

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 218**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/493 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/EP2014/054913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14709667 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2979088**

54 Título: **Alfa-ceto-isovalerato como biomarcador de la eficacia de los prebióticos para prevenir la ganancia de peso**

30 Prioridad:

28.03.2013 EP 13161511

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

09.07.2018

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 2 675 218 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

Alfa-ceto-isovalerato como biomarcador de la eficacia de los prebióticos para prevenir la ganancia de peso

5 **ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION**

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 la dieta, y a los biomarcadores empleados en dicho método.

10

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

La obesidad es un problema importante de salud pública, ya que aumenta el riesgo de padecer varias enfermedades crónicas de prevalencia creciente. La obesidad es debida a un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, que está relacionado con una inflamación crónica de bajo nivel. Se sabe que contribuye al riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2), enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), cáncer, osteoartritis y enfermedad cardiovascular (ECV). La obesidad es el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales, como una dieta muy calórica y falta de actividad física, y los estudios recientes también han sugerido que la microbiota intestinal puede tener un papel en el desarrollo de la obesidad. Una dieta desequilibrada rica en grasas y/o hidratos de carbono se relaciona con el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo, el músculo, el hígado y el corazón. También se cree que la deposición de grasa ectópica, sobre todo en caso de una distribución central, contribuye a una variedad de trastornos metabólicos como la hipertrigliceridemia, la hipertensión, la glucosa en ayunas y la resistencia a la insulina (RI).

15

20

25

30

35

Se considera que los microbios intestinales contribuyen a regular el peso corporal y trastornos relacionados, influyendo en las funciones metabólicas e inmunológicas del huésped. La microbiota intestinal en conjunto mejora la capacidad del huésped para extraer y almacenar energía del aumento de peso corporal debido a la dieta, mientras que al parecer los microbios comensales específicos producen efectos beneficiosos en el metabolismo de las sales biliares, de las lipoproteínas y del colesterol. La microbiota intestinal y algunos probióticos también regulan funciones inmunológicas, protegiendo al huésped de infecciones e inflamaciones crónicas. En cambio la disbiosis y la endotoxemia pueden ser factores inflamatorios responsables del desarrollo de resistencia a la insulina y aumento de peso corporal. Teniendo en cuenta el vínculo entre la microbiota intestinal, el metabolismo y la inmunidad, es probable que el uso de estrategias dietéticas para modular la composición de la microbiota sea efectivo para controlar los trastornos metabólicos. Aunque hasta la fecha solo existen unos pocos ensayos preclínicos y clínicos que hayan demostrado los efectos de microbios intestinales específicos y prebióticos en los marcadores biológicos de dichos trastornos, los hallazgos indican que los avances en este campo podrían ser valiosos en la lucha contra la obesidad y los trastornos metabólicos relacionados con ella (Sanz y otros 2008).

40

45

La patente WO 2012/024638 revela un método para determinar el efecto del tratamiento prebiótico en la prevención de la obesidad mediante un modelo murino DiO. Boulange y otros (Journal of Proteome Research, vol. 12, nº 4, 5 de abril de 2013, páginas 1956-1968) revelan que la pronta adaptación metabólica de los ratones C57BL/6 resistentes al aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas implica una activación de vías oxidativas mitocondriales. Trigg y otros (American Journal of Clinical Nutrition, vol. 28, nº 9, 1 de septiembre de 1975, páginas 947-949) revelan que los ratones carentes de leucina sometidos a una dieta suplementada con el precursor inmediato de la leucina, el ácido alfa-cetoisocaproico, recuperan el peso perdido. Esta ganancia de peso es similar a la observada cuando a los ratones privados de leucina se les proporciona leucina en su dieta. Los ratones con una dieta libre de leucina suplementada con ácido alfa-cetoisovalérico, el primer compuesto en la vía biosintética de la leucina, siguieron perdiendo peso tan rápidamente como los ratones con dietas carentes de leucina.

50

55

60

Datos recientes, tanto de modelos experimentales como de estudios con humanos, respaldan los efectos beneficiosos de determinados productos alimenticios con propiedades prebióticas en la homeostasis energética, la regulación de la saciedad y el aumento de peso corporal. En conjunto, con datos de animales y pacientes obesos, estos estudios respaldan la hipótesis de que la composición de la microbiota intestinal (especialmente el número de bifidobacterias) puede contribuir a modular los procesos metabólicos relacionados con el síndrome X, especialmente la obesidad y la diabetes tipo 2. Es admisible, aunque no excluyente, que estos efectos estén relacionados con los cambios inducidos por la microbiota y se puede concluir que sus mecanismos encajan en el efecto prebiótico. Sin embargo la función de tales cambios en estos beneficios para la salud aún no se ha demostrado de manera definitiva. Como resultado de la actividad investigadora posterior a la publicación del concepto prebiótico hace 15 años, se ha puesto de manifiesto que los productos causantes de la modificación selectiva de la composición y/o actividad(es) de la microbiota intestinal y por tanto potenciadores de la normobiosis podrían inducir efectos fisiológicos beneficiosos en el colon y también en los compartimentos extraintestinales o contribuir a la reducción del riesgo de sufrir disbiosis y patologías intestinales y sistémicas relacionadas (Roberfroid y otros, 2010).

65

Por tanto sería deseable aportar al estado técnico un método que permitiera identificar sujetos en una etapa temprana - idealmente en riesgo - de aumento de peso (p.ej. después de iniciar un programa de pérdida de peso). En concreto sería deseable aportar un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los

prebióticos empleados en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta, sobre todo en una etapa temprana después de comenzar la administración de prebióticos.

5 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método que permita la estratificación temprana de sujetos según la probabilidad de que respondan o no a una intervención basada en prebióticos para evitar la ganancia de peso inducida o relacionada con una dieta rica en grasas.

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

10 Por ello, la presente invención aporta un método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a prebióticos empleados en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta, el cual consiste en determinar un nivel de alfa-ceto-isovalerato en una muestra de orina obtenida de un sujeto que haya consumido prebióticos y comparar el nivel de alfa-ceto-isovalerato del sujeto con un valor de referencia predeterminado, de modo que una disminución del nivel de alfa-ceto-isovalerato o una falta de variación del nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina,
15 respecto al valor de referencia predeterminado, indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.

En una forma de ejecución la dieta es rica en grasas.

20 En una forma de ejecución el método comprende además las etapas de:

- a) determinar el nivel de al menos otro biomarcador seleccionado del grupo constituido por oxaloacetato, creatinina, trimetilamina y sulfato de indoxilo en la muestra de orina, y
- b) comparar el nivel del sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia predeterminado,

25 de modo que:

- (i) un menor nivel de oxaloacetato, de creatinina y/o de sulfato de indoxilo o una falta de variación del nivel de oxaloacetato, de creatinina y/o de sulfato de indoxilo en la muestra de orina, y/o
- 30 (ii) un mayor nivel de trimetilamina o una falta de variación del nivel de trimetilamina en la muestra de orina,

respecto a los valores de referencia predeterminados, indica que la administración de prebióticos será efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.

35 En una forma de ejecución, los niveles de los biomarcadores en la muestra de orina se determinan por RMN-H¹ y/o espectrometría de masas.

En una forma de ejecución, el valor de referencia predeterminado está basado en un promedio del nivel de alfa-ceto-isovalerato en la orina de una población de control de sujetos consumidores de una dieta rica en grasas. En otra forma de ejecución, el valor de referencia predeterminado es el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la orina del sujeto antes de consumir los prebióticos.

45 En una forma de ejecución, el nivel de alfa-ceto-isovalerato y/o de los demás biomarcadores se determina en una muestra de orina obtenida del sujeto después de al menos tres días consecutivos de consumo de prebióticos. En este periodo es preferible que el sujeto haya consumido al menos 2 g/día de prebióticos o más.

En una forma de ejecución, el prebiótico se elige del grupo formado por oligosacáridos, que contengan opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, en particular fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de ellas. Los prebióticos se eligen preferiblemente del grupo formado por fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de leche bovina (BMOS), glicosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), gomas y/o sus hidrolizados, pectinas y/o sus hidrolizados, y combinaciones de los mismos.

55 En una forma de ejecución preferida los prebióticos incluyen galacto-oligosacáridos (GOS). En otra forma de ejecución preferida los prebióticos incluyen oligosacáridos de leche bovina (BMOS), con mayor preferencia oligosacáridos de leche de vaca-galacto-oligosacáridos (CMOS-GOS). En otra forma de ejecución preferida los prebióticos llevan inulina y fructo-oligosacáridos (FOS).

60 En algunas formas de ejecución el sujeto es un mamífero como un humano; una especie no humana, incluyendo un primate; un animal de ganadería como una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un asno o una cabra; un animal de ensayos de laboratorio, como un ratón, una rata, un conejo, una cobaya o un hámster; o un animal de compañía, como un perro o un gato.

65 En una forma de ejecución el método se usa para planificar una dieta estratificada destinada a un grupo de sujetos o una dieta personalizada para el sujeto.

En una forma de ejecución los prebióticos se administran al sujeto de manera continuada durante al menos un mes.

En una forma de ejecución, si el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina ha aumentado en comparación con la muestra de referencia predeterminada, no se administran prebióticos al sujeto. Preferiblemente se le facilita un tratamiento alternativo para prevenir la ganancia de peso, elegido entre restricción calórica, reducción de la ingesta dietética de grasa, un producto no prebiótico para perder peso o un programa de ejercicios.

En otro aspecto, la presente invención propone un biomarcador de la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso inducida por la dieta, siendo el biomarcador alfa-ceto-isovalerato.

En otro aspecto, la presente invención ofrece el empleo de alfa-ceto-isovalerato como biomarcador en la orina para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso inducida por la dieta.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1: gráfico que describe las curvas de peso corporal de animales.

Figura 2: perfiles de metabolitos con respuesta específica a los prebióticos, dependientes del tiempo y relacionados con la ganancia de peso. A: controles; B: controles ricos en grasa; C: GOS y alto contenido de grasa; D: GOSCMOS y alto contenido de grasa; E: Prebio1 y alto contenido de grasa; F: azúcares y alto contenido de grasa. El eje vertical corresponde a la concentración relativa en los metabolitos, obtenida por integración del área del pico; los datos están expresados como área bajo la curva (ABC).

