nivel de trimetilamina en la muestra puede ser detectado y cuantificado por cualquier medio conocido en la

técnica. Por ejemplo, puede usarse RMN ¹H, espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS. Pueden utilizarse también otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcación o métodos químicos cuantitativos. Preferiblemente, el nivel de trimetilamina en la muestra y el valor de referencia se determinan por el mismo método.

5 Comparación del nivel de trimetilamina con un valor de referencia

El presente método comprende además una etapa de comparación del nivel de trimetilamina del sujeto con un valor de referencia predeterminado.

10 El valor de referencia predeterminado puede basarse en un nivel promedio de trimetilamina en el fluido corporal analizado en una población de control, por ejemplo una población que no ha consumido prebióticos. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 50 personas con antecedentes genéticos, edad y estado de salud similares. Preferiblemente, la población de control es un grupo de sujetos que han consumido una dieta similar a la del sujeto a ser analizado, excepto en relación con los prebióticos. Típicamente, los sujetos de la población de control han consumido una dieta rica en grasas, pero no han consumido ningún prebiótico ni un nivel de prebióticos que sea menor que la del sujeto a analizar.

15 En otra realización, el valor de referencia predeterminado es el nivel de trimetilamina en la orina en el sujeto a analizar antes de consumir los prebióticos. Por tanto, el método puede comprender controlar un cambio en los niveles de trimetilamina en orina en el sujeto en respuesta al consumo de prebióticos. Por ejemplo, en una realización se puede obtener una muestra de orina de un sujeto para proporcionar un valor de referencia para el nivel de trimetilamina, después de lo cual se inicia el tratamiento con prebióticos. Posteriormente, se puede obtener
20 una muestra de orina adicional (de prueba) después de un período definido de consumo de prebióticos, como se ha discutido anteriormente. El nivel de trimetilamina en la muestra de ensayo se compara entonces con la muestra de referencia con el fin de determinar si los niveles de trimetilamina en ese sujeto han aumentado o disminuido en respuesta al tratamiento con prebióticos.

Determinación de la eficacia prebiótica con base en la comparación de los niveles de trimetilamina

25 En el presente método, un aumento en el nivel de trimetilamina, o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina, en la muestra de orina en comparación con el valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta. Por ejemplo, los niveles relativos de trimetilamina en la muestra de ensayo y en la muestra de referencia pueden indicar si el consumo previo de prebióticos ha sido eficaz para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta y/o si la
30 administración adicional de prebióticos será eficaz para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta.

En algunas realizaciones, un aumento en el nivel de trimetilamina en la muestra de orina en comparación con el valor de referencia predeterminado es indicativo de la eficacia prebiótica. En particular, en realizaciones en las que el valor de referencia se basa en un nivel medio de trimetilamina en orina en una población de control de sujetos que consumen una dieta con alto contenido de grasa, el nivel de trimetilamina en la muestra de ensayo aumenta
35 preferiblemente en comparación con el valor de referencia. También en realizaciones en las que el valor de referencia se basa en el nivel de trimetilamina en orina en el sujeto antes de consumir los prebióticos, el nivel de trimetilamina en la muestra de ensayo aumenta preferiblemente en comparación con el valor de referencia.

Preferentemente, el nivel de trimetilamina en la muestra de orina se incrementa en al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 50%, al menos un 70%, al menos un 100%, al menos un
40 150% o al menos un 200% en comparación con el valor de referencia predeterminado.

En otras realizaciones, la ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina en la muestra de orina comparado con el valor de referencia predeterminado puede ser indicativa de la eficacia prebiótica. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que el valor de referencia se basa en un nivel medio de trimetilamina en orina en la población general o una población de control de sujetos que consumen una dieta normal, un nivel de trimetilamina en la
45 muestra de ensayo que no disminuye en comparación con el valor de referencia puede ser indicativo de que los prebióticos son eficaces para prevenir el aumento de peso.

Además, en algunas realizaciones el contenido de grasa y/o el valor calorífico de la dieta del sujeto pueden ser variables. Por ejemplo, el contenido de grasa y/o el valor calorífico de la dieta del sujeto pueden aumentar entre el momento en que se toma una muestra de control para determinar el valor de referencia y un momento posterior en el que se toma la muestra de ensayo. En tales realizaciones, la ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina en la muestra de orina de ensayo en comparación con el valor de referencia predeterminado también puede ser indicativo de la eficacia prebiótica.

Preferiblemente, una "ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina" significa una diferencia de menos del 10%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1% entre el nivel de trimetilamina en la muestra de orina y el valor de referencia predeterminado.

5 Puesto que en las realizaciones de la presente invención un nivel de trimetilamina que no disminuye en la muestra de orina comparado con el valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta, un menor nivel de trimetilamina en la muestra de orina en comparación con los valores de referencia predeterminados puede indicar que es menos probable que la administración de prebióticos sea eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta con alto contenido de grasa. Por ejemplo, una disminución del nivel de trimetilamina en la muestra de orina en comparación con el valor de referencia puede indicar que el consumo previo de prebióticos no ha sido eficaz para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta y/o que la administración adicional de prebióticos será ineficaz para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta.

Otros biomarcadores

15 En el presente método, se pueden usar también biomarcadores adicionales para predecir y/o cuantificar la respuesta del sujeto a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

Como tal, los inventores han identificado que las concentraciones no incrementadas en orina de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o el nivel de alfa-ceto-isovalerato permiten el diagnóstico de una mayor probabilidad de resistir el aumento de peso inducido por la dieta con alto contenido de grasa.

20 Por lo tanto, el método de la presente invención puede comprender además las etapas de determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina, y comparar el nivel en el sujeto de al menos un biomarcador adicional con un valor de referencia predeterminado, en donde un menor nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o alfa-ceto-isovalerato, o una ausencia de cambio en el nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina, y/o alfa-ceto-isovalerato, en la muestra de orina comparado con los valores de referencia predeterminados indica que la administración de prebióticos es eficaz en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta en el sujeto.

Los biomarcadores adicionales también pueden ser detectados y cuantificados por RMN ¹H o espectroscopía de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS. Pueden utilizarse también otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcación o métodos químicos cuantitativos.

30 Preferentemente, todos los biomarcadores que se van a determinar se evalúan mediante la misma tecnología. En algunas realizaciones, todos los biomarcadores ensayados se evalúan simultáneamente.

El método de la presente invención puede comprender la evaluación de al menos 2, al menos 3, al menos 4, o al menos 5 biomarcadores como se mencionó anteriormente.

Por ejemplo, la trimetilamina puede evaluarse conjuntamente con oxaloacetato.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con sulfato de indoxilo.

35 La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con creatinina.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con alfa-ceto-isovalerato.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con oxaloacetato e sulfato de indoxilo.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con oxaloacetato y creatinina.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con oxaloacetato y alfa-ceto-isovalerato.

40 La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con sulfato de indoxilo y creatinina.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con sulfato de indoxilo y alfa-ceto-isovalerato.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con creatinina y alfa-ceto-isovalerato.

La trimetilamina puede evaluarse también conjuntamente con oxaloacetato, sulfato de indoxilo y creatinina.

La trimetilamina puede evaluarse también conjuntamente con oxaloacetato, sulfato de indoxilo y alfa-ceto-isovalerato.

La trimetilamina también puede evaluarse conjuntamente con oxaloacetato, creatinina y alfa-ceto-isovalerato.

