(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 747 234**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/205 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61K 31/133 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015** **PCT/US2015/052380**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16049541**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015** **E 15843415 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3197442**

(54) Título: **Tratamiento y prevención de enfermedades con agentes reductores de TMA y TMAO**

(30) Prioridad:

26.09.2014 US 201462056168 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2020

(73) Titular/es:

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (100.0%)
9500 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44195, US

(72) Inventor/es:

HAZEN, STANLEY L.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 747 234 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

Tratamiento y prevención de enfermedades con agentes reductores de TMA y TMAO

Campo de la invención

En el presente documento se desvelan composiciones, sistemas y procedimientos para tratar enfermedades, como enfermedades renales y/o enfermedades cardiovasculares, con un agente que reduce la producción de trimetilamina (TMA) o trimetilamina N-óxido (TMAO) en un sujeto. En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el agente es: i) 3,3-dimetil-1-butanol (DMB) o un derivado de DMB o un compuesto relacionado, ii) ácido acetilsalicílico o derivado del mismo (por ejemplo, con un recubrimiento entérico para administración al colon y/o ciego); iii) un inhibidor de la flavina monooxigenasa 3 (FMO3); iv) un inhibidor de la TMA liasa intestinal; v) un antibiótico o antimicrobiano; vi) un probiótico o prebiótico; vii) un agente antiplaquetario, o vii) un agente secuestrante de la TMA y/o el TMAO.

Antecedentes

Los riñones del cuerpo humano funcionan para eliminar el exceso de líquidos y algunos iones. La unidad funcional del riñón es la nefrona. Una nefrona consiste en una unidad de filtrado de pequeños vasos sanguíneos llamados glomérulos unidos a un túbulo. Cuando la sangre penetra en el glomérulo, se filtra y el líquido restante pasa a lo largo del túbulo. En el túbulo, se agregan sustancias químicas y agua o se eliminan de este fluido filtrado de acuerdo con las necesidades corporales, y el producto final es la orina, que se excreta.

En pacientes con enfermedad renal crónica, la función renal se ve gravemente comprometida. La enfermedad renal crónica (ERC), también conocida como enfermedad crónica del riñón, es una pérdida progresiva de la función renal durante un período de meses o años. La etapa más grave de la ERC es la enfermedad renal terminal (ESRD), que ocurre cuando los riñones dejan de funcionar. Las dos causas principales de ERC son la diabetes y la presión arterial alta, que son responsables de hasta dos tercios de los casos. La enfermedad cardíaca es la principal causa de muerte para todas las personas que tienen ERC. Se puede acumular un exceso de líquido en pacientes que padecen ESRD. La tasa de mortalidad de los pacientes con ESRD que reciben terapia de hemodiálisis tradicional es del 24 % por año, con una tasa de mortalidad aún mayor entre los pacientes diabéticos. El líquido se acumula en pacientes con ESRD porque los riñones ya no pueden eliminar efectivamente el agua y otros líquidos del cuerpo. El líquido se acumula primero en la sangre y luego se acumula en todo el cuerpo, lo que produce hinchazón de las extremidades y otros tejidos como edema. Esta acumulación de líquido provoca un mayor estrés en el corazón, lo que a su vez provoca un aumento significativo de la presión arterial o la hipertensión, lo que puede provocar insuficiencia cardíaca.

Aunque la población de pacientes con ERC crece cada año, no hay cura. Los tratamientos actuales para la ERC buscan frenar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, la función renal disminuye y, finalmente, se utiliza la terapia de reemplazo renal para compensar la pérdida de la función renal. La terapia de reemplazo renal implica el trasplante de un nuevo riñón o diálisis.

Los procedimientos para tratar la enfermedad renal requieren el procesamiento de sangre para extraer componentes de desecho como la urea y los iones. El tratamiento tradicional para la enfermedad renal implica diálisis. La diálisis emula la función renal al eliminar los componentes de desecho y el exceso de líquido de la sangre de un paciente. Esto se logra permitiendo que los fluidos corporales, generalmente la sangre, se acerquen al dializado, que es un fluido que sirve para limpiar la sangre y eliminar activamente los componentes de desecho y el exceso de agua. Durante este procedimiento, la sangre y el dializado están separados por una membrana de diálisis, que es permeable al agua, moléculas pequeñas (como la urea) e iones pero no permeables a las células. Cada sesión de diálisis dura unas pocas horas y puede repetirse hasta tres veces por semana.

Los procedimientos tradicionales, como la diálisis, requieren un procesamiento extracorpóreo de fluidos corporales. Una vez que la sangre se purifica, se devuelve al paciente. Aunque son efectivos para eliminar los componentes de desecho de la sangre, los tratamientos de diálisis se administran de manera intermitente y, por lo tanto, no emulan la función continua de un riñón natural. Una vez que se completa la sesión de diálisis, el líquido comienza a acumularse nuevamente en los tejidos del paciente. A pesar de los beneficios de la diálisis, las estadísticas indican que tres de cada cinco pacientes de diálisis mueren en los cinco años siguientes desde el comienzo del tratamiento. Los estudios han demostrado que aumentar la frecuencia y la duración de las sesiones de diálisis puede mejorar la supervivencia de los pacientes en diálisis. El aumento de la frecuencia y la duración de las sesiones de diálisis se asemeja más a la función renal continua que se busca emular. Sin embargo, el procesamiento extracorpóreo de los fluidos corporales aumenta las molestias, los inconvenientes y los costos asociados con el tratamiento. También existe un riesgo adicional de infección, que exige que los procedimientos se lleven a cabo bajo la supervisión de personal médico capacitado.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones que no se incluyen en estas reivindicaciones son solo para fines de referencia.