Figura 3: perfiles de metabolitos con respuesta específica a los prebióticos, dependientes del tiempo y relacionados con la ganancia de peso. TMA, trimetilamina, TMAO, trimetilamina-N-óxido. A: controles; B: controles ricos en grasa, C: GOS y alto contenido de grasa; D: GOSCMOS y alto contenido de grasa; E: Prebio1 y alto contenido de grasa, F: azúcares y alto contenido de grasa. El eje vertical corresponde a la concentración relativa en los metabolitos, obtenida por integración del área del pico; los datos están expresados como área bajo la curva (ABC).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

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

Por consiguiente es un método adecuado para estudiar los cambios metabólicos graduales vinculados a diversas intervenciones dietéticas y al desarrollo de enfermedades. Los recientes descubrimientos metabólicos y lipidómicos han ido acelerado nuestra comprensión de los procesos patológicos y ofrecerán vías novedosas para la prevención y el control nutricional de los trastornos subclínicos relacionados con el síndrome metabólico. En particular, los datos "ómicos" han destacado la contribución del metabolismo energético (ciclo de Krebs), del procesamiento de lípidos y aminoácidos y de las señales inflamatorias al inicio de la obesidad y de la RI.

Mediante una combinación de espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-H¹) de muestras de orina recogidas a lo largo del tiempo y un control del aumento de peso, los presentes inventores identificaron nuevos biomarcadores metabólicos indicativos de la eficacia de una intervención prebiótica para prevención del aumento de peso en un modelo murino C57BL/6 bien definido de la obesidad inducida por la dieta. Los presentes inventores han caracterizado la adaptación metabólica gradual (p.ej. sobre una base semanal durante un período de 13 semanas) de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta rica en grasas (DRG), con y sin prebióticos, usando dietas isocalóricas. Los presentes inventores han determinado las huellas metabólicas específicas relacionadas con el desarrollo gradual de la obesidad en distintas condiciones nutricionales, y la variabilidad del fenotipo en la dinámica del aumento de peso corporal.

Usando un método metabonómico, los presentes inventores han demostrado que las vías metabólicas mitocondriales (β -oxidación de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, metabolismo de butanoato, vía de la nicotinamida adenina dinucleótido y ciclo de Krebs) son rápidamente sobre reguladas por una alimentación rica en grasas, lo cual sería el reflejo de una saturación de las mitocondrias por ácidos grasos y un deterioro del metabolismo energético. Por otra parte el análisis metabonómico reveló una remodelación importante del metabolismo microbiano intestinal, por los cambios observados en las metilaminas, en los carbohidratos dietéticos y en la fermentación proteica.

Los presentes inventores pudieron demostrar que se había prevenido la ganancia de peso corporal en los grupos de animales que habían recibido prebióticos, y que las huellas metabólicas relacionadas con la diferencia fenotípica de

peso corporal correspondían a una modulación específica de procesos biológicos dependientes de obesidad inducida por un elevado contenido de grasas, incluyendo las vías oxidativas mitocondriales (β -oxidación de ácidos grasos) y el metabolismo bacteriano intestinal (metilaminas, carbohidratos dietéticos y fermentación de proteínas).

5 Concretamente, en los experimentos aquí descritos, los ratones alimentados con una DRG presentaron a lo largo del tiempo una subida de alfa-ceto-isovalerato en la orina. El aumento de alfa-ceto-isovalerato está relacionado en gran medida con la ganancia final de peso corporal. El incremento de alfa-ceto-isovalerato se evitó o se atenuó de manera significativa mediante una alimentación con DRG y prebióticos (GOS, CMOS-GOS e inulina/FOS), aunque el alfa-ceto-isovalerato siguió fuertemente correlacionado con el incremento de peso corporal final.

10 Estos resultados destacan el papel de las mitocondrias y de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad e indican que la probabilidad de responder beneficiosamente a los prebióticos empleados en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta se puede determinar a partir de una huella metabólica temprana, utilizando un conjunto específico de biomarcadores aquí definidos.

15 Los presentes inventores pudieron demostrar que la respuesta metabólica en la orina tras una semana de alimentación con alto contenido de grasa y cualquiera de los prebióticos (día 7) permite predecir el aumento de peso corporal final de cada individuo (día 70). El presente método permite por tanto predecir y/o cuantificar la respuesta de los animales a la intervención dietética en una etapa temprana tras el inicio de la administración del prebiótico.

20 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 el marco de la prevención del aumento de peso inducido por la dieta en el sujeto.

25 Por ejemplo, en una forma de ejecución el método se puede usar para predecir si es probable que la administración futura o en curso de prebióticos sea eficaz para prevenir el aumento de peso. Por consiguiente el método se puede usar, por ejemplo, para proporcionar una indicación que tenga como objeto decidir entre seguir un tratamiento con prebióticos para la prevención del aumento de peso o procurar al sujeto un esquema de tratamiento alternativo.

30 En una forma de ejecución alternativa, el método se puede usar para determinar o cuantificar el efecto del consumo previo de prebióticos por el sujeto. Por ejemplo, el método se puede utilizar para indicar si la administración de los prebióticos ha evitado el aumento de peso, sobre todo cuando esto no puede determinarse comprobando simplemente el peso del sujeto. Así, por ejemplo, dentro de un período de prueba concreto puede ser imposible saber si el sujeto habría ganado o perdido peso sin la administración de prebióticos, en particular cuando el valor calorífico de la dieta del sujeto es variable y/o desconocido.

35 Sujeto

40 El método de la presente invención es aplicable a sujetos de cualquier peso, con el fin de predecir la eficacia de los prebióticos para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta. Por lo tanto puede tratarse de un sujeto con bajo peso, peso normal, sobrepeso o de un sujeto obeso.

45 Es sobre todo en sujetos con bajo peso, con sobrepeso o en sujetos obesos que el método de la presente invención puede elucidar su predisposición genética y metabólica a la ganancia de peso. Basándose en ello, y además teniendo en cuenta idealmente su estado general de salud y estilo de vida, se pueden desarrollar unos regímenes nutricionales personalizados que puedan ayudar a mantener o recuperar un estado saludable.

50 En una forma de ejecución el sujeto sometido a la prueba es susceptible de ganancia de peso inducida por la dieta, sobre todo en ausencia de tratamiento prebiótico. Por ejemplo, se puede tratar de un sujeto con sobrepeso o de un sujeto obeso a quien le convenga la administración de prebióticos para prevenir el aumento de peso. En ciertas formas de ejecución el sujeto puede estar consumiendo una dieta rica en grasas o muy calórica.

55 La definición de "sobrepeso" para una persona adulta corresponde a un IMC entre 25 y 30. El "índice de masa corporal" o "IMC" es igual al peso en kg dividido por el cuadrado de la altura en metros. La "obesidad" es un estado en el cual la reserva natural de energía almacenada en el tejido graso de animales, en particular de humanos y otros mamíferos, aumenta hasta un punto en que se relaciona con ciertas condiciones de salud o aumento de la mortalidad. Para un ser humano adulto la definición de "obeso" corresponde a un IMC mayor que 30. El "peso normal" para un ser humano adulto corresponde a un IMC entre 18,5 y 25, mientras que "peso bajo" puede definirse como un IMC inferior a 18,5.

60 Una dieta rica en grasas se puede definir como aquella de la cual el sujeto obtiene más del 20% aproximadamente de sus calorías totales a partir de la grasa. En algunas formas de ejecución la dieta rica en grasas puede contener más del 30% aproximadamente de sus calorías totales en forma de grasa. En otras formas de ejecución el sujeto puede obtener más del 40% aproximadamente de sus calorías totales a partir de la grasa.

Por lo tanto el contenido real de grasa de una dieta rica en grasas puede variar según el valor calorífico general de la dieta, así como el sexo, la edad, el nivel de actividad física, la constitución, la altura y el peso del sujeto, por ejemplo. Normalmente, para un hombre de 70 kg con un nivel moderado de actividad física y una ingesta calórica diaria de 2.700 kcal puede considerarse una dieta rica en grasas el consumo de más de 60 g diarios de grasa (aproximadamente 540 kcal de valor energético). Alternativamente, una dieta rica en grasas para dicho sujeto se puede definir como un exceso de 90 g de grasa/día (810 kcal/día) o de 120 g de grasa/día (1080 kcal/día).

Una dieta rica en calorías se puede definir como el consumo por parte del sujeto de una ingesta calórica superior a la recomendada, basada, por ejemplo, en el sexo, la edad, el nivel de actividad física, la constitución, la altura y/o el peso del sujeto. Por ejemplo, una dieta rica en calorías para un hombre normal de 70 kg se puede definir 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 rica 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 sometido a prueba según el método de la presente invención ha consumido prebióticos. Normalmente, el sujeto ha consumido prebióticos como parte de un programa establecido de control de peso. Por ejemplo, se puede administrar o suministrar al sujeto una dosis definida de prebióticos en forma de suplemento dietético para prevenir el aumento de peso.

El sujeto ha consumido prebióticos, preferiblemente durante un período de al menos un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas, un mes, dos meses o tres meses, antes de obtener la muestra de análisis. En las formas de ejecución preferidas la muestra se obtiene entre 3 y 14 días después de iniciar el consumo de prebióticos, p.ej. al cabo de unos 7 días después de empezar el tratamiento prebiótico. Por ejemplo, en algunas formas de ejecución el sujeto ha consumido una cantidad de prebióticos que corresponde al menos a 1 g/día, al menos 2 g/día, al menos 5 g/día o al menos 10 g/día durante el período anteriormente definido.

Según una forma de ejecución, el sujeto es un ser humano. Sin embargo el método de la presente invención no está limitado a humanos. También se puede emplear en animales no humanos, por ejemplo para animales de compañía como gatos o perros. Basándose en ello se pueden diseñar unos regímenes nutricionales que contribuyan a prolongar la vida del animal de compañía en un buen estado buena salud.

En algunas formas de ejecución el sujeto es un bebé o un niño pequeño. El término "bebé" se refiere a un niño menor de 12 meses. La expresión "niño pequeño" se refiere a un niño de entre uno y tres años, es decir que empieza a dar los primeros pasos. El bebé puede ser un recién nacido a término o prematuro. Un bebé "nacido antes de término" o "prematuro" se refiere a un bebé no nacido a término. En general se refiere a un bebé nacido antes de las 36 semanas de gestación. En algunas formas de ejecución puede tratarse de un bebé nacido por cesárea y/o de un bebé pequeño para la edad gestacional y/o de un bebé con bajo peso al nacer. Un "bebé nacido por cesárea" se refiere a un bebé alumbrado por cesárea, es decir, no por vía vaginal.

Prebióticos

Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que beneficia al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una bacteria o de un número limitado de bacterias en el colon y, por lo tanto, mejora la salud del huésped. Dichos ingredientes no son digeribles en el sentido de que no se descomponen ni son absorbidos en el estómago o en el intestino delgado y así pasan intactos al colon, donde son fermentados selectivamente por las bacterias beneficiosas.