La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con creatinina, sulfato de indoxilo y alfa-ceto-isovalerato.

- 5 La trimetilamina también se puede evaluar conjuntamente con oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y alfa-ceto-isovalerato.

10 La ventaja de evaluar más de un biomarcador es que cuanto más biomarcadores se evalúan, más fiable puede ser el diagnóstico. Por ejemplo, si aumenta o disminuye el nivel de más de 1, 2, 3, 4 o 5 biomarcadores entre la muestra de orina y los correspondientes valores de referencia predeterminados, esto puede ser más fuertemente indicativo de si los prebióticos son o no eficaces en la prevención del aumento de peso inducido por dieta en el sujeto.

15 El valor de referencia para la trimetilamina y opcionalmente para los biomarcadores adicionales se mide preferiblemente usando las mismas unidades usadas para caracterizar el nivel de trimetilamina y opcionalmente los biomarcadores adicionales obtenidos del sujeto de ensayo. Por lo tanto, si el nivel de trimetilamina y opcionalmente de los otros biomarcadores es un valor absoluto (por ejemplo, las unidades de trimetilamina se miden en $\mu\text{mol/l}$ (μM)), el valor de referencia también se mide preferiblemente en las mismas unidades (por ejemplo, $\mu\text{mol/l}$ (μM) de trimetilamina en individuos en una población de sujetos de control seleccionada o en el sujeto antes de la administración de prebióticos).

20 El valor de referencia puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o media. Los valores de referencia de trimetilamina y opcionalmente de biomarcadores adicionales en muestras de orina obtenidas, tales como niveles medios, niveles medianos o niveles de "corte", pueden establecerse en algunas realizaciones ensayando una muestra grande de individuos en la población general o en la población seleccionada (por ejemplo, individuos que consumen una dieta alta en grasas). Puede utilizarse un modelo estadístico, tal como el método del valor predictivo, para seleccionar un criterio de positividad o una curva característica del operador receptor que define la especificidad óptima (tasa negativa verdadera más alta) y la sensibilidad (tasa positiva verdadera más alta) como se describe en Knapp, RG y Miller, MC (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics, William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa., que se incorpora aquí como referencia. Los valores de referencia para comparación con relación a un sujeto específico y un biomarcador pueden seleccionarse según el género, la raza, la herencia genético, el estado de salud o la edad del sujeto, por ejemplo.

Prevención del aumento de peso inducido por la dieta

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir la ganancia de peso inducida por la dieta en un sujeto. El método puede comprender llevar a cabo un método como se ha descrito anteriormente con el fin de determinar la eficacia prebiótica en el sujeto y administrar posteriormente prebióticos o no, dependiendo de si el método indica que es probable que los prebióticos sean eficaces. De esta manera, el tratamiento con prebióticos puede dirigirse a los sujetos que tienen más probabilidades de beneficiarse, mientras que puede desarrollarse un programa alternativo de prevención de aumento de peso para sujetos en los que los prebióticos tienen menos probabilidades de ser eficaces.

40 En particular, el presente método permite la estratificación temprana de los sujetos, por ejemplo después de una intervención nutricional de corto plazo con prebióticos. Por ejemplo, el método puede realizarse después de una semana o menos de tratamiento con prebióticos, antes de que el sujeto haya engordado, lo que puede resultar en riesgos para la salud, para evaluar la eficacia de la intervención para la prevención del aumento de peso corporal a largo plazo. Mediante la determinación de si el sujeto es susceptible a una intervención basada en prebióticos para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta, se pueden ajustar en consecuencia el estilo de vida y/o la dieta del sujeto en una etapa temprana del proceso de intervención. Por lo tanto, se puede utilizar el método con el fin de desarrollar un régimen nutricional y/o de ejercicio personalizado para proporcionar un físico sano para el sujeto.

45 De este modo, en realizaciones del presente método, si el nivel de trimetilamina en la muestra de orina aumenta o no cambia en comparación con el valor de referencia predeterminado, se administran prebióticos al sujeto. Dado que el sujeto ya ha consumido típicamente prebióticos como parte del procedimiento de intervención antes de la etapa de prueba, esto puede significar que se continúa la administración de prebióticos al sujeto. Opcionalmente, los niveles de los biomarcadores adicionales descritos anteriormente también pueden tenerse en cuenta al determinar si se continúa la administración de prebióticos.

50 El consumo de prebióticos por el sujeto puede continuar en cualquier cantidad, por ejemplo, la cantidad de prebióticos consumidos puede aumentar, disminuir o permanecer igual después de la etapa de prueba. Sin embargo, después de que se obtiene una indicación positiva de la eficacia de los prebióticos, los prebióticos se

administran preferiblemente al sujeto en una cantidad al menos igual a la consumida antes de tomar la muestra de ensayo, por ejemplo en una cantidad de al menos 2 g/día. La administración de prebióticos al sujeto puede proseguirse durante al menos una semana más, al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año o indefinidamente después de la determinación de la eficacia prebiótica.

5 Típicamente, si se obtiene una determinación negativa de la eficacia prebiótica (como se indica por ejemplo por un menor nivel de trimetilamina y opcionalmente un mayor nivel de uno o más de los biomarcadores adicionales definidos anteriormente), no se administran prebióticos al sujeto. Esto puede significar que la administración de prebióticos al sujeto se interrumpe, o al menos no se prescribe más al sujeto como parte de un régimen nutricional controlado. Típicamente, en el caso de una indicación de falta de eficacia de los prebióticos, el consumo de prebióticos por el sujeto puede disminuirse al menos en un 50%, al menos en un 75% o al menos en un 90% en comparación con la cantidad de prebióticos consumidos antes de tomar la muestra de ensayo. Por ejemplo, en algunas realizaciones el sujeto puede consumir prebióticos en una cantidad de menos de 2 g/día, menos de 1 g/día, o menos de 0,5 g/día después de que se encuentra que los prebióticos no son eficaces.

15 En realizaciones preferidas, si el método indica que es probable que los prebióticos sean ineficaces, se puede adoptar una estrategia de gestión de peso alternativa para el sujeto. Por ejemplo, para estos sujetos puede ser más beneficioso concentrarse en métodos bien establecidos de prevención de aumento de peso tales como la restricción de calorías en la dieta, la reducción de la ingesta de grasas en la dieta o el aumento de ejercicio. En otras realizaciones, se puede administrar al sujeto un producto alternativo de pérdida de peso (sin prebióticos).

Prevención de trastornos relacionados con la obesidad

20 En algunas realizaciones, una mayor probabilidad de responder a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta puede ser indicativa de un menor riesgo de desarrollar trastornos asociados con obesidad y/o sobrepeso. Los trastornos asociados con el exceso de peso y/o obesidad pueden ser afecciones cardiovasculares tales como aterosclerosis, accidente cerebrovascular y enfermedades del corazón y/o desregulaciones metabólicas incluyendo diabetes. En particular, el riesgo de desarrollar tales condiciones relacionadas con el peso puede disminuir en sujetos que son tanto sensibles a los prebióticos como aquellos que continúan consumiendo prebióticos a largo plazo, por ejemplo como parte de un régimen nutricional controlado. Por el contrario, los sujetos que muestran que no responden a los prebióticos en la prevención del aumento de peso pueden estar en riesgo particular de desarrollar estas condiciones y requieren intervenciones nutricionales o de estilo de vida, adicionales o alternativas.