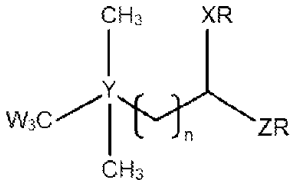
En el presente documento se desvelan composiciones, sistemas y procedimientos para tratar enfermedades, como enfermedades renales o enfermedades cardiovasculares, con un agente que reduce la producción de trimetilamina (TMA) o trimetilamina N-óxido (TMAO) en un sujeto. En ciertas realizaciones, el agente es: i) 3,3-dimetil-1-butanol (DMB) o un derivado de DMB o un compuesto relacionado, ii) ácido acetilsalicílico o un derivado del mismo (por ejemplo, con un recubrimiento entérico para la administración al colon y/o ciego); iii) un inhibidor de la flavina monooxigenasa 3 (FMO3); iv) un inhibidor de la TMA liasa intestinal; v) un antibiótico o antimicrobiano; vi) un probiótico o prebiótico; vii) un agente antiplaquetario; vii) un agente secuestrante de TMA y/o TMAO.

El 3,3-dimetil-1-butanol (DMB) y sus derivados se dan a conocer en el documento US 2012/0207822, para su uso, como inhibidores de la TMAO, en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En algunas realizaciones, se desvelan en el presente documento procedimientos para tratar o prevenir enfermedades renales y/o enfermedades cardiovasculares, que comprenden: tratar a un sujeto con un agente o procedimiento (o prescribir o recomendar el tratamiento con un agente o procedimiento), en el que: i) el sujeto tiene síntomas de enfermedad renal y/o enfermedad cardiovascular, y el tratamiento reduce o elimina al menos un síntoma de la enfermedad renal y/o cardiovascular; ii) el sujeto está aparentemente sano, pero tiene niveles elevados de TMAO, y el tratamiento previene el desarrollo de enfermedades renales y/o cardiovasculares crónica en el sujeto; o iii) el sujeto tiene una disminución de la función renal relacionada con la edad, y el tratamiento previene o atenúa la disminución adicional de la función renal; y iv) dicho procedimiento se selecciona de: a) 3,3-dimetil-1-butanol (DMB) o un derivado de DMB o un compuesto relacionado (por ejemplo, como se muestra en la Tabla 3); b) ácido acetilsalicílico con o sin recubrimiento entérico; c) un derivado de ácido acetilsalicílico con o sin recubrimiento entérico; d) un inhibidor de la flavina monooxigenasa 3 (FMO3); e) un inhibidor de la TMA liasa intestinal; f) trasplante de microbiota fecal; g) administración de ácido acetilsalicílico o derivado del mismo directamente al colon o ciego del sujeto; h) un antibiótico o antimicrobiano que reduce la producción de trimetilamina (TMA) en el intestino; i) un probiótico o prebiótico que reduce la producción de TMA en el intestino; j) un agente antiplaquetario; y k) un agente secuestrante de TMA y/o TMAO. En ciertas realizaciones, un sujeto se trata profilácticamente con los agentes y procedimientos mencionados en el presente documento para promover la salud renal y prevenir el deterioro de la función renal inducido por TMAO.

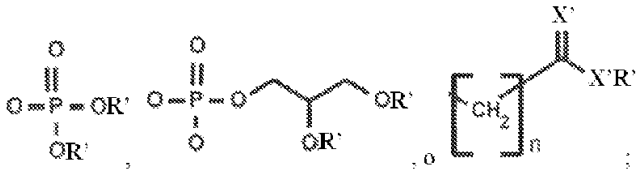
En realizaciones particulares, en lugar de, o además del tratamiento, al paciente se le prescribe uno de los agentes o procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, a un paciente con enfermedad renal y/o cardiovascular también o como alternativa, se le prescribe una dieta con niveles reducidos de compuestos que contienen carnitina (por ejemplo, se le prescribe una dieta vegetariana o vegana). En ciertas realizaciones, la dieta es una dieta mediterránea, o una dieta baja en precursores de TMAO (por ejemplo, baja en colina, lecitina, carnitina, etc.), o baja en TMAO (por ejemplo, una dieta baja en ciertos pescados, como bacalao, tilapia, lubina chilena, etc.).

En ciertas realizaciones, se analiza una muestra del sujeto para determinar las concentraciones de eGFR, eCrCl, cistatina C, KIM1, microalbuniuria (un cociente albúmina/creatinina urinaria elevado), trimetilamina N-óxido (TMAO), TMA y/o compuesto que contiene TMA antes y/o después de dicho tratamiento. En realizaciones particulares, se encuentra que un sujeto necesita tratamiento si se encuentran niveles elevados de KIM1, TMA, TMAO o un cociente albúmina/creatinina urinaria elevado. En otras realizaciones, se encuentra que un sujeto necesita tratamiento si se encuentran niveles disminuidos de eGFR, eCrCl o aumentados de cistatina C. En otras realizaciones, la muestra comprende sangre completa, suero, plasma, aliento exhalado, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o lavado broncoalveolar.

En otras realizaciones, el derivado de DMB o compuesto relacionado es como se muestra en la Fórmula I a continuación:



en la que n es un número entero, o n es 0, lo que indica que CH_2 no está presente;
en la que cada W se selecciona independientemente de: H, Cl, F, Br o I (por ejemplo, W_3C = CH_3, CH_2Cl, CH_2Fl, CH_2Br, CH_2I, CF_3, CCl_3, CBr_3, CI_3, o $CHCl_2$);
en la que Y es C, N, Si, P, S, Ge, Sn, Pb, P, As, Sb o Bi;
en la que X es O o S y el enlace correspondiente está presente o ausente o es doble,
en la que R está ausente, H, un grupo alquilo, grupo alquenilo, grupo alquinilo, grupo fenilo, amida, alquilamida o un grupo bencilo;
en la que Z es C, CH_2, CH, NH, O o S,
en la que XR es, como alternativa, H, un éster, tioéster o tionoéster; glicerol, o una de las siguientes tres fórmulas:



en la que R' es H, un grupo alquilo, grupo alquenilo, grupo alquinilo, grupo fenilo o un grupo bencilo; y en la que X' es O o S. En ciertas realizaciones, R es amida o alquilamida, y Z es un O, y Z como un doble enlace O - un ácido carboxílico). En algunas realizaciones, los dos grupos metilo que se extienden desde Y están unidos por un alquilo o éter para formar un anillo de 4-6 miembros.