Los ejemplos de prebióticos incluyen ciertos oligosacáridos, como fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, BMO (oligosacáridos de leche bovina), glicosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), gomas y/o sus hidrolizados, pectinas y/o sus hidrolizados, y cualquier mezcla de los mismos. Los BMO pueden seleccionarse de la lista integrada por oligosacáridos N-acetilados, oligosacáridos sialilados y cualquier mezcla de los mismos. Los BMO pueden ser "CMOS-GOS" (oligosacáridos de leche de vaca-galacto-oligosacáridos).

Se puede usar una combinación de prebióticos formada por 90% de GOS y 10% de fructo-oligosacáridos de cadena corta, como el producto vendido con la marca registrada Raftilose®, o 10% de inulina, como el producto vendido con la marca comercial Raftiline®.

Un prebiótico particularmente preferido es una mezcla de galacto-oligosacárido(s), oligosacárido(s) N-acetilado(s) y oligosacárido(s) sialilado(s) en la cual el (los) oligosacárido(s) N-acetilado(s) comprenden (representan) un 0,5 hasta un 4,0% de la mezcla de oligosacáridos, el (los) galacto-oligosacárido(s) comprenden (representan) un 92,0 hasta un 98,5% de la mezcla de oligosacáridos y el (los) oligosacárido(s) sialilado(s) comprenden (representan) un 1,0 hasta un 4,0% de la mezcla de oligosacáridos. Esta mezcla se denomina en lo sucesivo "CMOS-GOS". Una composición utilizable según la invención lleva preferiblemente 2,5 hasta 15,0% en peso de CMOS-GOS respecto a materia seca, con la condición de que la composición contenga 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. Las patentes WO2006087391 y WO2012160080 proporcionan algunos ejemplos de producción de “CMOS-GOS”.

“Oligosacárido N-acetilado” significa un oligosacárido que tiene un resto de 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 se pueden preparar por acción de glucosaminidasa y/o galactosaminidasa sobre N-acetil-glucosa y/o N-acetil-galactosa. Para este fin se pueden emplear igualmente N-acetil-galactosil transferasas y/o N-acetil-glicosil transferasas. Los oligosacáridos N-acetilados también pueden producirse por tecnología de fermentación, usando enzimas adecuados (recombinantes o naturales), y/o por fermentación microbiana. En el último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden modificarse para producir sustratos y enzimas adecuados. Se pueden usar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos N-acetilados puede ser iniciada por sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante. Otra opción es la conversión química de ceto-hexosas (p.ej. fructosa), libres o unidas a un oligosacárido (p.ej. lactulosa), en N-acetil-hexosamina o en un oligosacárido que contenga N-acetilhexosamina, tal como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38: 827-828.

“Galacto-oligosacárido” significa un oligosacárido que lleva dos o más moléculas de galactosa y carece de carga y de resto N-acetilo. Los galacto-oligosacáridos adecuados incluyen Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, 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, 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. Los 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 con las marcas comerciales Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Como alternativa se pueden usar glicosiltransferasas específicas, como por ejemplo galactosiltransferasas, para producir oligosacáridos neutros.

“Oligosacárido sialilado” significa un oligosacárido que comprende un resto 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 pueden aislarse mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural tal como la leche de animales. Como alternativa pueden producirse por biotecnología empleando sialiltransferasas específicas, bien por tecnología de fermentación enzimática (enzimas recombinantes o naturales) o por tecnología de fermentación microbiana. En el último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden modificarse para producir sustratos y enzimas adecuados. Se pueden emplear cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de sialiloligosacáridos puede ser iniciada por sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante.

En una forma de ejecución especialmente preferida los prebióticos comprenden galacto-oligosacáridos (GOS). En otra forma de ejecución particularmente preferida los prebióticos comprenden oligosacáridos de leche bovina (BMO), con mayor preferencia oligosacáridos de leche de vaca-galacto-oligosacáridos (CMOS-GOS). En otra forma de ejecución preferida los prebióticos comprenden inulina y fructo-oligosacáridos (FOS).

Muestra

El presente método comprende una etapa de determinación del nivel de alfa-ceto-isovalerato en una muestra de orina obtenida de un sujeto.

Por lo tanto, el presente método se practica normalmente fuera del cuerpo humano o animal, es decir, en una muestra de fluido corporal (orina) obtenida previamente del sujeto sometido a la prueba. El uso de orina como fluido corporal para el análisis tiene la ventaja de que puede obtenerse de manera regular y no invasiva, aplicando un procedimiento bien establecido. La muestra también se puede obtener sin la ayuda de personal médico.

Determinación del nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra

El nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra se puede detectar y cuantificar por cualquier medio conocido del estado técnico. Por ejemplo, se puede usar RMN- H^1 , espectroscopia de masas, p.ej. UPLC-ESI-MS/MS. También se pueden usar otros métodos, por ejemplo otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos. El nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra y el valor de referencia se determinan preferiblemente por el mismo método.

Comparación del nivel de alfa-ceto-isovalerato con un valor de referencia

El presente método comprende además una etapa de comparación del nivel de alfa-ceto-isovalerato del sujeto con un valor de referencia predeterminado.

5 El valor de referencia predeterminado puede basarse en un nivel promedio de alfa-ceto-isovalerato en el fluido corporal analizado en una población de control, p.ej. de una población que no ha consumido prebióticos. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferiblemente de al menos 10, con mayor preferencia de 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 sometido a prueba, con excepción de los prebióticos. Normalmente los sujetos de la población de control han consumido una dieta rica en grasas, pero no han consumido ningún prebiótico o bien un nivel de prebióticos inferior al del sujeto que debe analizarse.

10 Según otra forma de ejecución, el valor de referencia predeterminado es el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la orina del sujeto analizado antes de consumir los prebióticos. Por lo tanto el método puede consistir en controlar un cambio de los niveles de alfa-ceto-isovalerato en la orina del sujeto como respuesta al consumo de prebióticos. Por ejemplo, en una forma de ejecución, se puede obtener una muestra de orina de un sujeto a fin de obtener un valor de referencia para el nivel de alfa-ceto-isovalerato, tras lo cual se inicia el tratamiento prebiótico. Posteriormente se puede obtener una muestra adicional de orina (de ensayo) después de un período definido de consumo de prebióticos, tal como se ha expuesto anteriormente. El nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de ensayo se compara luego con la muestra de referencia para determinar si los niveles de alfa-ceto-isovalerato en este sujeto han aumentado o disminuido como respuesta al tratamiento prebiótico.

15

20 **Determinación de la eficacia de los prebióticos basada en la comparación de los niveles de alfa-ceto-isovalerato**

Según el presente método, un menor nivel de alfa-ceto-isovalerato o una ausencia de cambio del nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina, respecto al valor de referencia predeterminado, indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta. Por ejemplo, los niveles relativos de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de ensayo y en la muestra de referencia pueden indicar si el consumo previo de prebióticos ha sido efectivo para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta y/o si la administración adicional de prebióticos será efectiva para prevenir la ganancia de peso inducida por la dieta.

25

30 En algunas formas de ejecución, una disminución del nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina respecto al valor de referencia predeterminado es indicativo de la eficacia de los prebióticos. En particular, en aquellas formas de ejecución en las cuales el valor de referencia está basado en un nivel promedio de alfa-ceto-isovalerato en la orina de una población de control de sujetos consumidores de una dieta rica en grasas, el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de ensayo disminuye preferentemente en comparación con el valor de referencia. En las formas de ejecución en que el valor de referencia está basado en el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la orina del sujeto antes de consumir los prebióticos, el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de ensayo también disminuye preferentemente respecto al valor de referencia.

35

40 El nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina disminuye preferentemente al menos un 1%, al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30% o al menos un 50% en comparación con el valor de referencia predeterminado.

45 En otras formas de ejecución la ausencia de cambio en el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina respecto al valor de referencia predeterminado puede ser indicativo de la eficacia de los prebióticos. Por ejemplo, en algunas formas de ejecución en que el valor de referencia está basado en un nivel promedio de alfa-ceto-isovalerato en la orina de la población general o de una población control de sujetos consumidores de una dieta normal, un nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de ensayo que no haya aumentado en comparación con el valor de referencia puede ser indicativo de que los prebióticos son eficaces para prevenir el aumento de peso.

50 Además, en algunas formas de ejecución 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 poder 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 tome la muestra de ensayo. En estas formas de ejecución, una ausencia de cambio en el nivel de alfa-ceto-isovalerato de la muestra de orina de ensayo en comparación con el valor de referencia predeterminado también puede ser indicativo de la eficacia de los prebióticos.

55 “Ausencia de cambio en el nivel de alfa-ceto-isovalerato” significa preferiblemente 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 alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina y el valor de referencia predeterminado.

60 Como en las formas de ejecución de la presente invención un nivel de alfa-ceto-isovalerato no incrementado en la muestra de orina respecto al valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es eficaz para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta, un mayor nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina respecto a los valores de referencia predeterminados pueden indicar que la administración de prebióticos es menos probable que sea efectiva para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas. Por ejemplo, un nivel alto de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina respecto al valor de referencia puede indicar que el

65

consumo previo de prebióticos no ha sido efectivo 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.

Biomarcadores adicionales

5 En el presente método también se pueden emplear otros biomarcadores para predecir y/o cuantificar la respuesta del sujeto a los prebióticos destinados a prevenir el aumento de peso inducido por la dieta.

10 Como tales, los presentes inventores han encontrado que las concentraciones de oxaloacetato, creatinina y/o sulfato de indoxilo no incrementadas en la orina permiten diagnosticar una mayor probabilidad de resistir la ganancia de peso inducida por la dieta rica en grasas. Además, los presentes inventores han demostrado que una mayor concentración de trimetilamina en la orina es indicativa de la eficacia de los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta.

15 Por tanto el método de la presente invención puede comprender además las etapas de determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional elegido del grupo formado por oxaloacetato, sulfato de indoxilo, creatinina y trimetilamina en la muestra de orina, y comparar el nivel del al menos un biomarcador adicional en el sujeto con un valor de referencia predeterminado, de manera que (i) un nivel reducido de oxaloacetato, sulfato de indoxilo y/o creatinina, o una ausencia de cambio en el nivel de oxaloacetato, sulfato de indoxilo y/o creatinina, o (ii) un aumento del nivel de trimetilamina, o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina, en la muestra de orina respecto a los valores de referencia predeterminados indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.