30 Otros aspectos

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona trimetilamina como un nuevo biomarcador en orina de eficacia prebiótica en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta. La invención también proporciona el uso de trimetilamina como biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

35 El estudio presentado en esta solicitud proporciona una visión de los mecanismos fisiológicos relacionados con el desarrollo de la obesidad inducida por HF (alto contenido de grasa) y particularmente resalta las adaptaciones metabólicas específicas asociadas a la variabilidad del fenotipo obeso. El estudio también investigó, utilizando el la relación del contenido isocalórico y de carbohidratos, el papel de las fibras dietéticas solubles en el aumento de peso inducido por la dieta.

40 La alta ingestión de grasa provoca una rápida y consistente sobrerregulación de las rutas metabólicas mitocondriales que resulta en una mayor producción de energía y una mayor saturación de ácidos grasos mitocondriales. Las firmas metabólicas asociadas a la diferencia en el fenotipo del peso corporal están asociadas con una modulación específica de los procesos biológicos dependientes de la obesidad inducida por el alto contenido de grasa, incluyendo las rutas oxidativas mitocondriales (oxidación de los ácidos grasos β) y el metabolismo bacteriano intestinal (metilaminas, carbohidratos dietéticos y fermentación proteica).

Se impidió el aumento de peso corporal en los grupos de animales que recibieron cualquiera de las intervenciones basadas en prebióticos, con una modulación específica de las firmas metabólicas atribuidas al aumento de peso inducido por la dieta. Las firmas metabólicas moduladas permitieron una predicción precisa de la ganancia final de peso corporal y por lo tanto la evaluación de la eficacia de los prebióticos para prevenir el aumento de peso.

50 Los presentes inventores mostraron que la firma metabólica observada después de sólo una semana de intervención permite la predicción del aumento final de peso corporal al terminar la intervención a largo plazo (70 días). Estos resultados enfatizan el papel de las mitocondrias y la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad e indican que la sensibilidad a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta se puede determinar a partir de una firma metabólica temprana usando los biomarcadores descritos en la presente memoria. La firma

metabólica encapsula las contribuciones tanto del metabolismo energético del huésped como de las características metabólicas de la microbiota intestinal. En consecuencia, este análisis exhaustivo de los mecanismos subyacentes de la adaptación heterogénea a la alimentación con alto contenido de grasa proporciona nuevas y prometedoras perspectivas para los programas de control de peso y soluciones nutricionales personalizadas.

- 5 La invención se describirá ahora a modo de ejemplo solamente, con respecto a las siguientes realizaciones específicas.

EJEMPLOS:

Procedimiento de manipulación de los animales y preparación de la muestra:

- 10 El experimento se llevó a cabo bajo directrices nacionales apropiadas en el Centro de Investigación de Nestlé (NRC, Suiza). Los ratones se mantuvieron en una jaula individual bajo un régimen de luz - oscuridad de 12 h - 12 h y se alimentaron sin restricciones durante todo el experimento. Después de un período de aclimatación de tres semanas con una dieta baja en grasa (Research Diets, EE.UU.), los animales fueron cambiados a uno de los siguientes tratamientos, mientras que un grupo de control se mantuvo con dietas bajas en grasa. Un total de 90 ratones
15 C57BL/6 recibieron en primer lugar una dieta de comida estándar durante tres semanas. Los animales fueron asignados al azar con base en la glucosa en ayunas y el aumento de peso corporal. Al día 0, los ratones se dividieron en 6 grupos de 15 animales, un grupo recibió una dieta de comida estándar mientras que los otros grupos recibieron una dieta rica en grasas suplementada con prebióticos o azúcares.

Las dietas bajas en grasas y altas en grasas se obtuvieron a partir de las dietas estándar baja y rica en grasa de Research Diets, EE.UU., y eran isocalóricas (4057 Kcal/Kg):

- 20 La dieta D09072901i es una dieta para roedores con grasa de 60% de kcal
La dieta D09072902i es una dieta para roedores con grasa de 60% de kcal y 211 g de mezcla A de fibra
La dieta D09072903i es una dieta para roedores con grasa de 60% de kcal y 140 g de mezcla B de fibra
La dieta D09072904i es una dieta para roedores con grasa de 60% de kcal y 100 g de mezcla C de fibra
25 La dieta D09072905i es una dieta para roedores con grasa de 60% de kcal y 35,1 g de dextrosa, 32,3 g de lactosa y 1,45 g de galactosa

La preparación de las dietas se hizo como se describe a continuación:

Para la mezcla A: Prebióticos GOS

Añadir a la dieta 211 g de jarabe o 158,2 g de polvo seco, para un total de 531 Kcal.

En materia seca, 90 g son fibras (258 Kcal) y 68,2 g son azúcares (272,8 kcal).

- 30 Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los diferentes grupos, se eliminaron 258 Kcal de maltodextrina y 272,8 Kcal de sacarosa de sacarosa.

Para la mezcla B: Prebióticos GOS-CMO

Añadir a la dieta 140g de polvo, para un total de 350 Kcal.

En materia seca, 35,7 g son fibras (71,4 kcal) y las restantes 278,6 kcal proceden de azúcares.

- 35 Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los diferentes grupos, se retiraron 75 Kcal de maltodextrina y 275 Kcal de sacarosa.

Para la mezcla C: Inulina y fructooligosacáridos (FOS) - Prebio 1

Para 100 g de producto, añadir 30 g de producto FOS a 70 g de inulina.

Añadir a la dieta 100 g de mezcla C.

En materia seca, 90 g son fibras (116 Kcal), y 10 g son azúcares (40 Kcal).

Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los diferentes grupos, se retiraron 116 Kcal de maltodextrina y 40 Kcal de sacarosa.

Para la mezcla D:

- 5 La mezcla D está compuesta en un 51% por glucosa, 47% por lactosa y 2% por galactosa.

Añadir a la dieta, 68,75 g de Mezcla D, es decir, 275 kcal. (35 g de glucosa, 32,3 g de lactosa, 1,45 g de galactosa).

Para mantener el equilibrio isocalórico entre las dietas diferentes en los diferentes grupos, se retiraron 275 Kcal de sacarosa.

- 10 Durante el estudio experimental, se controlaron a los animales en cuanto a su peso corporal y composición, consumo de agua y alimentos. La diferencia en la ganancia de peso se evaluó mediante una prueba no paramétrica (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney U).

Hay una disminución significativa en el aumento de peso de la dieta alta en grasas recibida por los animales en combinación con los prebióticos cuando se compara con los animales alimentados con una dieta con alto contenido de FI a través del tiempo.

- 15 Se recogieron muestras de orina semanalmente, es decir, las tres semanas antes del cambio de dieta (D-21 a D0) y 10 semanas durante las intervenciones nutricionales (D0 a D70). Todas las muestras fueron congeladas instantáneamente a -80°C hasta su análisis.

Espectroscopia de RMN ¹H

- 20 Se diluyó un volumen de 40 µl de orina en 20 µl de solución reguladora (NaHPO₄, 0,6 M pH = 7) que contenía azida sódica (3 mM) y TSP (0,5 mM). Después de la centrifugación, se transfirieron las muestras a tubos de RMN de 1,7 mm de diámetro usando una jeringuilla. Los espectros de RMN ¹H se registraron luego en un espectrómetro de 600,13 MHz, realizando 64 barridos de una secuencia estándar con 64 K puntos de datos. La temperatura del experimento de RMN se mantuvo a 300 K. El procesamiento de los espectros de orina se llevó a cabo utilizando el software TOPSPIN 2,0 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). Para cada espectro, los FID se multiplicaron por una función exponencial correspondiente a un ancho de línea de 1 Hz, antes de ser transformado en un espectro por un transformador de Fourier. La fase y la línea base de los espectros se corrigieron luego manualmente. El desplazamiento químico se calibró usando la señal TSP a δ 0,0. Las asignaciones espectrales se lograron mediante el uso de STOCSY (espectroscopia de correlación estadística total), bases de datos espectrales y asignación publicada.