En realizaciones adicionales, el derivado de ácido acetilsalicílico o compuesto relacionado se selecciona del grupo que consiste en: ácido 4-metilsalicílico, ácido 5-(acetilamino)-2-hidroxibenzoico; ácido salicílico, sal de sodio, ácido 4-aminosalicílico, ácido 3-metilsalicílico, ácido 3-nitrosalicílico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, salicilato de 2-hidroxietilo, ácido 5-bromosalicílico, ácido 5-metilsalicílico, ácido 5-aminosalicílico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,4-dimetoxibenzoico, ácido 3-hidroxi-2-naftoico, ácido 5-nitrosalicílico, salicilato de fenilo, salicilato de etilo, ácido 5-yodosalicílico, salicilato de metilo, ácido 5,5'-metilendisalicílico, ácido pamoico, ácido 2-etoxibenzoico, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ocratoxina A, ácido 5-clorosalicílico, ácido 4-fluorosalicílico, 5-fluoro-2-hidroxibenzoato de metilo, ácido 2,4,5- trimetoxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido acetilsalicilsalicílico, ácido salicilsalicílico, ácido 6-metilsalicílico, aluminio, ácido 3-aminosalicílico, ácido 2,3,4-trimetoxibenzoico, ácido o-anísico, salicilato de isopropilo, ácido 3,5-dinitrosalicílico, ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico, ácido 5-formilsalicílico, ácido 2-hidroxi-4-nitrobenzoico, 3,5-diyodosalicilato de litio, ácido 4-fluorosulfonil-1-hidroxi-2-naftoico, ácido 3-metoxisalicílico, 1-hidroxi-2-naftoato de metilo, ácido carmínico, carmín (laca de aluminio de ácido carmínico, puro), carmín (tinción biológica de alta pureza, laca de aluminio de ácido carmínico), ácido 2,6-dimetoxibenzoico, ácido 2,3-dimetoxibenzoico, cromo Azurol S, sal sódica de amarillo de alizarina R, ácido 3-clorosalicílico, ácido 2-(trifluorometoxi)benzoico, 2,4-dimetoxibenzoato de metilo, 2,6-dihidroxibenzoato de metilo, 2,4-dihidroxibenzoato de metilo, salicilato de trietanolamina, ácido 2-etoxinaftoico, ácido 4-metoxisalicílico, ácido 5-metoxisalicílico, ácido 2,5-dimetoxibenzoico, ácido 3,5-dibromosalicílico, ácido 6-metoxisalicílico, ácido 5-cloro-o-anisico, cromoxano cianina R, ácido 3-hidroxi-4-(2-hidroxi-4-sulfo-1-naftilazo)naftalen-2-carboxílico, 2,3-dihidroxibenzoato de etilo calidad indicador, 5-yodosalicilato de metilo, 5-cloro-2-hidroxibenzoato de metilo, 4-acetamido-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo, ácido 2-(acetiloxi) -3-metilbenzoico, ácido 2-(acetiloxi)-3-metilbenzoico, ácido 1,4-benzodioxan-5-carboxílico, ácido 2-metoxi-5-(trifluorometil)benzoico, ácido 4-clorosalicílico, 4-metoxisalicilato de metilo, ácido 1,3-benzodioxol-4-carboxílico, ácido 5-sulfosalicílico dihidrato, ácido sulfosalicílico dihidrato, ácido 5-sulfosalicílico dihidrato, amarillo mordiente 10, ácido 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoico, 5-acetilsalicilato de metilo, ácido 5-clorosulfonil-2-hidroxibenzoico, 2-[2-(dimetilamino)etoxi]benzoato de metilo, alfa-Apo-oxitetraciclina, beta-Apo-oxitetraciclina, ácido 3,5-di-terc-butilsalicílico, 3,5-dibromo-2-hidroxibenzoato de metilo, ácido 2-(3-metoxifenoxi)benzoico, 3-nitrosalicilato de metilo, 5-metilsalicilato de metilo, 4-amino-2-metoxibenzoato de metilo, ácido croman-8-carboxílico, 2,5-di(2,2,2-trifluoroetoxi)benzoato de metilo, ácido 2,3-dihidrobenzo[b]furan-7- carboxílico, 3-amino-2-hidroxibenzoato de metilo, ácido 3-cloro-2,6-dimetoxibenzoico, anhídrido 3-hidroxiftálico, ácido 5-bromo-2,3-dihidrobenzo[b]furano-7-carboxílico, ácido 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-7-carboxílico, ácido 6-fluorosalicílico, ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico monohidrato, ácido 3-bromo-2,6-dimetoxibenzoico, ácido 3-bromo-2,6-dimetoxibenzoico, ácido 3,5-dicloro-2,6-dimetoxibenzoico, Lavendustin A, ácido 2-fluoro-6-metoxibenzoico, ácido 5-bromo-2,4-dihidroxibenzoico monohidrato, ácido 3-cloro-2,6-dimetoxi-5-nitrobenzoico, 4,7-dibromo-3-metoxi-2-naftoato de metilo, ácido 2-(trifluorometoxi) tereftálico, ácido 2-metoxi-4,6-di(trifluorometil)benzoico, ácido 2-[2- (dimetilamino)etoxi]benzoico, ácido 2-[(5-cloro-3-piridil)oxi]-5-nitrobenzoico, ácido 6-fluoro-4H-1,3-benzodioxina-8-carboxílico, éster de pinacol del ácido 3-metoxi-4-(metoxicarbonil)fenilborónico, ácido 3-metoxi-4-(metoxicarbonil)fenilborónico, ácido 2-(tetrahidropiran-4-iloxi)benzoico, 2-(tetrahidro-2H-piran-4-iloxi)benzoato de pentafluorofenilo, éster de pinacol del ácido 3-hidroxi-4-(metoxicarbonil)fenilborónico e hidrato del ácido formilsalicílico.