20 Los biomarcadores adicionales también se pueden detectar y cuantificar por RMN- H^1 o espectroscopía de masas, por ejemplo UPLCESI-MS/MS. También se pueden emplear otros métodos, por ejemplo otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcaje o métodos químicos cuantitativos.

25 Todos los biomarcadores se determinan preferiblemente evaluándolos según la misma tecnología. En algunas formas de ejecución todos los biomarcadores ensayados se evalúan simultáneamente.

30 El método de la presente invención puede incluir la evaluación de al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 biomarcadores como los citados anteriormente.

35 Por ejemplo, el alfa-ceto-isovalerato se puede valorar junto con el oxaloacetato.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con la trimetilamina.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con la creatinina.

40 El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el sulfato de indoxilo.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato y la trimetilamina.

45 El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato y la creatinina.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato y el sulfato de indoxilo.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con la trimetilamina y la creatinina

50 El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con la trimetilamina y el sulfato de indoxilo.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con la creatinina y el sulfato de indoxilo.

55 El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato, la trimetilamina y la creatinina.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato, la trimetilamina y el sulfato de indoxilo.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato, la creatinina y el sulfato de indoxilo.

60 El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con la creatinina, la trimetilamina y el sulfato de indoxilo.

El alfa-ceto-isovalerato también se puede valorar junto con el oxaloacetato, la trimetilamina, la creatinina y el sulfato de indoxilo.

65 La ventaja de evaluar más de un biomarcador es que el diagnóstico será más fiable cuantos más biomarcadores se analicen. Por ejemplo, que el nivel de más de 1, 2, 3, 4 o 5 biomarcadores aumente o disminuya entre la muestra de

orina y los respectivos valores de referencia predeterminados puede ser una indicación más segura de la probabilidad de que los prebióticos sean o no efectivos para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.

5 El valor de referencia del alfa-ceto-isovalerato y opcionalmente de los demás biomarcadores se mide preferiblemente usando las mismas unidades empleadas para caracterizar el nivel de alfa-ceto-isovalerato y
 10 opcionalmente de los otros biomarcadores obtenidos del sujeto sometido a prueba. Por consiguiente, si el nivel de alfa-ceto-isovalerato y opcionalmente de los otros biomarcadores es un valor absoluto (p.ej. si las unidades de alfa-ceto-isovalerato se miden en $\mu\text{mol/l}$ (μM)), el valor de referencia también se mide preferiblemente en las mismas unidades (p.ej. en $\mu\text{mol/l}$ (μM)) de alfa-ceto-isovalerato en individuos de una población de control de sujetos seleccionados o en el sujeto antes de la administración de prebióticos).

15 El valor de referencia puede ser un valor límite único, tal como una mediana o un promedio. En algunas formas de ejecución los valores de referencia de alfa-ceto-isovalerato y opcionalmente de los biomarcadores adicionales en las muestras de orina obtenidas, como por ejemplo niveles medios, medianas o niveles "límite", se pueden establecer analizando una gran muestra de individuos de la población general o de la población seleccionada (p.ej. de personas que consumen una dieta rica en grasas). Se puede usar un modelo estadístico, como el método del valor predictivo, para elegir un criterio de positividad o una curva característica receptor-operador que defina la especificidad óptima (tasa negativa verdadera más alta) y la sensibilidad (tasa positiva verdadera más alta), tal como se describe en Knapp, RG y Miller, MC (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics, William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa., el cual se incorpora aquí como referencia. Los valores de referencia para la comparación respecto a un sujeto y un biomarcador específicos se pueden seleccionar según el sexo, la raza, la herencia genética, el estado de salud o la edad del sujeto, por ejemplo.

25 Prevención de la ganancia de peso inducida por la dieta

También se describe un método para prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta. El método puede consistir en practicar un método como el descrito anteriormente para determinar la eficacia de los prebióticos en el sujeto y luego administrar o no prebióticos dependiendo de si el método indica la probabilidad de que los prebióticos sean efectivos. De esta manera, el tratamiento prebiótico puede dirigirse a los sujetos que tienen más probabilidades de beneficiarse del mismo, mientras que para aquellos sujetos en quienes los prebióticos tienen menos probabilidades de ser efectivos se puede desarrollar un programa alternativo de prevención de ganancia de peso.

35 El presente método permite en particular la estratificación temprana de sujetos, por ejemplo tras una intervención nutricional de corta duración con prebióticos. Por ejemplo, el método puede aplicar después de 1 semana o menos de tratamiento prebiótico, antes de que el sujeto haya engordado, lo cual tendría riesgos para la salud, a fin de evaluar la eficacia de la intervención destinada a prevenir el aumento de peso corporal a largo plazo. Al determinar si el sujeto es susceptible de una intervención a base de prebióticos para evitar el aumento de peso inducido por la dieta, el estilo de vida y/o la dieta del sujeto se pueden ajustar como corresponda en una etapa temprana del proceso de intervención. Por lo tanto, el método se puede utilizar para planificar un régimen nutricional y/o de ejercicio personalizado, a fin de procurar al sujeto un físico saludable.

45 Por tanto, según las formas de ejecución del presente método se administran prebióticos al sujeto cuando el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina disminuye o no varía respecto al valor de referencia predeterminado. Como el sujeto ya ha consumido prebióticos como parte del proceso de intervención antes de realizar la prueba, esto puede implicar la continuidad de la administración de prebióticos al sujeto. Opcionalmente también pueden tenerse en cuenta los niveles de los biomarcadores adicionales arriba descritos para decidir si hay que continuar con la administración de prebióticos.

50 El sujeto puede seguir consumiendo cualquier cantidad de prebióticos; así, por ejemplo, la cantidad de prebióticos consumidos puede aumentar, disminuir o quedar igual, después de efectuar la prueba. Sin embargo, una vez obtenida una indicación positiva de su eficacia, los prebióticos se administran preferiblemente al sujeto en cantidad al menos igual a la consumida antes de tomar la muestra de ensayo, p.ej. en una cantidad de al menos 2 g/día. La administración de prebióticos al sujeto puede prolongarse durante al menos otra semana, al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año o indefinidamente, después de comprobar la eficacia de los prebióticos.

60 Normalmente, si se obtiene una indicación negativa de la eficacia de los prebióticos (señalada p.ej. por un nivel elevado de alfa-ceto-isovalerato y opcionalmente por un menor nivel de trimetilamina y/o un mayor nivel de uno o más de los otros biomarcadores definidos anteriormente), no se administran prebióticos al sujeto. Esto puede significar que se suspende la administración de prebióticos al sujeto o que, al menos un, no se le prescribe más como parte de un régimen nutricional controlado. Normalmente, cuando hay una indicación de falta de eficacia de los prebióticos, el consumo de prebióticos del sujeto se puede reducir al menos un 50%, al menos un 75% o al menos un 90% respecto a la cantidad de prebióticos consumidos antes de tomar la muestra de ensayo. Así por

ejemplo, en algunas formas de ejecución el sujeto puede consumir una cantidad de prebióticos inferior a 2 g/día, 1 g/día o 0,5 g/día, una vez observada la ineficacia de los prebióticos.

5 En formas de ejecución preferidas, cuando el método indica la probabilidad de que los prebióticos sean ineficaces, se puede adoptar una estrategia alternativa para controlar el peso del sujeto. Por ejemplo, para tales sujetos puede ser más beneficioso centrarse en métodos de prevención de ganancia de peso bien establecidos, como la restricción de calorías en la dieta, la reducción de la ingesta de grasa en la dieta o el aumento del ejercicio. Según otras formas de ejecución, se puede administrar al sujeto un producto alternativo de pérdida de peso (no prebiótico).

10 Prevención de trastornos relacionados con la obesidad

15 En algunas formas de ejecución, una mayor probabilidad de respuesta a los prebióticos en la prevención del aumento de peso inducido por la dieta puede ser indicativo de un menor riesgo de desarrollar trastornos relacionados con la obesidad y/o el sobrepeso. Los trastornos relacionados con el exceso de peso y/o la obesidad pueden ser afecciones cardiovasculares tales como aterosclerosis, accidente cerebrovascular y enfermedad cardíaca y/o desregulaciones metabólicas, incluyendo la diabetes. En particular, el riesgo de desarrollar estas afecciones relacionadas con el peso puede disminuir en sujetos que responden a los prebióticos y los continúan consumiendo a largo plazo, por ejemplo, como parte de un régimen nutricional controlado. Por el contrario, los sujetos que no responden a los prebióticos para prevenir el aumento de peso pueden tener un riesgo particular de desarrollar estas afecciones y requerir intervenciones nutricionales adicionales o alternativas basadas en el estilo de vida.

Aspectos adicionales

25 En otro aspecto, la presente invención ofrece el alfa-ceto-isovalerato como nuevo biomarcador en la orina, de eficacia prebiótica para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta. La presente invención también propone el uso de alfa-ceto-isovalerato como biomarcador en la orina, con el fin de predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta.

30 El estudio presentado en esta solicitud de patente proporciona una idea de los mecanismos fisiológicos relacionados con el desarrollo de la obesidad inducida por AG (alto contenido de grasa) y destaca particularmente las adaptaciones metabólicas específicas relacionadas con la variabilidad del fenotipo obeso. El estudio también investigó el papel de las fibras solubles dietéticas en el aumento de peso inducido por la dieta, usando un contenido isocalórico de hidratos carbono.

35 La ingesta elevada de grasas provoca una sobrerregulación rápida y constante de las vías metabólicas mitocondriales, lo cual da como resultado una mayor producción de energía y una mayor saturación por ácidos grasos mitocondriales. Las huellas metabólicas correspondientes a la diferencia fenotípica de peso corporal se relacionan con una modulación específica de los procesos biológicos dependientes de la obesidad inducida por el alto contenido de grasa, incluyendo las vías oxidativas mitocondriales (oxidación β de ácidos grasos) y el metabolismo bacteriano intestinal (metilaminas, carbohidratos dietéticos y fermentación de proteínas).

40 El aumento de peso corporal en los grupos de animales que recibieron alguna de las intervenciones prebióticas se previno con una modulación específica de las huellas metabólicas atribuidas al aumento de peso inducido por la dieta. Las huellas metabólicas moduladas permitieron una predecir con precisión el aumento de peso corporal final y evaluar por tanto la eficacia de los prebióticos para prevenir el aumento de peso.