- 30 Procesamiento de datos y análisis de datos multivariable:

Los datos espectrales (de 60,2 a 69,5) fueron finalmente importados en el software Matlab (versión, The Mathworks Inc., Natick, MA) y se transformaron en 22 K puntos de datos. Se eliminó la resonancia del pico del agua (64,7-5,05) de cada espectro con el fin de eliminar la variabilidad ligada a la saturación previa de la resonancia del agua. Se normalizaron luego los espectros de RMN ¹H sobre el área total y se aplicaron diferentes estadísticas multivariadas (PCA, OPLS y OPLS-DA) mediante el uso del ajuste de "varianza unitaria".

- 40 Se integraron los metabolitos intermedios del metabolismo conjunto microbiano del intestino del huésped, así como de la oxidación β del huésped, la oxidación de los BCAA, el ciclo de Krebs y las rutas del dinucleótido de nicotinamida adenina asignables en los espectros de RMN ¹H de la orina para evaluar la excreción urinaria de estos metabolitos a través del tiempo para cada animal individual para cada grupo. Los datos también se analizaron mediante análisis multivariable en combinación con un análisis de una sola variable para seleccionar los patrones asociados con el aumento de peso y las especificidades de grupo.

Principales hallazgos y aspectos destacados:

Variabilidad del aumento de peso corporal en ratones C57BL/6J alimentados con HFD con o sin prebióticos.

- 45 Los resultados sobre el peso corporal (BW) y la ganancia de peso corporal son muy consistentes. Ya en el día 7, los BW las ganancias de BW en la mayoría de los grupos de prebióticos son significativamente más bajas que en el grupo con alto contenido de grasas y la diferencia aumenta hasta el día 70 (Figura 1). Sin embargo, al final del estudio, todos los grupos también son significativamente más altos que el grupo de control alimentado con una dieta

baja en grasas. El tiempo en que esta diferencia finalmente se hace significativa difiere de un grupo prebiótico al otro. El grupo Prebio 1 (inulina + prebióticos FOS) es ya más alto en estos parámetros que el grupo Ctrl al día 21 (BWG) o 35 (BW) y es muy diferente el día 70 (BW 2,81 [1,19; 4,43] p = 0,0023; BWG 2,46 [1,12; 3,81] p = 0,0013).

5 El perfil metabólico de la orina indica la firma metabólica sostenida asociada a la obesidad inducida por alto contenido de grasas

10 Para investigar la firma metabólica específica asociada con el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta, se adquirieron perfiles metabólicos de la orina durante un período de 13 semanas (Figura 1). Los perfiles metabólicos de la orina de ratones alimentados con una dieta baja en grasas, alta en grasas y alta en grasas con prebióticos se integraron luego con el peso corporal y el aumento de peso corporal. Con base en este análisis utilizando los perfiles metabólicos completos, las firmas metabólicas podrían atribuirse al aumento de peso.

15 Se integraron las señales representativas de los metabolitos más influyentes y se realizaron análisis adicionales usando análisis de datos multivariantes usando datos del Día 0, Día 7 y Día 70 para identificar los mejores predictores tempranos de aumento de peso. Cada modelo fue calculado utilizando un componente predictivo y varios componentes ortogonales. El número óptimo de componentes ortogonales se determinó mediante las estadísticas de bondad de ajuste R^2Y y Q^2Y (Figura 2). Se generó un primer modelo utilizando 35 metabolitos y luego se generó un segundo modelo utilizando los 12 principales metabolitos (tal como se define por el gráfico de importancia de la variable, y los valores de los coeficientes de correlación, Figuras 2 y 3). Para cada modelo, la matriz de confusión mostró una muy buena capacidad de modelo para la estratificación de grupos de animales.

20 Se identificaron metabolitos con el mayor coeficiente de correlación, lo que indica que las variaciones metabólicas urinarias encapsulan una modulación tanto del metabolismo microbiano del huésped como del intestino. En particular, el nivel de metabolitos de carnitina, acilcarnitina, ácido tricarbóxico y los compuestos intermedios de la oxidación de aminoácidos de cadena ramificada se correlacionaron significativamente con el aumento de peso. Por el contrario, los niveles de derivados de metilamina producidos a partir del metabolismo microbiano de la colina (trimetilamina (TMA) y trimetilamina (TMAO)), así como la taurina, mostraron relaciones negativas con el aumento de peso. Además, los productos finales de la degradación de aminoácidos aromáticos por las bacterias intestinales (fenilacetilglicina, sulfato de indoxilo) también mostraron una relación positiva con el aumento de peso.

25 El patrón metabólico en orina de la excreción de metabolitos resalta una adaptación metabólica específica asociada al aumento de peso inducido por la dieta y la prevención mediante prebióticos

30 La aplicación de análisis de datos similares para el modelado de datos entre grupos ha revelado especificidades de grupo en términos de adaptación metabólica microbiana del huésped y del intestino, lo que puede estar relacionado con la reducción beneficiosa en el aumento de peso corporal.

35 En particular, el grado de variación en el nivel urinario de metabolitos conjuntos microbianos intestinales, incluyendo TMA, TMAO, fenilacetilglicina, sulfato de indoxilo, sugiere un cambio dependiente del tiempo y la nutrición en el procesamiento metabólico del componente dietético por la microbiota intestinal. Mientras que los niveles urinarios de TMA y TMAO se reducen significativamente con una dieta rica en grasas, la suplementación prebiótica tiende a prevenir la disminución de la producción de TMA por la microbiota intestinal y el posterior procesamiento hepático para TMAO. Por el contrario, mientras que la concentración de sulfato de indoxilo y fenilacetilglicina en orina tiende a disminuir ligeramente con la dieta rica en grasas, se observa una mayor reducción con la suplementación prebiótica. Estas observaciones tomadas en conjunto con la fuerte correlación con el aumento de peso corporal tienden a ilustrar que la eficacia de la modulación prebiótica de la microbiota intestinal es esencial para mediar en el beneficio de la prevención del aumento de peso.

40 Por lo tanto, el tratamiento con HFD puede implicar cambios significativos en la actividad de la microbiota intestinal, ya sea previniéndola con prebiótico (TMA/TMAO) o compensada por otros procesos microbianos tales como la fermentación proteolítica (fenilacetilglicina, sulfato de indoxilo).

45 Paralelamente, estos cambios microbianos intestinales están asociados con una modulación significativa del metabolismo energético central del huésped.

50 La excreción de isovalerilglicina y α -cetoisovalerato aumentó de forma significativa y consistente en el grupo alimentado con HFD en comparación con el grupo alimentado con LFD a través del tiempo, por lo que constituyen biomarcadores candidatos cualitativos y estables de DIO. La suplementación prebiótica resultó en la prevención de estos cambios, como se observó con un mantenimiento o ligera disminución en el nivel urinario de α -cetoisovalerato, y un aumento tardío en la isovalerilglicina. Este último cambio y concentraciones similares que se observaron en el Día 70 a través de los grupos con y sin prebióticos, sugirieron que el fenotipo de sobrepeso el día 70 indujo un cambio significativo en el metabolismo energético. Sin embargo, su retraso en el período de adaptación metabólica con el cambio de la dieta parece correlacionarse con la eficacia prebiótica en la prevención del aumento de peso.