En realizaciones particulares, el inhibidor de FMO3 comprende tenofovir o metimazol. En algunas realizaciones, el antibiótico es un antibiótico de amplio espectro. En realizaciones adicionales, el antibiótico es un antibiótico o una combinación de antibióticos seleccionados del grupo que consiste en: metronidazol, ciprofloxacina, neomicina y amoxicilina. En realizaciones particulares, el agente antiplaquetario se selecciona del grupo que consiste en: abciximab, dipiridamol/ASA, anagrelida, cilostazol, clopidogrel, dipiridamol, eptifabatida, prasugrel, ticagrelor, ticlopidina, tirofibán y vorapaxar. En realizaciones adicionales, el recubrimiento entérico proporciona la liberación de una mayoría del ácido acetilsalicílico o el derivado del ácido acetilsalicílico en el colon o ciego del sujeto.

En algunas realizaciones, el agente secuestrante de TMA y/o TMAO comprende carbón activado o clorofilina de cobre (por ejemplo, carbón activado a 750 mg 2x/día durante 10 días, o clorofilina de cobre a 60 mg 3x/día después de las comidas durante 3 semanas).

En algunas realizaciones, se desvelan en el presente documento sistemas que comprenden: a) un informe para un paciente con enfermedad renal y/o cardiovascular que indica que el paciente tiene niveles elevados de TMA o TMAO; y b) un agente para el tratamiento de enfermedades renales y/o cardiovasculares seleccionado de: i) 3,3-dimetil-1-butanol (DMB) o un derivado de DMB o un compuesto relacionado (por ejemplo, como se muestra en la Tabla 3); ii) ácido acetilsalicílico (aspirina) con o sin recubrimiento entérico; iii) un derivado de ácido acetilsalicílico

con o sin recubrimiento entérico; iv) un inhibidor de la flavina monooxigenasa 3 (FMO3); v) un inhibidor de la TMA liasa intestinal; vi) agentes de trasplante de microbiota fecal; vii) un antibiótico o antimicrobiano que reduce la producción de TMA en el intestino; viii) un probiótico o prebiótico que reduce la producción de TMA en el intestino; ix) un agente antiplaquetario, y x) un agente secuestrante de TMA y/o TMAO.

En ciertas realizaciones, se desvelan en el presente documento procedimientos para tratar enfermedades asociada con niveles elevados de TMA y/o trimetilamina N-óxido (niveles de TMAO) que comprenden: tratar a un sujeto con síntomas de una enfermedad asociada con niveles elevados de TMA y/o TMAO con un agente que comprende ácido acetilsalicílico o un derivado del ácido acetilsalicílico, en el que el tratamiento se hace en condiciones tales que la mayoría o la totalidad del agente se administra al colon y/o ciego del sujeto, y en el que el tratamiento da como resultado que al menos un síntoma de la enfermedad se reduzca o elimine.

En ciertas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular (p.ej., enfermedad coronaria, cor pulmonale, defecto cardíaco congénito, cardiomiopatía, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiopatía valvular, arritmia, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular y enfermedad cardíaca reumática). En ciertas realizaciones, la enfermedad es enfermedad renal. En otras realizaciones, el agente comprende un recubrimiento entérico que proporciona la liberación de una mayoría del agente en el colon y/o el ciego. En realizaciones adicionales, se analiza una muestra del sujeto para determinar las concentraciones de trimetilamina N-óxido (TMAO), TMA y/o un compuesto que contiene TMA antes y/o después del tratamiento.

En algunas realizaciones, se desvelan en el presente documento sistemas que comprenden: a) un informe para un paciente con una enfermedad asociada con niveles elevados de TMAO y/o TMA que indica que el paciente tiene niveles elevados de TMAO y/o TMA; y b) un agente para tratar la enfermedad, en el que el agente comprende ácido acetilsalicílico o un derivado de ácido acetilsalicílico (por ejemplo, con un recubrimiento entérico que permite la administración al colon y/o ciego de un sujeto).

En otras realizaciones, se desvelan en el presente documento sistemas que comprenden: a) un agente que comprende ácido acetilsalicílico o un derivado de ácido acetilsalicílico; y b) equipo que permite la administración del agente directamente al ciego y/o colon de un sujeto humano.

En realizaciones adicionales, se desvelan en el presente documento procedimientos para identificar inhibidores de la TMA liasa que comprenden: a) poner en contacto un compuesto que contiene TMA y un inhibidor candidato con un complejo que comprende la proteína yeaW (por ejemplo, de *E. coli*) y la proteína yeaX (por ejemplo, de *E. coli*) en condiciones en las que el complejo escinde el compuesto que contiene TMA si el inhibidor candidato no lo inhibe; y b) determinar si el complejo escinde el compuesto que contiene TMA, en el que la ausencia de escisión identifica al inhibidor candidato como un inhibidor de la TMA liasa.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-B muestran el valor pronóstico de las concentraciones plasmáticas de trimetilamina N-óxido (TMAO) en la Enfermedad Renal Crónica (ERC). En una cohorte de pacientes cardíacos estables sometidos a evaluación coronaria diagnóstica electiva, los sujetos con enfermedad renal crónica en estadio 3+ subyacente mostraron concentraciones más altas de TMAO en plasma en ayunas que aquellos sin ERC ($p < 0,01$, Figura 1A). Los cuartiles crecientes de las concentraciones plasmáticas de TMAO en ayunas presagian un mayor riesgo de mortalidad por todas las causas a los 5 años en pacientes con ERC (n = 521, FIG. 1B).