45 Los presentes inventores demostraron que la huella metabólica observada tras una sola semana de intervención permite predecir el aumento de peso corporal final al final de la intervención a largo plazo (70 días). Estos resultados destacan el papel de las mitocondrias y de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad e indican que la capacidad de respuesta a los prebióticos empleados para prevenir el aumento de peso inducido por la dieta se puede determinar a partir de una huella metabólica temprana usando los biomarcadores aquí descritos. La huella metabólica incluye contribuciones, tanto del metabolismo energético del huésped como de las características metabólicas de la microbiota intestinal. Por consiguiente, este análisis exhaustivo de los mecanismos en los cuales se basa la adaptación heterogénea a la alimentación rica en grasas proporciona perspectivas novedosas y prometedoras para los programas de control del peso y soluciones nutricionales personalizadas.

50 La presente invención se describe seguidamente a modo de ejemplo, solo respecto a las siguientes formas concretas de ejecución.

60 Ejemplos:

Procedimiento de manipulación de animales y preparación de muestras:

65 El ensayo se llevó a cabo bajo las directrices nacionales apropiadas en el Centro de Investigación Nestlé (NRC, Suiza). Los ratones se mantuvieron en una jaula individual en un régimen de 12 h-12 h de luz-oscuridad y se

5 alimentaron ad libitum durante el experimento global. Tras un período de aclimatación de tres semanas a una dieta baja en grasas (Research Diets, EE.UU.), los animales se sometieron a uno de los tratamientos siguientes, mientras que un grupo de control se mantuvo con las dietas bajas en grasa. Un total de 90 ratones C57BL/6 recibió en primer lugar una dieta de pienso estándar durante tres semanas. Los animales se asignaron aleatoriamente según la glucemia en ayunas y la ganancia de peso corporal. El día 0 los ratones se dividieron en 6 grupos de 15 animales; un grupo recibió una dieta de pienso estándar, mientras que los demás grupos recibieron una dieta rica en grasas suplementada con prebióticos o con azúcares.

10 La dieta pobre en grasa y las dietas ricas en grasa se obtuvieron de las respectivas dietas estándar de Research Diets, EUA, las cuales eran isocalóricas (4057 kcal/kg):

La dieta D09072901i es una dieta para roedores con el 60% de kcal procedente de la grasa

La dieta D09072902i es una dieta para roedores con el 60% de kcal procedente de la grasa y 211 g de mezcla de fibras A

15 La dieta D09072903i es una dieta para roedores con el 60% de kcal procedente de la grasa y 140 g de mezcla de fibras B

La dieta D09072904i es una dieta para roedores con el 60% de kcal procedente de la grasa y 100 g de mezcla de fibras C

20 La dieta D09072905i es una dieta para roedores con el 60% de kcal procedente de la grasa y 35,1 g de dextrosa, 32,3 g de lactosa y 1,45 g de galactosa

Las dietas se prepararon tal como se describe a continuación:

Para la mezcla A: prebióticos GOS

25 Se añaden a la dieta 211 g de jarabe o 158,2 g de polvo seco para un total de 531 kcal.

30 Respecto a materia seca, 90 g son fibras (258 kcal) y 68,2 g son azúcares (272,8 kcal). Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los distintos grupos se eliminaron 258 kcal de maltodextrina y 272,8 kcal de sacarosa.

Para la mezcla B: prebióticos GOS-CMO

35 Se añaden a la dieta 140 g de polvo para un total de 350 kcal.

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

40 Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los distintos grupos se eliminaron 75 kcal de maltodextrina y 275 kcal de sacarosa.

Para la mezcla C: inulina y fructo-oligosacáridos (FOS) - Prebio 1

Para 100 g de producto se añaden 30 g de producto FOS a 70 g de inulina.

45 Se añaden a la dieta 100 g de mezcla C.

Respecto a materia seca, 90 g son fibras (116 kcal) y 10 g son azúcares (40 kcal).

50 Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los distintos grupos se eliminaron 116 kcal de maltodextrina y 40 kcal de sacarosa.

Para la mezcla D:

55 La mezcla D se compone de 51% de glucosa, 47% de lactosa y 2% de galactosa.

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

60 Para mantener el equilibrio isocalórico entre las diferentes dietas en los distintos grupos se eliminaron 275 kcal de sacarosa.

65 Durante el estudio experimental se controló el peso y la composición corporal y el consumo de comida y agua de los animales. La diferencia en el aumento de peso se evaluó mediante una prueba no paramétrica (prueba U de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Hay una disminución significativa en el aumento de peso de los animales que recibieron una dieta rica en grasas en combinación con los prebióticos, respecto a los animales alimentados con dieta AG a lo largo del tiempo.

5 Se recogieron muestras de orina semanalmente, es decir, las tres semanas previas al cambio de dieta (D-21 a D0) y 10 semanas durante las intervenciones nutricionales (D0 a D70). Todas las muestras se congelaron instantáneamente a -80°C hasta el momento del análisis.

Espectroscopia RMN- ^1H

10 Se diluyó un volumen de 40 μl de orina en 20 μl de solución tampón (NaHPO_4 , 0,6 M, $\text{pH} = 7$) que contenía azida sódica (3 mM) y TSP (0,5 mM). Después de centrifugarlas, las muestras se transfirieron a tubos de RMN de 1,7 mm de diámetro con una jeringa. Los espectros de RMN- ^1H se registraron luego en un espectrómetro de 600,13 MHz, realizando 64 barridos de una secuencia estándar con 64K puntos de datos. La temperatura del ensayo de RMN se mantuvo a 300 K. El procesamiento de los espectros de orina se llevó a cabo utilizando el programa TOPSPIN 2.0
15 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). Se multiplicaron las FID de cada espectro por una función exponencial que corresponde a un ensanchamiento de línea de 1 Hz, antes de convertirse en espectro mediante un transformador de Fourier. La fase y la línea base de los espectros se corrigieron manualmente. El desplazamiento químico se calibró utilizando la señal de TSP a δ 0,0. Las asignaciones espectrales se lograron mediante el uso de STOCSY (Statistical T_OTal Correlation Spectroscopy), bases de datos espectrales y asignaciones publicadas.

20

Procesamiento de datos y análisis multivariante de datos:

Finalmente los datos espectrales (de δ 0,2 a δ 9,5) se importaron al programa Matlab (versión, mathworks Inc, Natwick MA) y se transformaron en 22K puntos de datos. La resonancia del pico de agua (δ 4,7-5,05) se eliminó de
25 cada espectro a fin de suprimir la variabilidad ligada a la presaturación por resonancia de agua. Después los espectros de RMN- ^1H se normalizaron al área total y se aplicaron varias técnicas estadísticas multivariantes (PCLA, OPLS y OPLS-DA), utilizando un escalado de "varianza unitaria".

25

Los espectros de RMN- ^1H de los metabolitos intermedios del co-metabolismo microbiano intestinal del huésped, así como de la oxidación β en el huésped, de la oxidación de los AACR, del ciclo de Krebs y de las vías del nicotinamida adenina dinucleótido en la orina se integraron para evaluar la excreción urinaria de estos metabolitos para cada animal individual de cada grupo a lo largo del tiempo. Los datos también se trataron estadísticamente por análisis multivariante combinado con análisis univariante para seleccionar patrones asociados con el aumento de peso y las especificidades grupales.

30

35

Hallazgos principales y puntos destacados:

Variabilidad del aumento de peso corporal en ratones C57BL/6J alimentados con una DRG suplementada o no con prebióticos

40

Los resultados de peso corporal (PC) y de aumento de PC son muy consistentes. Ya en el día 7, los PC y los aumentos de PC en la mayoría de los grupos suplementados con prebióticos son significativamente inferiores en el grupo con alto contenido de grasa y la diferencia aumenta hasta el día 70 (figura 1). Sin embargo, al final del estudio, en todos los grupos también son significativamente más altos que el grupo control alimentado con una dieta pobre en grasas. El momento en que esta diferencia se vuelve finalmente significativa difiere de un grupo de prebióticos a otro. El grupo Prebio 1 (inulina + prebióticos FOS) ya es más alto en estos parámetros que el grupo de Ctrl el día 21 (APC) o 35 (PC) y es muy diferente el día 70 (PC 2,81 [1,19; 4,43] $p = 0,0023$; APC 2,46 [1,12; 3,81] $p = 0,0013$).

45

El perfil metabólico urinario muestra la huella metabólica sostenida relacionada con la obesidad inducida por el alto contenido de grasa

50

Para investigar la huella metabólica específica asociada al desarrollo de la obesidad inducida por la dieta obtuvimos los perfiles metabólicos urinarios a lo largo del tiempo, durante un período de 13 semanas (figura 1). Luego, los perfiles metabólicos urinarios de los ratones alimentados con una dieta pobre en grasas, rica en grasas y rica en grasas con prebióticos se integraron con el peso corporal y el aumento de peso corporal. Partiendo de este análisis y utilizando los perfiles metabólicos completos se pudieron asignar las huellas metabólicas al aumento de peso.

55

Se integraron las señales representativas de los metabolitos más influyentes y se trataron estadísticamente mediante análisis adicionales multivariante de los datos de los días 0, 7 y 70 para identificar los mejores predictores tempranos de la ganancia de peso. Cada modelo se calculó utilizando un predictor y varios componentes ortogonales. El número óptimo de componentes ortogonales se determinó mediante la estadística de bondad de ajuste $R^2\text{Y}$ y $Q^2\text{Y}$ (figura 2). Se generó un primer modelo, usando 35 metabolitos y luego se generó un segundo modelo, usando los 12 metabolitos principales (definidos por los gráficos de importancia de la variable y los valores del coeficiente de correlación, figuras 2 y 3). La matriz de confusión mostró una capacidad muy buena de cada modelo para la estratificación en grupos de animales.