Además, también se observó un efecto transitorio similar en la excreción urinaria de creatinina, un marcador bien aceptado de masa magra y metabolismo muscular.

Además, el efecto beneficioso de los prebióticos se pudo observar a través de los cambios específicos en el compuesto intermedio oxaloacetato del ácido tricarbóxico y el tartrato relacionado, lo que sugiere una modulación de la producción de energía asociada con un uso diferencial de nutrientes para alimentar el cuerpo.

Finalmente, se observaron algunas especificidades en relación con el metabolismo de la carnitina y la acilcarnitina, con efecto inferido sobre la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo mitocondrial, con una estimulación específica de los procesos fisiológicos relacionados en animales que recibieron prebióticos GOS-CMOS.

Además, para evaluar la relación entre los cambios metabólicos tempranos en la excreción urinaria de metabolitos y el aumento de peso, se calculó la relación de cambio del metabolito en la primera semana después del cambio de dieta y se comparó la fuerza de la asociación con el aumento de peso con la concentración relativa de metabolitos y su relación con la concentración de creatinina (Tabla 1). El análisis mostró alguna correlación fuerte y consistente entre el aumento de peso y la relación de cambio y la concentración relativa de los metabolitos, incluyendo alfa-ceto-isovalerato, sulfato de indoxilo, trimetalimina, fenilacetilglicina, oxaloacetato y creatinina. Además, se reporta la relación de cambios después de una semana y después de 70 días de la dieta rica en grasa con y sin prebióticos para cada grupo y para el aumento de peso corporal (Tabla 2).

Las observaciones anteriores sobre la asociación de metabolitos específicos con el aumento de peso, su modulación específica por los prebióticos y su identificación como indicadores metabólicos tempranos de la respuesta a la intervención prebiótica, los biomarcadores descritos aquí permiten el diagnóstico de la probabilidad de responder positivamente a la intervención nutricional basada en prebióticos para la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

Se investigó previamente la regulación del metabolismo mitocondrial en ratones alimentados con HFD usando un enfoque metabonómico. La excreción urinaria de los compuestos intermedios de oxidación β : hexanoilglicina, carnitina y acilcarnitina se incrementó consistentemente en la orina de ratones alimentados con HF en comparación con los ratones alimentados con LF, lo que sugiere un aumento desbordado de ácidos grasos en la mitocondria y una activación de la oxidación β . En el presente estudio, los prebióticos tienden a promover un aumento adicional en estos procesos metabólicos, lo que sugiere una oxidación más eficaz de ácidos grasos, que se mantiene con el tiempo.

La leucina, la valina, la isoleucina, así como los compuestos intermedios del catabolismo de BCAA (isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetooisovalerato) aumentaron de manera significativa y consistente en ratones alimentados con HF lo que apoya la hipótesis de la sobre-regulación asociada a HFD del catabolismo de BCAA. En el presente estudio, los prebióticos tienden a prevenir el aumento específico del catabolismo de isoleucina como se observa con el mantenimiento de niveles normales de alfa-ceto-iso-valerato.

El catabolismo de valina e isoleucina puede estar sobre-regulado en ratones alimentados con HF lo que induce la formación de succinil-CoA y la producción de los siguientes compuestos intermedios del ciclo de Krebs. Sorprendentemente, los otros compuestos intermedios del ciclo de Krebs (citrato, cis-aconitasa, α -cetogluturato) no fueron significativamente diferentes entre los ratones alimentados con LF y HF lo que sugiere una desconexión entre el catabolismo de leucina y la oxidación beta produciendo acetil-CoA y el ciclo de Krebs. Regulaciones metabólicas específicas podrían desviar el flujo de acetil-CoA hacia otras vías metabólicas. Estos resultados confirman que HFD induce una sobre-regulación de las vías oxidativas mitocondriales y el ciclo de Krebs, lo que podría conducir a un aumento de la producción de energía. En el presente estudio, los prebióticos tienden a inducir una modulación profunda de los compuestos intermedios del ciclo de Krebs lo que sugiere un metabolismo diferencial de las vías oxidativas mitocondriales.

Finalmente, los hallazgos actuales mostraron que la modulación prebiótica de las actividades microbianas intestinales y posteriormente el metabolismo adicional por el huésped de los productos derivados, pueden ser esenciales en la mediación de los beneficios por el aumento de peso. Además, la adaptación metabólica temprana a los cambios en la dieta parece correlacionarse con el fenotipo metabólico y antropométrico final adquirido de los animales, haciendo que los metabolitos relacionados con los microbios intestinales sean marcadores clave para futuras soluciones nutricionales personalizadas de control de peso.

50 Realizaciones adicionales

También se describen realizaciones como las descritas en los siguientes párrafos numerados.

1. Un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta, que comprende

- a) determinar un nivel de sulfato de indoxilo en una muestra de orina obtenida de un sujeto que ha consumido prebióticos, y
- b) comparar el nivel de sulfato de indoxilo del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 5 en donde un menor nivel de sulfato de indoxilo o una ausencia de cambio en el nivel de sulfato de indoxilo en la muestra de orina comparado con el valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por dieta en el sujeto.
2. Un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta, que comprende
- 10 a) determinar un nivel de alfa-ceto-isovalerato en una muestra de orina obtenida de un sujeto que ha consumido prebióticos, y
- b) comparar el nivel de alfa-ceto-isovalerato del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en donde un menor nivel de alfa-ceto-isovalerato, o una ausencia de cambio en el nivel de alfa-ceto-isovalerato, en la muestra de orina comparado con el valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por dieta en el sujeto.
- 15 3. El método del párrafo 1 o párrafo 2, en donde la dieta es una dieta alta en grasas.
4. El método de cualquier párrafo precedente, que comprende además las etapas de
- a) determinar el nivel de al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en trimetilamina, oxaloacetato, creatinina, sulfato de indoxilo y alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina, y
- b) comparar el nivel en el sujeto del al menos un biomarcador adicional con un valor de referencia predeterminado,
- 20 en donde:
- (i) un menor nivel de oxaloacetato, creatinina, sulfato de indoxilo y/o alfa-ceto-isovalerato, o una ausencia de cambio en el nivel de oxaloacetato, creatinina, sulfato de indoxilo y/o alfa-ceto-isovalerato, en la muestra de orina; y/o
- (ii) un aumento en el nivel de trimetilamina, o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina, en la muestra de orina,
- 25 en comparación con los valores de referencia predeterminados indica que la administración de prebióticos será eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por dieta en el sujeto.
5. El método de acuerdo con cualquier párrafo precedente, en donde los niveles de los biomarcadores en la muestra de orina se determinan por RMN ¹H y/o espectrometría de masas.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquier párrafo precedente, en donde el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de sulfato de indoxilo y/o de alfa-ceto-isovalerato en orina en una población control de sujetos que consumen una dieta rica en grasas.
7. El método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 5, en donde el valor de referencia predeterminado es el nivel de sulfato de indoxilo y/o el nivel de alfa-ceto-isovalerato en orina en el sujeto antes de consumir los prebióticos.
- 35 8. El método de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde se determinan el nivel de sulfato de indoxilo, alfa-ceto-isovalerato y/o los biomarcadores adicionales en una muestra de orina obtenida del sujeto después de al menos tres días consecutivos de consumo de prebióticos.
9. El método de acuerdo con cualquier párrafo precedente, en donde el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en oligosacáridos, que contienen opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, en particular
- 40 fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de los mismos.
10. El método de acuerdo con el párrafo 9, en donde los prebióticos se seleccionan del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos (FOS); galacto-oligosacáridos (GOS); isomalto-oligosacáridos; xilo-oligosacáridos; oligosacáridos de leche de bovino (BMOS); glicosil sacarosa (GS); lactosacarosa (LS); lactulosa (LA); palatinosa-oligosacáridos (PAO);

malto-oligosacáridos (MOS); gomas y/o hidrolizados de los mismos; pectinas y/o hidrolizados de los mismos; y combinaciones de los mismos.