La Figura 2 muestra el valor pronóstico comparativo de TMAO y cistatina C en plasma en pacientes sin enfermedad renal crónica. Los sujetos con cistatina C (> 0,9 mg/dl) y TMAO (> 3,4 μM) elevados tuvieron el mayor riesgo de mortalidad a 5 años en esta cohorte sin ERC (n = 3.188).

Las Figuras 3A-F muestran que la exposición a colina/TMAO en la dieta contribuye a la fibrosis renal progresiva. Las concentraciones plasmáticas de TMAO (A) aumentan después de 6 semanas de alimentación con TMAO (0,12 %), o dietas de colina (1,0 %) frente a ratones alimentados con dieta para roedores (0,08 % de colina). Histología tricrómica de Masson (B) y morfometría cuantitativa (C) representativas y su relación con las concentraciones de TMAO (D), la activación de SMAD3 por fosforilación en la serina 423/425 (E) y su relación con las concentraciones de TMAO (F) en riñones de ratón después de 6 semanas de alimentación con dietas para roedores (0,08 % de colina), TMAO (0,12 %) y colina (1,0 %). La barra de escala representa 100 μm. ** P <0,01 frente a alimentación para roedores, n≥5 ratones por grupo.

Las Figuras 4A-C muestran que la exposición en la dieta a colina/TMAO contribuye a la disfunción y lesión renal progresivas. Inmunotransferencia de la expresión de KIM-1 (A) y su relación con las concentraciones de TMAO (B) en los riñones de ratones después de 6 semanas de alimentación con dieta para roedores (0,08 % de colina), TMAO (0,12 %) y colina (1,0 %). También se muestran las concentraciones plasmáticas de cistatina C (C) después de una alimentación de 16 semanas con dieta para roedores, TMAO (0,12 %) y colina (1,0 %). **P <0,01 frente a dieta para roedores, n≥5 ratones por grupo.

La Figura 5 muestra los resultados del Ejemplo 2 y muestra específicamente que una dieta de colina fomenta un fenotipo protrombótico y que el uso de aspirina atenúa las concentraciones de TMAO.

La Figura 6 muestra resultados del Ejemplo 2 que muestra que el ASA inhibe la actividad de la colina y de la GPC TMA liasa.

La Figura 7 muestra los resultados del Ejemplo 2 donde ASA muestra una inhibición en la actividad de la colina

TMA liasa.
La Figura 8 muestra los resultados del Ejemplo 2, y muestra específicamente el efecto del ASA (81 mg PO QD) en sujetos humanos antes y después de la suplementación crónica con colina. La Figura 9 muestra los resultados del Ejemplo 2, y muestra específicamente el efecto del ASA (81 mg PO QD) en sujetos humanos antes y después de la suplementación crónica con colina.
La Figura 10 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) del gen y la proteína yeaW de *E. coli*.
La Figura 11 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) del gen y la proteína yeaX de *E. coli*.
La Figura 12 muestra que el complejo microbiano yeaW/X recombinante puede catalizar la producción de d9-TMA a partir de múltiples precursores sintéticos de la d9-trimetilamina, incluidos yBB (gamma-butirobetaína), L-carnitina, colina y betaína.
La Figura 13 proporciona un esquema con ejemplos de estrategias dirigidas al órgano endocrino microbiano intestinal (por ejemplo, para tratar enfermedades renales, enfermedades cardiovasculares u otras enfermedades relacionadas que cursan con concentraciones elevadas de TMAO). Las estrategias para manipular la microbiota intestinal incluyen: 1) manipulación dietética, 2) prebióticos o probióticos, 3) trasplante de microbiota fecal, 4) antimicrobianos/antibióticos, 5) inhibidores de la enzima bacteriana (p. ej., inhibidores de la TMA liasa) o 6) inhibidores de la enzima hospedador (p. ej., inhibidores de la flavina monooxigenasa 3 (FMO3).

Definiciones

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad cardiovascular” (ECV) o “trastorno cardiovascular” son expresiones usadas para clasificar numerosas afecciones que afectan al corazón, las válvulas cardíacas y la vasculatura (por ejemplo, venas y arterias) del cuerpo y abarca enfermedades y afecciones que incluyen, pero sin limitación, arteriosclerosis, aterosclerosis, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, angina, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma aórtico, disección aórtica, aneurisma iliaco o femoral, embolia pulmonar, hipertensión primaria, fibrilación auricular, accidente cerebrovascular, episodio isquémico transitorio, disfunción sistólica , disfunción diastólica, miocarditis, taquicardia auricular, fibrilación ventricular, endocarditis, arteriopatía, vasculitis, placa aterosclerótica, placa vulnerable, síndrome coronario agudo, episodio isquémico agudo, muerte cardíaca súbita, enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedad arterial periférica (EAP) y enfermedad cerebrovascular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad cardiovascular aterosclerótica” o “trastorno” se refiere a un subconjunto de enfermedad cardiovascular que incluye la aterosclerosis como un componente o precursor del tipo particular de enfermedad cardiovascular e incluye, sin limitación, EAC, EAP, enfermedad cerebrovascular. La aterosclerosis es una respuesta inflamatoria crónica que ocurre en las paredes de los vasos sanguíneos arteriales. Implica la formación de placas ateromatosas que pueden conducir al estrechamiento (“estenosis”) de la arteria, y eventualmente pueden conducir al cierre parcial o completo de la abertura arterial y/o roturas de la placa. Por lo tanto, las enfermedades o trastornos ateroscleróticos incluyen las consecuencias de la formación y rotura de la placa ateromatosa, que incluyen, sin limitación, estenosis o estrechamiento de las arterias, insuficiencia cardíaca, formación de aneurismas, incluido aneurisma aórtico, disección aórtica y acontecimientos isquémicos como infarto de miocardio y accidente cerebrovascular