60

65

- Se identificaron los metabolitos con el mayor coeficiente de correlación, lo cual indica que las variaciones metabólicas urinarias incluyen una modulación del metabolismo microbiano, tanto del huésped como del intestino. En particular los niveles de carnitina, acilcarnitina, metabolitos del ácido tricarbóxico y de los productos intermedios de la oxidación de aminoácidos de cadena ramificada se relacionaron significativamente con la ganancia de peso.
- 5 En cambio, los niveles de derivados de metilamina resultantes del metabolismo microbiano de la colina (trimetilamina (TMA) y trimetilamina-N-óxido (TMAO)) y de la taurina, indicaron relaciones negativas con la ganancia de peso. Además los productos finales de la degradación de aminoácidos aromáticos por bacterias intestinales (fenilacetilglicina, sulfato de indoxilo) también mostraron un vínculo positivo con el aumento de peso.
- 10 El patrón metabólico urinario de la excreción de metabolitos a lo largo del tiempo pone de manifiesto una adaptación metabólica específica relacionada con el aumento de peso inducido por la dieta y la prevención mediante el uso de prebióticos
- 15 La aplicación de análisis similares de datos para el modelado de datos dentro del grupo ha revelado las especificidades grupales en cuanto a la adaptación metabólica microbiana del huésped y del intestino, las cuales pueden vincularse a la reducción beneficiosa del aumento de peso corporal.
- 20 En concreto, el grado de variación del nivel urinario de los co-metabolitos microbianos intestinales, incluyendo TMA, TMAO, fenilacetilglicina, sulfato de indoxilo, sugiere un cambio del procesamiento metabólico del componente dietético por la microbiota intestinal, que depende del tiempo y de la nutrición. Así como los niveles de TMA y TMAO en la orina se reducen significativamente con la 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 a TMAO. Por el contrario, mientras la concentración de sulfato de indoxilo y fenilacetilglicina en la orina tiende a disminuir ligeramente mediante la dieta rica en grasas, con la administración de los suplementos prebióticos se observa una
- 25 mayor reducción. Estas observaciones, además de la fuerte correlación con el aumento de peso corporal, tienden a ilustrar que la eficacia de la modulación prebiótica de la microbiota intestinal es fundamental para mediar beneficiosamente en la prevención del aumento de peso.
- 30 Por lo tanto el tratamiento con DRG puede implicar cambios significativos en la actividad de la microbiota intestinal, prevenidos con prebióticos (TMA/TMAO) o compensados por otros procesos microbianos, tales como la fermentación proteolítica (fenilacetilglicina, sulfato de indoxilo).
- 35 Paralelamente estos cambios microbianos intestinales están asociados a una modulación significativa del metabolismo energético central del huésped.
- 40 La excreción de isovalerilglicina y α -cetoisovalerato aumentó de manera significativa y constante a lo largo del tiempo en el grupo alimentado con DRG respecto al grupo alimentado con DPG, por lo cual se proponen como biomarcadores cualitativos y estables de OID (obesidad inducida por la dieta). La suplementación prebiótica previno estos cambios, como lo demostró un mantenimiento o una ligera disminución del nivel urinario de α -cetoisovalerato y un incremento retardado de isovaleroilglicina. Este último cambio y concentraciones similares observadas el día 70 en grupos con y sin prebióticos sugirieron que el fenotipo de sobrepeso en el día 70 inducía un cambio significativo en el metabolismo energético. Sin embargo, su retraso en el período de adaptación metabólica al cambio de dieta parece correlacionarse con la eficacia de los prebióticos destinados a la prevención del aumento de peso. Además, también se observó un efecto transitorio similar en la excreción urinaria de creatinina, que es un marcador bien
- 45 aceptado de la masa magra y del metabolismo muscular.
- 50 Además, el efecto beneficioso de los prebióticos se pudo observar por los cambios específicos del oxalocetato como producto metabólico intermedio del ácido tricarbóxico y del respectivo tartrato, lo cual sugiere una modulación de la producción de energía relacionada con un uso diferencial de los nutrientes que alimentan el cuerpo.
- 55 Por último se observaron algunas especificidades en relación con el metabolismo de la carnitina y la acilcarnitina, con un efecto inferido en la oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo mitocondrial, con una estimulación específica del respectivo procesamiento fisiológico en los animales que recibieron prebióticos GOS-CMOS.
- 60 Además, para evaluar la relación entre los cambios metabólicos tempranos en la excreción urinaria de metabolitos y el aumento de peso, calculamos el nivel de variación metabólica durante la primera semana posterior al cambio de dieta y el grado de esta relación con el aumento de peso lo comparamos con la concentración relativa de metabolitos y su relación con la concentración de creatinina (tabla 1). El análisis mostró una correlación fuerte y consistente entre el aumento de peso y el nivel de cambio y la concentración relativa de los metabolitos, incluyendo
- 65 alfa-ceto-isovalerato, sulfato de indoxilo, trimetilamina, fenilacetilglicina, oxaloacetato y creatinina. Además, el nivel de cambios se indica después de una semana y después de 70 días de la dieta rica en grasas, con y sin prebióticos, para cada grupo y para el aumento de peso corporal (tabla 2).
- Las observaciones anteriores sobre la relación de metabolitos específicos con el aumento de peso, su modulación específica con prebióticos y su identificación como indicadores metabólicos tempranos de respuesta a la intervención prebiótica permiten usar los biomarcadores aquí descritos para diagnosticar la probabilidad de una

respuesta positiva a la intervención nutricional a base de prebióticos, destinada a prevenir el aumento de peso inducido por la dieta.

La regulación del metabolismo mitocondrial en ratones alimentados con una DRG se investigó previamente utilizando un método metabonómico. La excreción urinaria de productos intermedios de la oxidación β : hexanoilglicina, carnitina y acilcarnitina aumentó constantemente en la orina de los ratones alimentados con RG en comparación con los ratones alimentados con PG, lo cual sugiere un aumento del exceso de ácidos grasos en las mitocondrias y una activación de la oxidación β . En el presente estudio los prebióticos tienden a promover un incremento de estos procesos metabólicos, lo cual indica una oxidación más eficiente de los ácidos grasos, que se mantiene con el tiempo.

La leucina, la valina, la isoleucina y los productos intermedios del catabolismo de los AACR (isovalerilglicina, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetoisovalerato) aumentaron de modo significativo y constante en los ratones alimentados con RG, respaldando la hipótesis de la sobreregulación del catabolismo de los AACR relacionada con la DRG. En el presente estudio los prebióticos tienden a prevenir el aumento específico del catabolismo de isoleucina, como lo demostró el mantenimiento de los niveles normales de alfa-ceto-iso-valerato.

El catabolismo de la valina y la isoleucina puede estar sobreregulado en los ratones alimentados con RG, induciendo la formación de succinil-CoA y la producción de los siguientes intermedios del ciclo de Krebs. Sorprendentemente, los otros intermedios del ciclo de Krebs (citrato, cis-aconitasa, α -cetoglutarato) no difirieron significativamente entre los ratones alimentados con PG y RG, lo cual sugiere una desconexión entre el catabolismo de leucina y la oxidación beta productora de acetil-CoA y el ciclo de Krebs. Las regulaciones metabólicas específicas podrían desviar el flujo de acetil-CoA hacia otras vías metabólicas. Estos resultados confirman que la DRG induce una sobreregulación de las vías oxidativas mitocondriales y del ciclo de Krebs, que podría producir un aumento de la producción de energía. En el presente estudio los prebióticos tienden a inducir una modulación profunda de los productos intermedios del ciclo de Krebs, lo cual sugiere un metabolismo diferencial de las vías oxidativas mitocondriales.

Por último, los hallazgos actuales mostraron que la modulación prebiótica de las actividades microbianas intestinales y el subsiguiente metabolismo de los productos derivados por parte del huésped pueden ser esenciales para mediar beneficiosamente en el aumento de peso. Además, la adaptación metabólica temprana a los cambios de dieta parece correlacionarse con el fenotipo metabólico y antropométrico adquirido por los animales, y por lo tanto los metabolitos relacionados con los microbios intestinales son marcadores clave para futuras soluciones nutricionales personalizadas de control del peso.

Formas adicionales de ejecución

En otros aspectos, la presente invención proporciona las formas de ejecución descritas en los siguientes párrafos numerados.

1. Método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos destinados a prevenir el aumento de peso inducido por la dieta, que consiste en

- a) determinar un nivel de trimetilamina en una muestra de orina obtenida de un sujeto que haya consumido prebióticos, y
- b) comparar el nivel de trimetilamina del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

de manera que un aumento del nivel de trimetilamina, o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina, en la muestra de orina respecto al valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.

2. Método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos destinados a prevenir el aumento de peso inducido por la dieta, que consiste en

- a) determinar un nivel de sulfato de indoxilo en una muestra de orina obtenida de un sujeto que haya consumido prebióticos, y
- b) comparar el nivel de sulfato de indoxilo del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

de manera que un descenso del nivel de sulfato de indoxilo, o una ausencia de cambio en el nivel de sulfato de indoxilo, en la muestra de orina respecto al valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.

3. El método del párrafo 1 o del párrafo 2, en que la dieta es rica en grasas.

4. El método de cualquier párrafo precedente, que además comprende las etapas de
- a) determinar el nivel de al menos otro biomarcador elegido del grupo formado por trimetilamina, oxaloacetato, creatinina, sulfato de indoxilo y alfa-ceto-isovalerato en la muestra de orina, y
 - b) comparar el nivel del sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia predeterminado, de manera que:
 - (i) un descenso del 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 del nivel de trimetilamina, o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina, en la muestra de orina,
- respecto a los valores de referencia predeterminados indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.
5. El método según cualquier párrafo precedente, en el cual los niveles de los biomarcadores en la muestra de orina se determinan por RMN- H^1 y/o espectrometría de masas.
6. El método según cualquier párrafo precedente, en el cual el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de trimetilamina y/o de sulfato de indoxilo en la orina de una población de control constituida por sujetos consumidores de una dieta rica en grasas.
7. El método según cualquiera de los párrafos 1 a 5, en que el valor de referencia predeterminado es el nivel de trimetilamina y/o de sulfato de indoxilo en la orina del sujeto antes de consumir los prebióticos.
8. El método según cualquier párrafo precedente, en el cual el nivel de trimetilamina, de sulfato de indoxilo y/o de los demás biomarcadores se determina en una muestra de orina obtenida del sujeto después de al menos tres días consecutivos de consumo de prebióticos.
9. El método según cualquier párrafo precedente, en el cual el prebiótico se selecciona del grupo constituido por oligosacáridos que llevan opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, sobre todo fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de ellos.
10. El método según el párrafo 9, en el cual los prebióticos se eligen del grupo formado por fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de leche bovina (BMOS), glicosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), gomas y/o sus hidrolizados, pectinas y/o sus hidrolizados, y combinaciones de los mismos.
11. El método del párrafo 10, en que los prebióticos incluyen (a) galacto-oligosacáridos (GOS), (b) oligosacáridos de leche bovina (BMOS) o (c) inulina y fructo-oligosacáridos (FOS).
12. El método del párrafo 11, en que los oligosacáridos de leche bovina (BMOS) incluyen oligosacáridos de leche bovina-galacto-oligosacáridos (CMOS-GOS).
13. El método según cualquier párrafo precedente, en el cual el sujeto haya consumido una cantidad de al menos 2 g/día de prebióticos.
14. El método según cualquier párrafo precedente, en que el sujeto es un mamífero como un humano; una especie no humana, incluyendo un primate; un animal de ganadería como una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un asno o una cabra; animales de ensayos de laboratorio, como ratones, ratas, conejos, cobayas o hámsters; o un animal de compañía, como un perro o un gato.
15. El método según cualquier párrafo precedente, que se usa para diseñar una dieta estratificada para un grupo de sujetos o una dieta personalizada para el sujeto.
16. Un método para prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta, que consiste en:
- a) poner en práctica un método como el descrito en cualquiera de los párrafos 1 a 15, y
 - b) administrar prebióticos al sujeto si (i) el nivel de trimetilamina en la muestra de orina ha aumentado o no ha variado y/o (ii) el nivel de sulfato de indoxilo en la muestra de orina ha disminuido o no ha variado respecto al valor de referencia predeterminado.
17. Un método según el párrafo 16, en que la administración de prebióticos al sujeto se prolonga durante al menos un mes.