11. El método del párrafo 10, en donde los prebióticos comprenden (a) galactooligosacáridos (GOS) (b) oligosacáridos de leche bovina (BMOS) o (c) inulina y fructooligosacáridos (FOS).

5 12. El método del párrafo 11, en donde los oligosacáridos de leche bovina (BMOS) comprenden oligosacáridos-galactooligosacáridos de leche de vaca (CMOS-GOS).

13. El método de acuerdo con cualquier párrafo precedente, en donde el sujeto ha consumido los prebióticos en una cantidad de al menos 2 g/día.

10 14. El método de acuerdo con cualquier párrafo precedente, en donde el sujeto es un mamífero tal como un ser humano; una especie no humana, incluyendo un primate; un animal de ganado tal como una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un burro o una cabra; animales de ensayo de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas o hámsteres; o un animal de compañía como un perro o un gato.

15. El método de acuerdo con cualquier párrafo precedente, en donde el método se usa para diseñar una dieta estratificada para un grupo de sujetos o una dieta personalizada para el sujeto.

15 16. Un método para prevenir la ganancia de peso inducida por la dieta en un sujeto, que comprende:

a) llevar a cabo un método como se describe en cualquiera de los párrafos 1 a 15; y

b) administrar prebióticos al sujeto si el nivel de sulfato de indoxilo y/o alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina disminuye o no cambia en comparación con el valor de referencia predeterminado.

20 17. Un método de acuerdo con el párrafo 16, en donde la administración de prebióticos al sujeto se continúa durante al menos un mes.

18. Un método de acuerdo con el párrafo 16, en donde si el nivel de sulfato de indoxilo y/o de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina aumenta con respecto a la muestra de referencia predeterminada, no se administran prebióticos al sujeto.

25 19. Un método de acuerdo con el párrafo 18, en donde se proporciona un tratamiento alternativo para la prevención del aumento de peso del sujeto, seleccionado el tratamiento de la restricción de calorías, la reducción de la ingesta de grasas en la dieta, un producto de pérdida de peso no prebiótico o un programa de ejercicio.

20. Un biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta, en donde el biomarcador es sulfato de indoxilo.

30 21. Un biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta, en donde el biomarcador es alfa-ceto-isovalerato.

22. Uso de sulfato de indoxilo como biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

23. Uso del alfa-ceto-isovalerato como biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

35 Aunque la invención ha sido descrita a modo de ejemplo, debe apreciarse que pueden realizarse variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones. Además, cuando existen equivalentes conocidos para características específicas, tales equivalentes se incorporan como si se mencionaran específicamente a esta especificación. Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de las figuras y ejemplos no limitativos.

40 Los expertos en la técnica entenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención descritas en la presente memoria. En particular, pueden combinarse las características descritas para diferentes realizaciones de la presente invención.

45 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva, las palabras "comprende", "que comprende", y palabras similares, no deben ser interpretadas en un sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, tienen la intención de significar "incluyendo, pero no limitado a".

Cualquier referencia a los documentos de la técnica anterior en esta memoria descriptiva no debe considerarse una admisión de que tal técnica anterior es ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en el campo.

5

Tabla 1: Resumen de las relaciones entre los metabolitos y el aumento de peso en el aumento de peso inducido por alto contenido de grasa

	Coeficiente de correlación con el aumento de peso en animales alimentados con alto contenido de grasa (valor r)		
Metabolitos	Relación de cambio (T7/T0)	Concentración de T7	Relación de metabolito/creatinina T7
Acil-carnitina	0,158253393	0,098288017	-0,139618561
Carnitina	-0,138725606	-0,129539973	-0,216813487
Creatinina	0,306373827	0,402834663	No aplicable
Sulfato de indoxilo	0,655850247	0,680973297	0,607275477
Isovalerilglicina	0,153748589	0,307939099	0,005581991
Oxaloacetato	0,729067593	0,750868285	0,659882916
Fenilacetilglicina	0,525457288	0,574980126	0,498217971
Tartrato	0,018061809	0,273162626	0,127048017
Taurina	-0,15540473	-0,275405566	-0,339707993
TMA	-0,235079974	-0,24950404	-0,282660746
TMAO	-0,058723531	-0,208883241	-0,300038561
Alfa-ceto-isovalerato	0,375628295	0,392090066	0,061032612

Tabla 2: Resumen de la relación de cambio en los metabolitos seleccionados a lo largo del tiempo en animales alimentados con una dieta rica en grasas con y sin prebióticos

Metabolito	Grupo	Relación de cambio (T7- T0)	Relación de cambio (T70- T0)
Aumento de peso corporal	Control bajo en grasa	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Control alto en grasa	1,1 ± 0,0	1,6 ± 0,2
	Alto en grasa y GOS	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1
	Alto en grasa y GOSCMOS	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,1
	Alto en grasa y Prebio1	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1
	Alto en grasa y lactosa	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1

ES 2 616 509 T3

Acil-carnitina	Control bajo en grasa	93,3 ± 26	95,7 ± 21,4
	Control alto en grasa	108 ± 15,3	112,4 ± 13,8
	Alto en grasa y GOS	84,8 ± 11,6	88,9 ± 11
	Alto en grasa y GOSCMOS	126 ± 15,9	109,2 ± 17,3
	Alto en grasa y Prebio1	96,2 ± 28,1	108,3 ± 29,8
	Alto en grasa y lactosa	105 ± 14,8	112,2 ± 16,1
Carnitina	Control bajo en grasa	101,8 ± 18,6	110,4 ± 16
	Control alto en grasa	115,9 ± 14,1	130,9 ± 17,9
	Alto en grasa y GOS	102,1 ± 13,4	122,9 ± 13,6
	Alto en grasa y GOSCMOS	226,2 ± 33,3	293,6 ± 39,4
	Alto en grasa y Prebio1	101,7 ± 9,6	127 ± 13,6
	Alto en grasa y lactosa	119,7 ± 8,6	132,2 ± 14,1
Creatinina	Control bajo en grasa	104,4 ± 18,7	118,5 ± 19,5
	Control alto en grasa	100,3 ± 17,4	131,4 ± 27,3
	Alto en grasa y GOS	86,8 ± 24,1	109,8 ± 30,9
	Alto en grasa y GOSCMOS	87,1 ± 10,8	93,1 ± 15,1
	Alto en grasa y Prebio1	91,6 ± 10,9	107,6 ± 17,1
	Alto en grasa y lactosa	106,2 ± 16	125,4 ± 18
Sulfato de indoxilo	Control bajo en grasa	99,6 ± 26	119,8 ± 34,6
	Control alto en grasa	96,1 ± 23,7	118,3 ± 49,8
	Alto en grasa y GOS	46,7 ± 9,4	56,1 ± 11,4
	Alto en grasa y GOSCMOS	50,8 ± 12,1	48,9 ± 10,6
	Alto en grasa y Prebio1	54,6 ± 16,8	68 ± 21,7
	Alto en grasa y lactosa	86,7 ± 23,9	99 ± 32,3
Isovalerilglicina	Control bajo en grasa	105,4 ± 18,8	106,8 ± 42,5