Los términos “individuo”, “hospedador”, “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en el presente documento, y generalmente se refieren a un mamífero, que incluye, pero sin limitación, primates, incluidos simios y humanos, equinos (por ejemplo, caballos), caninos (p. ej., perros), felinos, varios animales domésticos domesticados (p. ej., ungulados, como suidos, cerdos, cabras, ovejas y similares), así como mascotas domesticadas y animales mantenidos en zoológicos. En algunas realizaciones, el sujeto es específicamente un sujeto humano.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se desvelan composiciones, sistemas y procedimientos para tratar enfermedades, como enfermedades renales y cardiovasculares, con un agente que reduce la producción de trimetilamina (TMA) o trimetilamina N-óxido (TMAO) en un sujeto. En ciertas realizaciones, el agente es: i) 3,3-dimetil-1-butanol (DMB) o un derivado de DMB o un compuesto relacionado (por ejemplo, como se muestra en la Tabla 3), ii) ácido acetilsalicílico o derivado del mismo (por ejemplo, con un recubrimiento entérico para la administración al colon y/o ciego); iii) un inhibidor de la flavina monooxigenasa 3 (FMO3); iv) un inhibidor de la TMA liasa intestinal; v) un antibiótico o antimicrobiano; vi) un probiótico o prebiótico; vii) un agente antiplaquetario; o viii) un agente secuestrante de TMA y/o TMAO.

I. Producción de TMA y TMAO

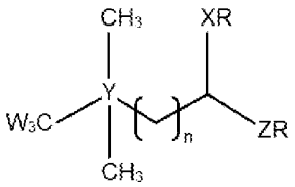
La microbiota de los humanos se ha relacionado con la salud intestinal, la función inmunitaria, la bioactivación de nutrientes y vitaminas y, más recientemente, con fenotipos de enfermedades complejas como la obesidad y la resistencia a la insulina. Recientemente se ha descrito que una vía tanto en humanos como en ratones vincula el metabolismo de la microbiota de la colina y la fosfatidilcolina de la dieta con la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. La colina, un compuesto que contiene trimetilamina y parte del grupo principal de fosfatidilcolina, es

metabolizada por la microbiota intestinal para producir un compuesto intermedio conocido como trimetilamina (TMA). La TMA se oxida más rápidamente en el hígado por las monooxigenasas de flavina hepáticas para formar trimetilamina N-óxido (TMAO), que es proaterogénico y está asociado con riesgos cardiovasculares. Estos hallazgos aumentan la posibilidad de que otros nutrientes dietéticos que poseen una estructura de trimetilamina también puedan generar TMAO a partir de la microbiota intestinal y promover la aterosclerosis acelerada.

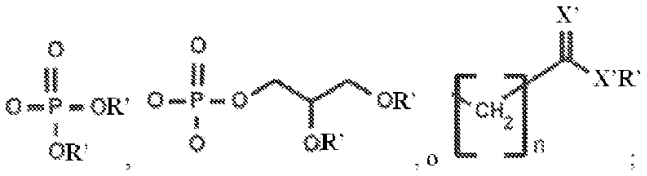
II. DMB, derivados y compuestos relacionados

En algunas realizaciones, se divulgan en el presente documento procedimientos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales y/o cardiovasculares con compuestos que inhiben la producción de TMAO en el intestino, tales como 3,3-dimetil-1-butanol (DMB), N,N- dimetiletanolamina (DMEA), N-metiletanolamina (MEA), etanolamina (EA), trimetilsilil etanol, un compuesto de la Tabla 3, y P,P,P-trimetil etanol fosfina; u otros compuestos representados por la Fórmula I. La Fórmula I es la siguiente:

Fórmula I:



en la que n es un número entero, o n es 0, lo que indica que CH_2 no está presente;
en la que Y es C, N, Si, P, S, Ge, Sn, Pb, P, As, Sb o Bi;
en la que cada W se selecciona independientemente de: H, Cl, F, Br o I (por ejemplo, W_3C = CH_3, CH_2Cl, CH_2Fl, CH_2Br, CH_2I, CF_3, CCl_3, CBr_3, CI_3, o $CHCl_2$);
en la que X es O o S y el enlace correspondiente está presente o ausente o es doble,
en la que R está ausente, H, un grupo alquilo, grupo alquenilo, grupo alquinilo, grupo fenilo, amida, alquilamida o un grupo bencilo;
en la que Z es C, CH_2, CH, NH, O o S,
en la que XR es, como alternativa, H, un éster, tioéster o tionoéster; glicerol, o una de las siguientes tres fórmulas:



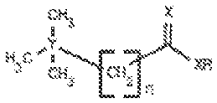
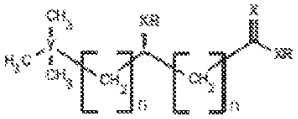
en la que R' es H, un grupo alquilo, grupo alquenilo, grupo alquinilo, grupo fenilo o un grupo bencilo; y en la que X' es O o S. En ciertas realizaciones, R es amida o alquilamida, y
Z es un O, y Z como un doble enlace O - un ácido carboxílico). En algunas realizaciones, los dos grupos metilo que se extienden desde Y están unidos por un alquilo o éter para formar un anillo de 4-6 miembros.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona procedimientos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales y/o cardiovasculares que comprenden: a) identificar a un sujeto con niveles elevados de TMAO y/o TMA, y b) administrar al sujeto una composición que comprende N,N-dimetiletanolamina (DMEA), N-metiletanolamina (MEA), etanolamina (EA), trimetilsilil etanol y P,P,P-trimetil etanolfosfina, o un compuesto representado por la Fórmula I (p. ej., dimetilbutanol y/o un derivado del mismo), y/o un antibiótico dirigido al intestino y/o un prebiótico (por ejemplo, un alimento que contiene fibra que altera la composición de la flora intestinal) y/o un probiótico (por ejemplo, un alimento que contiene probióticos como el yogur). En ciertas realizaciones, la composición comprende dimetilbutanol o un compuesto mostrado en las Figuras 20-23 de la solicitud de los Estados Unidos 13/915.299. En realizaciones adicionales, la identificación comprende ver resultados de un ensayo de TMAO y/o TMA (por ejemplo, en papel o en una pantalla de ordenadora) realizado en una muestra del sujeto que muestra niveles elevados de TMAO y/o TMA. En ciertas realizaciones, la identificación comprende ver resultados de un ensayo de TMA o TMAO realizado en una muestra o aliento exhalado de dicho sujeto que muestra niveles elevados de TMA o TMAO.