18. Un método según el párrafo 16, en que si (i) el nivel de trimetilamina en la muestra de orina ha disminuido o no ha variado y/o (ii) el nivel de sulfato de indoxilo en la muestra de orina ha aumentado o no ha variado respecto al valor de referencia predeterminado, no se administran prebióticos al sujeto.

5 19. Un método según el párrafo 18, que consiste en proporcionar al sujeto un tratamiento alternativo para prevenir el aumento de peso, elegido entre la restricción calórica, la reducción de la ingesta de grasa en la dieta, un producto de pérdida de peso no prebiótico o un programa de ejercicio.

10 20. Un biomarcador urinario para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta, siendo dicho biomarcador la trimetilamina.

21. Un biomarcador urinario para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta, siendo dicho biomarcador el sulfato de indoxilo.

15 22. Uso de trimetilamina como biomarcador urinario para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta.

20 23. Uso de sulfato de indoxilo como biomarcador urinario para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta.

25 Aunque la presente invención se haya descrito a modo de ejemplo debe tenerse en cuenta la posibilidad de realizar variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la misma, tal como está definida en las reivindicaciones. Además, si existen equivalencias conocidas de características concretas, éstas se incorporan como si se estuvieran citadas específicamente en esta descripción. Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de las figuras y ejemplos no limitativos.

30 Los expertos en la materia entenderán que pueden combinar libremente todas las características aquí reveladas de la presente invención. En particular se pueden combinar las características descritas en distintas formas de ejecución de la presente invención.

35 Tal como se usan en esta descripción, los términos “comprende”, “que comprende” y similares, no deben interpretarse en un sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, quieren significar “incluyendo, sin limitarse a ellos”.

Cualquier referencia en esta descripción a documentos del estado técnico anterior no se debe considerar como una aceptación de que dicho estado técnico anterior sea ampliamente conocido o forme parte del conocimiento general y común en este campo.

Tabla 1: Resumen de las relaciones entre los metabolitos y el aumento de peso en la ganancia de peso inducida por un alto contenido de grasas

Metabolitos	Coeficiente de correlación con el aumento de peso en animales alimentados con dieta rica en grasas (valor r)		
	Nivel de cambio (T7/T0)	Concentración T7	Relación 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

5 Tabla 2: Resumen del nivel de cambios a lo largo del tiempo de metabolitos escogidos en animales alimentados con una dieta rica en grasas suplementada o no con prebióticos

Metabolito	Grupo	Nivel de cambio (T7/T0)	Nivel de cambio (T70/T0)
Ganancia de peso corporal	Control pobre en grasa	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Control rico en grasa	1,1 ± 0,0	1,6 ± 0,2
	Rico en grasa + GOS	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1
	Rico en grasa + GOSCMOS	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,1
	Rico en grasa + Prebio 1	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1
	Rico en grasa + lactosa	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1
Acil-carnitina	Control pobre en grasa	93,3 ± 26	95,7 ± 21,4
	Control rico en grasa	108 ± 15,3	112,4 ± 13,8
	Rico en grasa + GOS	84,8 ± 11,6	88,9 ± 11
	Rico en grasa + GOSCMOS	126 ± 15,9	109,2 ± 17,3
	Rico en grasa + Prebio 1	96,2 ± 28,1	108,3 ± 29,8
	Rico en grasa + lactosa	105 ± 14,8	112,2 ± 16,1
Carnitina	Control pobre en grasa	101,8 ± 18,6	110,4 ± 16
	Control rico en grasa	115,9 ± 14,1	130,9 ± 17,9
	Rico en grasa + GOS	102,1 ± 13,4	122,9 ± 13,6
	Rico en grasa + GOSCMOS	226,2 ± 33,3	293,6 ± 39,4
	Rico en grasa + Prebio 1	101,7 ± 9,6	127 ± 13,6
	Rico en grasa + lactosa	119,7 ± 8,6	132,2 ± 14,1
Creatinina	Control pobre en grasa	104,4 ± 18,7	118,5 ± 19,5
	Control rico en grasa	100,3 ± 17,4	131,4 ± 27,3
	Rico en grasa + GOS	86,8 ± 24,1	109,8 ± 30,9
	Rico en grasa + GOSCMOS	87,1 ± 10,8	93,1 ± 15,1
	Rico en grasa + Prebio 1	91,6 ± 10,9	107,6 ± 17,1
	Rico en grasa + lactosa	106,2 ± 16	125,4 ± 18
Sulfato de indoxilo	Control pobre en grasa	99,6 ± 26	119,8 ± 34,6
	Control rico en grasa	96,1 ± 23,7	118,3 ± 49,8
	Rico en grasa + GOS	46,7 ± 9,4	56,1 ± 11,4
	Rico en grasa + GOSCMOS	50,8 ± 12,1	48,9 ± 10,6
	Rico en grasa + Prebio 1	54,6 ± 16,8	68 ± 21,7
	Rico en grasa + lactosa	86,7 ± 23,9	99 ± 32,3

ES 2 675 218 T3

(continuación)

Metabolito	Grupo	Nivel de cambio (T7/T0)	Nivel de cambio (T70/T0)
Isovalerilglicina	Control pobre en grasa	105,4 ± 18,8	106,8 ± 42,5
	Control rico en grasa	128 ± 30,4	131,3 ± 38,2
	Rico en grasa + GOS	118,2 ± 28,2	143,5 ± 45,2
	Rico en grasa + GOSCMOS	116,5 ± 16,5	116,1 ± 18,3
	Rico en grasa + Prebio 1	129,1 ± 28,6	137,7 ± 24,4
	Rico en grasa + lactosa	130,2 ± 24,2	125,7 ± 25,8
Oxaloacetato	Control pobre en grasa	101,1 ± 24,7	111,9 ± 19,4
	Control rico en grasa	103,2 ± 18,4	120,7 ± 30,7
	Rico en grasa + GOS	66,2 ± 7,6	68,8 ± 7,7
	Rico en grasa + GOSCMOS	64,6 ± 8,4	59,3 ± 7,9
	Rico en grasa + Prebio 1	69,5 ± 12,5	71,9 ± 13
	Rico en grasa + lactosa	95,2 ± 14,7	102,3 ± 17,5
Fenilacetilglicina	Control pobre en grasa	107,2 ± 20,2	128,9 ± 34,8
	Control rico en grasa	77,7 ± 15,6	102,3 ± 28,5
	Rico en grasa + GOS	41,8 ± 8,6	82,7 ± 36,4
	Rico en grasa + GOSCMOS	42,5 ± 10,3	55,2 ± 17,7
	Rico en grasa + Prebio 1	50,4 ± 23,3	69,3 ± 27,6
	Rico en grasa + lactosa	72,4 ± 15	91,5 ± 14,8
Tarttrato	Control pobre en grasa	94,6 ± 36,3	114 ± 72,8
	Control rico en grasa	123,1 ± 40,3	172,4 ± 104
	Rico en grasa + GOS	117 ± 60,8	117,4 ± 84,3
	Rico en grasa + GOSCMOS	95,3 ± 38,1	111,2 ± 46,9
	Rico en grasa + Prebio 1	123 ± 111,7	139,7 ± 103,4
	Rico en grasa + lactosa	115,3 ± 52	150,5 ± 62,9
Taurina	Control pobre en grasa	90,8 ± 24,6	117,1 ± 69,1
	Control rico en grasa	81,9 ± 39,6	72,6 ± 33,2
	Rico en grasa + GOS	93,1 ± 45,4	75,1 ± 46,1
	Rico en grasa + GOSCMOS	86,1 ± 45,9	89,4 ± 46,3
	Rico en grasa + Prebio 1	127,3 ± 53,6	104,6 ± 40,5
	Rico en grasa + lactosa	120,8 ± 68,1	129,9 ± 87,8
Trimetilamina (TMA)	Control pobre en grasa	134,1 ± 138,4	160,6 ± 170,9
	Control rico en grasa	45,6 ± 35	44,5 ± 38,4
	Rico en grasa + GOS	37,8 ± 23,9	39,7 ± 23
	Rico en grasa + GOSCMOS	118,7 ± 78,7	125,5 ± 57,9
	Rico en grasa + Prebio 1	94,5 ± 74,4	106 ± 122,4
	Rico en grasa + lactosa	62,6 ± 53,5	51,6 ± 38,1
Trimetilamina-N-óxido (TMAO)	Control pobre en grasa	83,7 ± 34,8	122,2 ± 73,2
	Control rico en grasa	80,1 ± 40,1	72,5 ± 31,4
	Rico en grasa + GOS	79,3 ± 41,1	74,3 ± 36,8
	Rico en grasa + GOSCMOS	82,4 ± 39,9	110,6 ± 58,7
	Rico en grasa + Prebio 1	101,2 ± 39,3	94,4 ± 43,3
	Rico en grasa + lactosa	101,4 ± 50,7	98,5 ± 44,6
Alfa-ceto-isovalerato	Control pobre en grasa	106,8 ± 10,3	94,8 ± 15
	Control rico en grasa	150,4 ± 26,1	119,7 ± 20,7
	Rico en grasa + GOS	124,1 ± 20,6	124,4 ± 21
	Rico en grasa + GOSCMOS	132 ± 14,3	120 ± 17,3
	Rico en grasa + Prebio 1	126 ± 23,9	125,1 ± 18,1
	Rico en grasa + lactosa	147,6 ± 15,7	126,8 ± 13,7