ES 2 616 509 T3

	Control alto en grasa	128 ± 30,4	131,3 ± 38,2
	Alto en grasa y GOS	118,2 ± 28,2	143,5 ± 45,2
	Alto en grasa y GOSCMOS	116,5 ± 16,5	116,1 ± 18,3
	Alto en grasa y Prebio1	129,1 ± 28,6	137,7 ± 24,4
	Alto en grasa y lactosa	130,2 ± 24,2	125,7 ± 25,8

(continuación)

Metabolito	Grupo	Relación de cambio (T7- T0)	Relación de cambio (T70- T0)
Oxaloacetato	Control bajo en grasa	101,1 ± 24,7	111,9 ± 19,4
	Control alto en grasa	103,2 ± 18,4	120,7 ± 30,7
	Alto en grasa y GOS	66,2 ± 7,6	68,8 ± 7,7
	Alto en grasa y GOSCMOS	64,6 ± 8,4	59,3 ± 7,9
	Alto en grasa y Prebio1	69,5 ± 12,5	71,9 ± 13
	Alto en grasa y lactosa	95,2 ± 14,7	102,3 ± 17,5
Fenilacetilglicina	Control bajo en grasa	107,2 ± 20,2	128,9 ± 34,8
	Control alto en grasa	77,7 ± 15,6	102,3 ± 28,5
	Alto en grasa y GOS	41,8 ± 8,6	82,7 ± 36,4
	Alto en grasa y GOSCMOS	42,5 ± 10,3	55,2 ± 17,7
	Alto en grasa y Prebio1	50,4 ± 23,3	69,3 ± 27,6
	Alto en grasa y lactosa	72,4 ± 15	91,5 ± 14,8
Tarrato	Control bajo en grasa	94,6 ± 36,3	114 ± 72,8
	Control alto en grasa	123,1 ± 40,3	172,4 ± 104
	Alto en grasa y GOS	117 ± 60,8	117,4 ± 84,3
	Alto en grasa y GOSCMOS	95,3 ± 38,1	111,2 ± 46,9
	Alto en grasa y Prebio1	123 ± 111,7	139,7 ± 103,4
	Alto en grasa y lactosa	115,3 ± 52	150,5 ± 62,9

ES 2 616 509 T3

Taurina	Control bajo en grasa	90,8 ± 24,6	117,1 ± 69,1
	Control alto en grasa	81,9 ± 39,6	72,6 ± 33,2
	Alto en grasa y GOS	93,1 ± 45,4	75,1 ± 46,1
	Alto en grasa y GOSCMOS	86,1 ± 45,9	89,4 ± 46,3
	Alto en grasa y Prebio1	127,3 ± 53,6	104,6 ± 40,5
	Alto en grasa y lactosa	120,8 ± 68,1	129,9 ± 87,8
Trimetilamina (TMA)	Control bajo en grasa	134,1 ± 138,4	160,6 ± 170,9
	Control alto en grasa	45,6 ± 35	44,5 ± 38,4
	Alto en grasa y GOS	37,8 ± 23,9	39,7 ± 23
	Alto en grasa y GOSCMOS	118,7 ± 78,7	125,5 ± 57,9
	Alto en grasa y Prebio1	94,5 ± 74,4	106 ± 122,4
	Alto en grasa y lactosa	62,6 ± 53,5	51,6 ± 38,1
Trimetilamina-N-Óxido (TMAO)	Control bajo en grasa	83,7 ± 34,8	122,2 ± 73,2
	Control alto en grasa	80,1 ± 40,1	72,5 ± 31,4
	Alto en grasa y GOS	79,3 ± 41,1	74,3 ± 36,8
	Alto en grasa y GOSCMOS	82,4 ± 39,9	110,6 ± 58,7
	Alto en grasa y Prebio1	101,2 ± 39,3	94,4 ± 43,3
	Alto en grasa y lactosa	101,4 ± 50,7	98,5 ± 44,6
Alfa-ceto-isovalerato	Control bajo en grasa	106,8 ± 10,3	94,8 ± 15
	Control alto en grasa	150,4 ± 26,1	119,7 ± 20,7
	Alto en grasa y GOS	124,1 ± 20,6	124,4 ± 21
	Alto en grasa y GOSCMOS	132 ± 14,3	120 ± 17,3
	Alto en grasa y Prebio1	126 ± 23,9	125,1 ± 18,1
	Alto en grasa y lactosa	147,6 ± 15,7	126,8 ± 13,7

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta, que comprende
- 5 a) determinar un nivel de trimetilamina en una muestra de orina obtenida de un sujeto que ha consumido prebióticos, y
- b) comparar el nivel de trimetilamina del sujeto con un valor de referencia predeterminado, dicho valor de referencia predeterminado de trimetilamina se basa en un nivel medio de trimetilamina en orina en una población de control de sujetos que consumen una dieta rica en grasas y antes de consumir los prebióticos
- 10 en donde un menor nivel de trimetilamina o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina en la muestra de orina comparado con el valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es eficaz en la prevención del aumento de peso inducido por dieta en el sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la dieta es una dieta rica en grasas.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además las etapas de
- 15 a) determinar el nivel de al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina, y
- b) comparar el nivel en el sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia predeterminado,
- 20 en donde un menor nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o alfa-ceto-isovalerato, o una ausencia de cambio en el nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o alfa-ceto-isovalerato, en la muestra de orina comparado con los valores de referencia predeterminados, indica que la administración de prebióticos será eficaz en la prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta en el sujeto.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los niveles de los biomarcadores en la muestra de orina se determinan mediante RMN 1H y/o espectrometría de masas.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de trimetilamina, oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o alfa-ceto-isovalerato en orina en una población de control de sujetos que consumen una dieta rica en grasas.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el valor de referencia predeterminado es el nivel de trimetilamina, oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y/o alfa-ceto-isovalerato en la orina en el sujeto antes de consumir los prebióticos.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de trimetilamina y/o los biomarcadores adicionales se determinan en una muestra de orina obtenida del sujeto después de al menos tres días consecutivos de consumo de prebióticos.
- 30 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en oligosacáridos, que contienen opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, en particular fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de los mismos.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los prebióticos se seleccionan del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos (FOS); galacto-oligosacáridos (GOS); isomalto-oligosacáridos; xilo-oligosacáridos; oligosacáridos de leche de bovino (BMOS); glicosilsacarosa (GS); lactosacarosa (LS); lactulosa (LA); palatinosa-oligosacáridos (PAO); malto-oligosacáridos (MOS); gomas y/o hidrolizados de las mismas; pectinas y/o hidrolizados de las mismas; y combinaciones de los mismos.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en donde los prebióticos comprenden (a) oligosacáridos de leche bovina (BMOS) o (b) inulina y fructooligosacáridos (FOS).
11. El método de la reivindicación 10, en donde los oligosacáridos de leche bovina (BMOS) comprenden oligosacáridos-galactooligosacáridos de leche de vaca (CMOS-GOS).
- 45 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto ha consumido los prebióticos en una cantidad de al menos 2 g/día.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto es un mamífero tal como un ser humano; una especie no humana, incluyendo un primate; un animal de ganado tal como una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un burro o una cabra; animales de ensayo de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas o hámsteres; o un animal de compañía tal como un perro o un gato.
- 5 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método se usa para diseñar una dieta estratificada para un grupo de sujetos o una dieta personalizada para el sujeto.
15. Uso de trimetilamina como biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