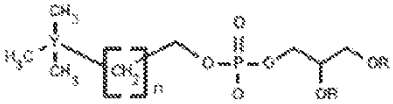
En algunas realizaciones, la composición comprende un alimento o una bebida que contiene un compuesto de Fórmula I (o N,N-dimetiletanolamina (DMEA), N-metiletanolamina (MEA), etanolamina (EA), trimetilsilil etanol y alimentos que contienen P,P,P-trimetil etanol fosfina). En realizaciones adicionales, la composición comprende un alimento o una bebida que contiene un compuesto de Fórmula I (o N,N-dimetiletanolamina (DMEA), N-metiletanolamina (MEA), etanolamina (EA), trimetilsilil etanol y P,P,P-trimetil etanolfosfina) seleccionada del grupo que consiste, pero no se limita a: aceite de oliva, aceite de oliva virgen extra, aceite de semilla de uva, alimentos que

contienen levadura y vino tinto. En otras realizaciones, la composición comprende un compuesto beneficioso para reducir las concentraciones de TMAO. En ciertas realizaciones, la composición se proporciona en una píldora o cápsula (por ejemplo, con una carga o aglutinante). En realizaciones particulares, el compuesto de Fórmula I (por ejemplo, dimetilbutanol) previene la formación de TMA a partir de colina u otros nutrientes de trimetilamina (por ejemplo, carnitina, glicerofosfocolina, fosfocolina, fosfatodilcolina) a partir de la flora intestinal, o dificulta el transporte de colina. En realizaciones adicionales, el compuesto de Fórmula I (o N,N-dimetiletanolamina (DMEA), N-metiletanolamina (MEA), etanolamina (EA), trimetilsilil etanol y P,P,P-trimetil etanol fosfina) induce uno o más de lo siguiente cuando se administra a un sujeto: reducción del nivel de trimetilamina, reducción del nivel de colesterol, reducción del nivel de LDL, aumento del nivel de HDL y reducción del nivel de triglicéridos. En realizaciones adicionales, el compuesto de Fórmula I reduce el riesgo de enfermedad renal y/o cardiovascular cuando se administra a un sujeto.

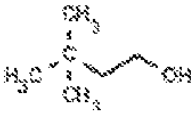
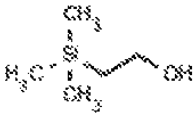
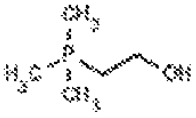
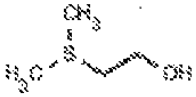
En algunas realizaciones, la Fórmula I tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

,

,

,

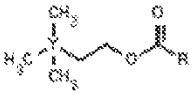
y

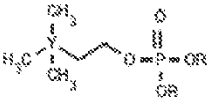

.

En otras realizaciones, la Fórmula I tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:


2,2-Dimetil-1-butanol (DMB) , 
2-Trimetilsililetanol , 
P-colina , y 
.

En ciertas realizaciones, la Fórmula I tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

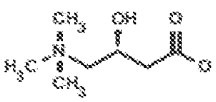
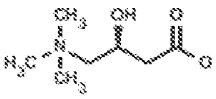
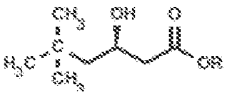

,

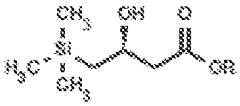
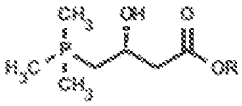
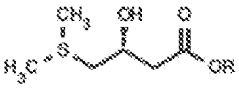
,

,

,

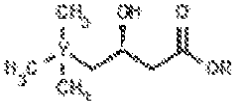
, y
.

En algunas realizaciones, la Fórmula I tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