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para predecir y/o cuantificar la respuesta de un sujeto a los prebióticos destinados a prevenir el aumento de peso inducido por la dieta, que consiste en
- a) determinar un nivel de alfa-ceto-isovalerato en una muestra de orina obtenida de un sujeto que haya consumido prebióticos, y
b) comparar el nivel de alfa-ceto-isovalerato del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 10 de manera que un descenso del nivel de alfa-ceto-isovalerato, o una ausencia de cambio en el nivel de alfa-ceto-isovalerato, en la muestra de orina respecto al valor de referencia predeterminado indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el cual la dieta es rica en grasas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que además comprende las etapas de
- a) determinar el nivel de al menos otro biomarcador elegido del grupo formado por oxaloacetato, creatinina, trimetilamina y sulfato de indoxilo en la muestra de orina, y
b) comparar el nivel del sujeto de al menos otro biomarcador con un valor de referencia predeterminado,
- 20 de manera que:
- (i) un descenso del nivel de oxaloacetato, creatinina y/o sulfato de indoxilo, o una ausencia de cambio en el nivel de oxaloacetato, creatinina y/o sulfato de indoxilo, en la muestra de orina, y/o
(ii) un aumento del nivel de trimetilamina, o una ausencia de cambio en el nivel de trimetilamina, en la muestra de
- 25 orina,
- respecto a los valores de referencia predeterminados indica que la administración de prebióticos es efectiva para prevenir la ganancia de peso del sujeto inducida por la dieta.
- 30 4. El método según cualquier reivindicación precedente, en el cual los niveles de los biomarcadores en la muestra de orina se determinan por RMN-¹H y/o espectrometría de masas.
5. El método según cualquier reivindicación precedente, en el cual el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de alfa-ceto-isovalerato en la orina de una población de control de sujetos consumidores de una dieta rica en grasas.
- 35 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el valor de referencia predeterminado es el nivel de alfa-ceto-isovalerato en la orina del sujeto antes de consumir los prebióticos.
- 40 7. El método según cualquier reivindicación precedente, en que el nivel de alfa-ceto-isovalerato y/o de los demás biomarcadores se determina en una muestra de orina obtenida del sujeto después de al menos tres días consecutivos de consumo de prebióticos.
- 45 8. El método según cualquier reivindicación precedente, en el cual el prebiótico se selecciona del grupo constituido por oligosacáridos que llevan opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, sobre todo fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de ellos.
9. El método según la reivindicación 8, en el cual los prebióticos se seleccionan del grupo constituido por fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de leche bovina (BMOS), glicosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), gomas y/o sus hidrolizados, pectinas y/o sus hidrolizados, y combinaciones de ellos.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el cual los prebióticos comprenden (a) galacto-oligosacáridos (GOS), (b) oligosacáridos de leche bovina (BMOS) o (c) inulina y fructo-oligosacáridos (FOS).
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en que los oligosacáridos de leche bovina (BMOS) incluyen oligosacáridos de leche bovina-galacto-oligosacáridos (CMOS-GOS).
- 60 12. El método según cualquier reivindicación precedente, en el cual el sujeto haya consumido una cantidad de al menos 2 g/día de prebióticos.
- 65 13. El método según cualquier reivindicación precedente, en el cual el sujeto es un mamífero como un humano; una especie no humana, incluyendo un primate; un animal de ganadería como una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un asno o una cabra; animales de ensayos de laboratorio, como ratones, ratas, conejos, cobayas o hámsters; o un animal de compañía, como un perro o un gato.

14. El método según cualquier reivindicación precedente, que se usa para diseñar una dieta estratificada para un grupo de sujetos o una dieta personalizada para el sujeto.

5 15. Uso de alfa-ceto-isovalerato como biomarcador urinario para predecir y/o cuantificar la respuesta de los sujetos a los prebióticos destinados a prevenir la ganancia de peso de un sujeto inducida por la dieta.

Figura 1

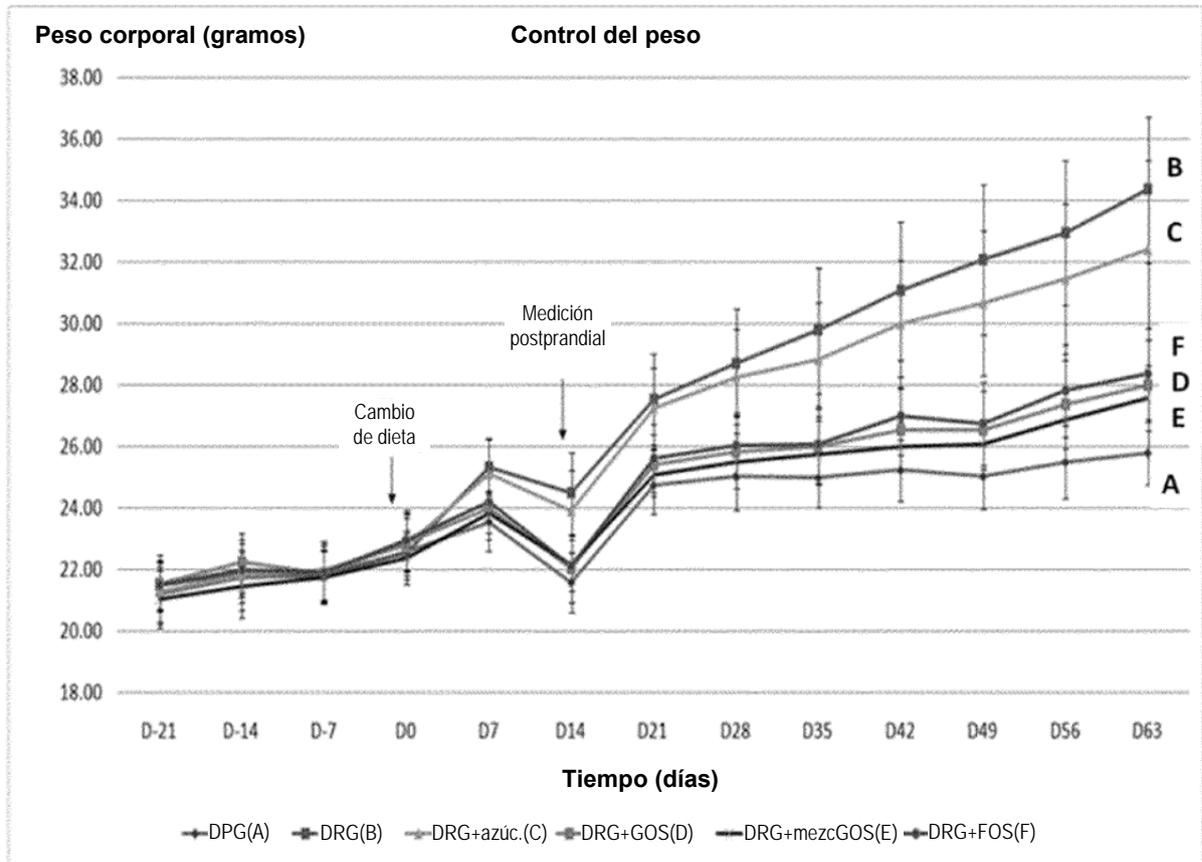


Figura 2

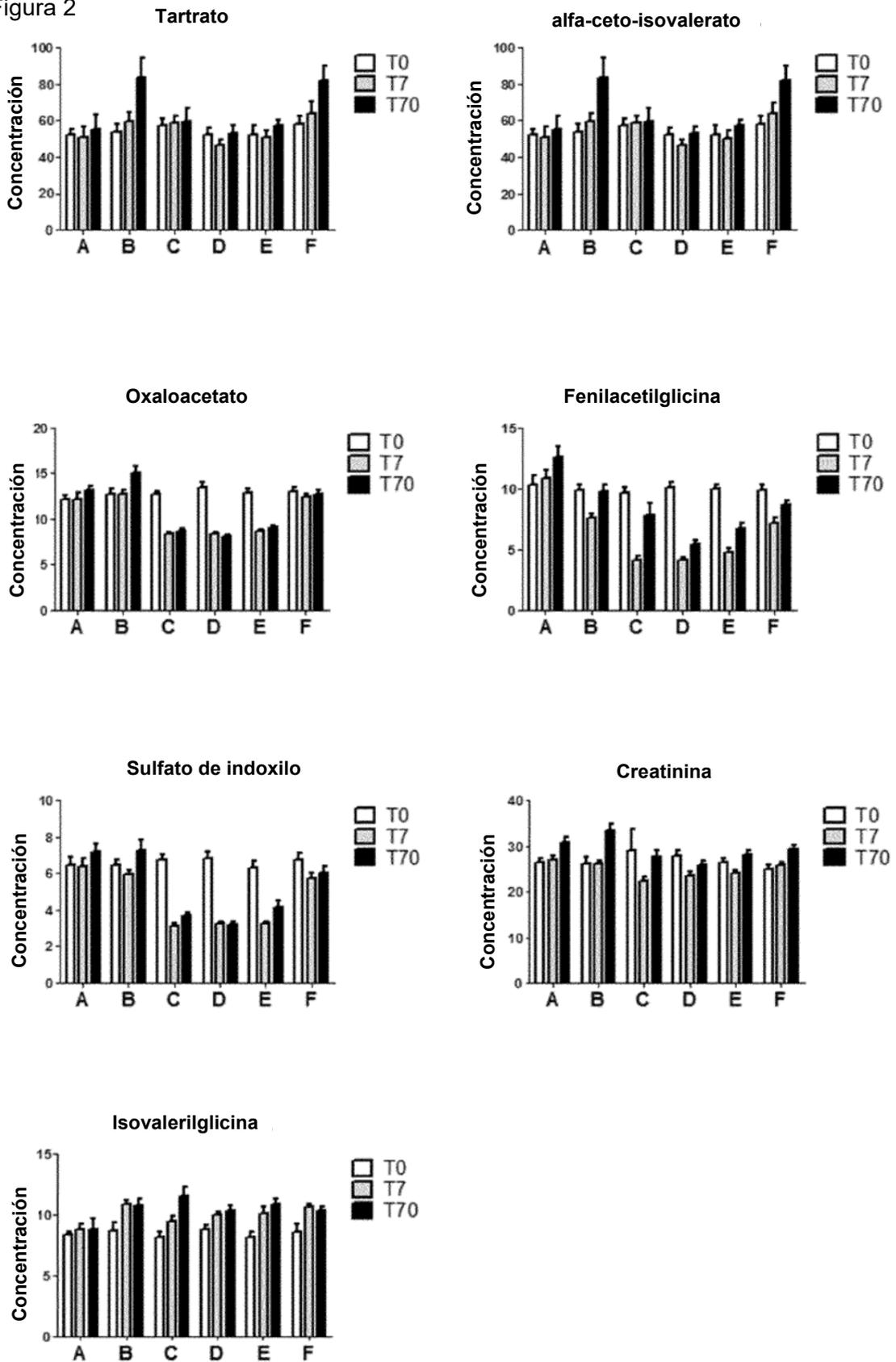


Figura 3