Figura 1

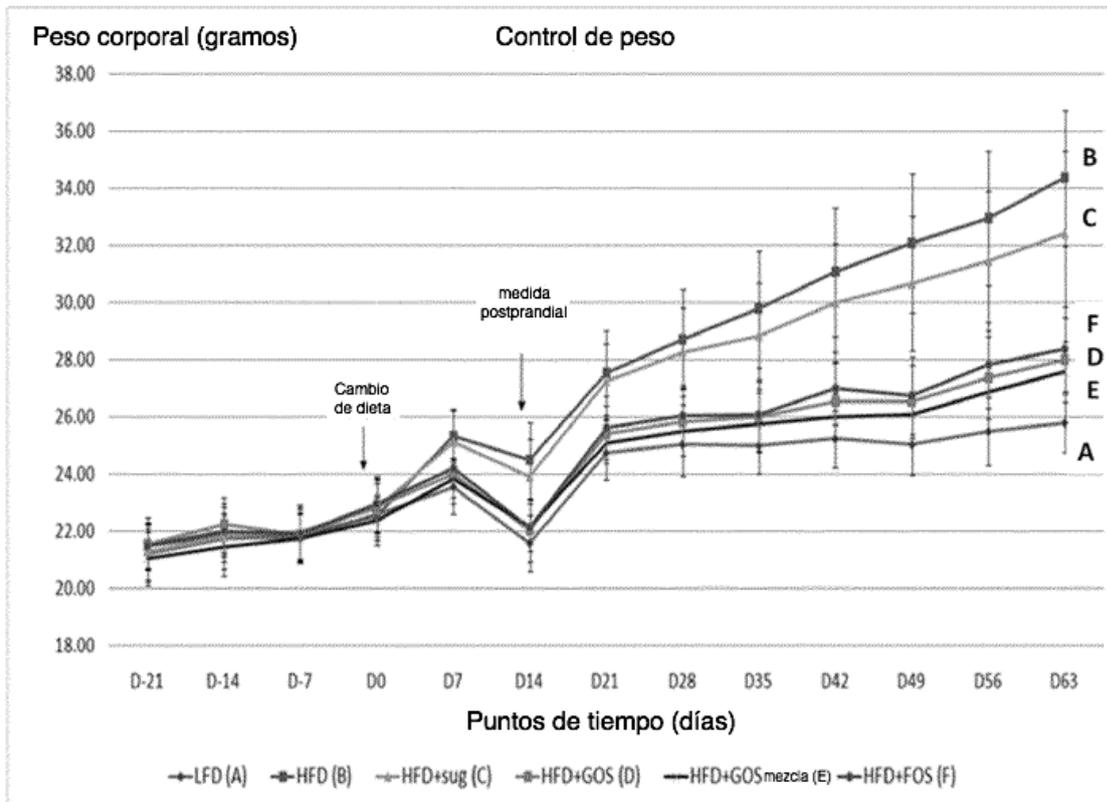


Figura 2

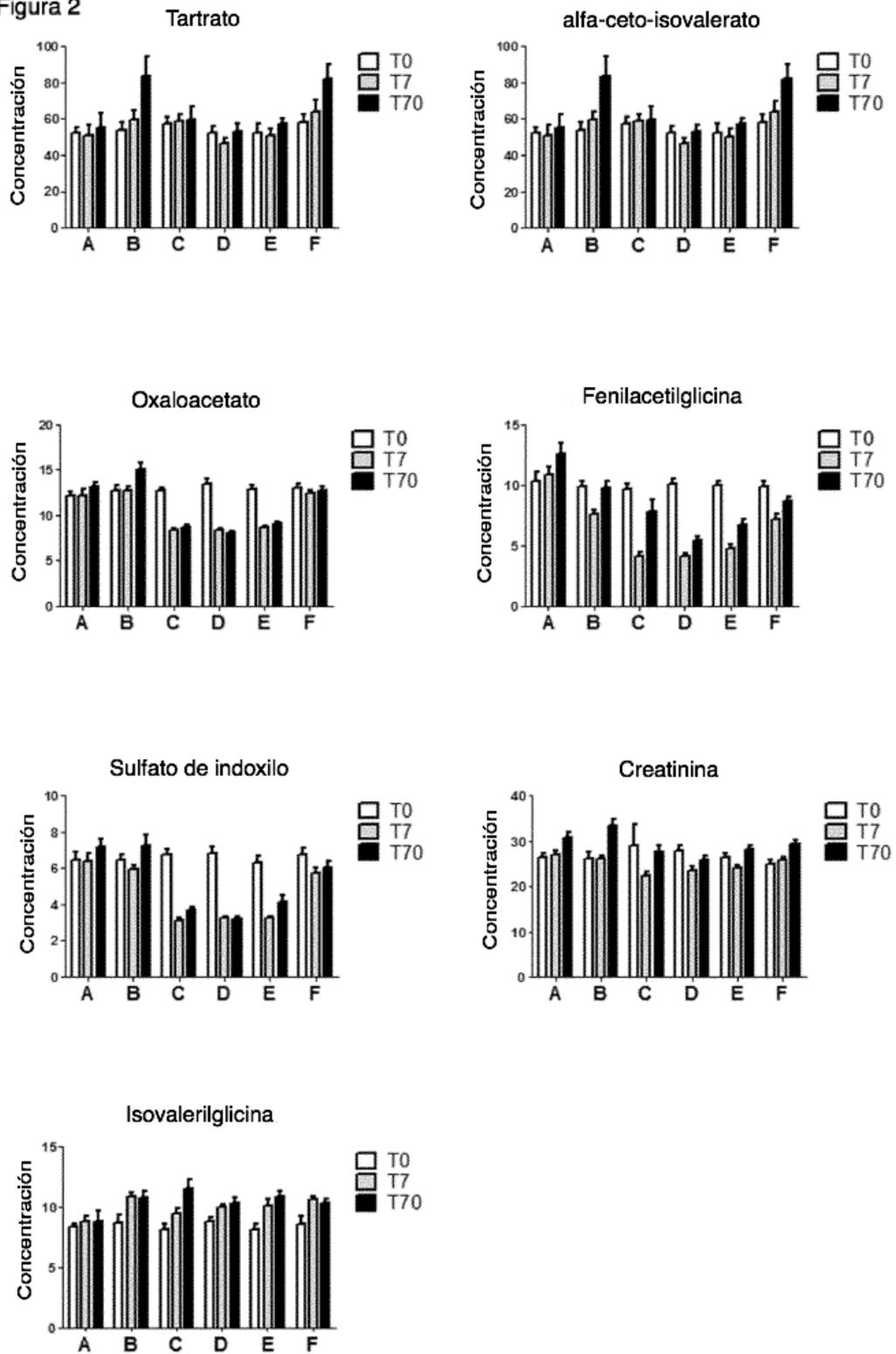


Figura 3