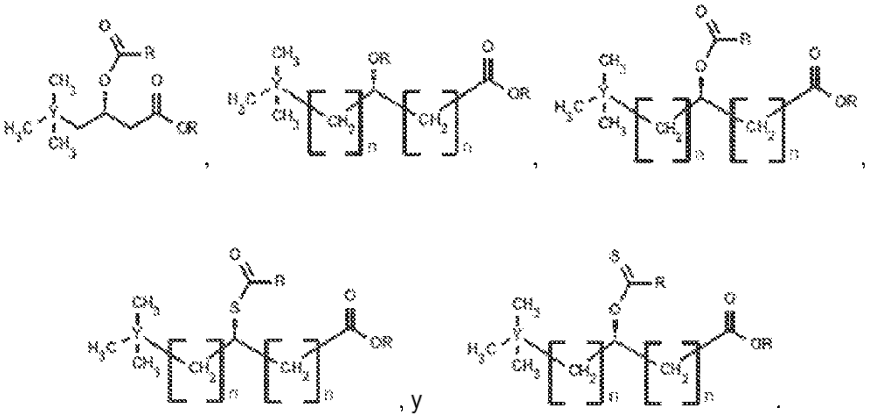

L-Carnitina , 
D-Carnitina , 
Ácido 5,5-dimetil-3-hidroxihexanoico ,


Ácido 4-Trimetilsilil-3- hidroxibutírico , 
P-Carnitina , 
,

y

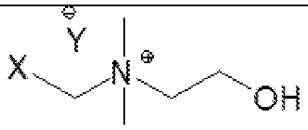
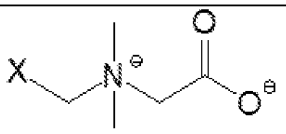
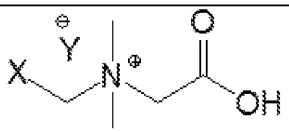
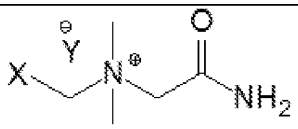
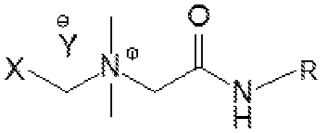
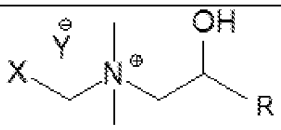
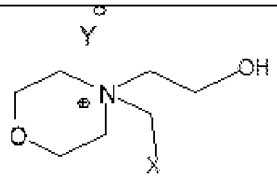
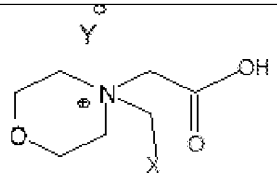

.

En realizaciones adicionales, la Fórmula I tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula I, o utilizados de otro modo en los procedimientos, sistemas y composiciones aquí, son los proporcionados en la Tabla 3 a continuación:

TABLA 3

Halometil colinas: (Fluorocolina, Clorocolina, Bromocolina, Yodocolina) X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: Y = I, Br, Cl	
Halometil betaínas: (Fluorodimetilglicina, Clorodimetilglicina, Bromodimetilglicina, Yododimetilglicina) X = F, Cl, Br, I	
Sales de halometil betaína: X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: Y = I, Br, Cl	
Amidas de halometil betaína: X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: Y = I, Br, Cl	
Amidas de halometil betaína: X = F, Cl, Br, I Y = I, Br, Cl R = metil, etil, propil, aminoácidos, péptidos	
Halometil dimetil amino alcoholes: X = F, Cl, Br, I Y = I, Br, Cl R = metil, etil, propil (p.ej., N-Yodometil-N,N-dimetilamina-2-hidroxi-propanol, cuando X = 1, R = metil)	
Morfolinas: X = H, F, Cl, Br, I Y = Cl, Br, I (p.ej., N-metil-N-(2-hidroxietil)morfolina, cuando X = H)	
Morfolinas: X = H, F, Cl, Br, I Y = Cl, Br, I	

III. Procedimientos para la selección de agentes reductores de la concentración de TMAO y TMA candidatos

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona ensayos de detección de fármacos (por ejemplo, para seleccionar fármacos inhibidores de la formación de TMAO y/o TMA). En ciertas realizaciones, los procedimientos de detección de la presente invención utilizan precursores que contienen trimetilamina (p.ej., colina, crotonobetaína (cis y trans), gamma-butirobetaína, carnitina, 4-trimetilamoniobutiraldehído, deshidrocarnitina, 3-hidroxi-N6-trimetil-lisina, N6-trimetil-lisina, trimetilamonioacetona, descarboxicarnitina, fosfocolina, aldehído betaína, glicerofosfocolina, fosfatidilcolina y/o betaína) incubados con microflora intestinal, o un complejo de yeaW/yeaX sin células, capaz de escindir los compuestos que contienen TMA para formar TMA. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de detección de compuestos que inhiben la capacidad de la microflora de escindir precursores que contienen TMA para formar TMA o usar TMA para formar TMAO. En algunas realizaciones, los compuestos candidatos son compuestos antibióticos, compuestos relacionados con DMB, antimicrobianos, inhibidores de la TMA liasa candidatos o inhibidores de la FMO3 candidatos (por ejemplo, de una biblioteca de moléculas pequeñas).

En un procedimiento de detección, se evalúa la capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la formación de TMA por la microflora o un complejo de yeaW/yeaX sin células al poner en contacto un compuesto candidato con una muestra que contiene la microflora o un complejo de yeaW/yeaX sin células y precursores que contienen TMA y luego analizar el efecto de los compuestos candidatos sobre la formación de TMA. En algunas realizaciones, el efecto de los compuestos candidatos sobre la formación de TMA se analiza detectando el nivel de TMA formado.

Los compuestos de prueba de la presente divulgación se pueden obtener, por ejemplo, usando cualquiera de los numerosos enfoques en los procedimientos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluidas las bibliotecas biológicas; bibliotecas peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de los péptidos, pero con un nuevo esqueleto no peptídico, que son resistentes a la degradación enzimática pero que, sin embargo, siguen siendo bioactivas; ver, por ejemplo, Zuckennann et al., J. Med. Chem 37: 2678-85 (1994)); bibliotecas de fase sólida o en fase de solución direccionable espacialmente en paralelo; procedimientos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el procedimiento de la biblioteca 'una perla-un compuesto'; y procedimientos de biblioteca sintética que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. Los enfoques de biblioteca biológica y biblioteca peptoide generalmente se prefieren para usar con bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145).

En ciertas realizaciones, los compuestos de prueba son antibióticos. Cualquier tipo de antibiótico puede ser seleccionado (o utilizado para tratar enfermedades, como la enfermedad renal). Los ejemplos de tales antibióticos incluyen, pero no se limitan a, Ampicilina; Bacampicilina; Carbenicilina Indanilo; Mezlocilina; Piperacilina; Ticarcilina; Amoxicilina-Ácido clavulánico; Ampicilina-Sulbactam; Bencilpenicilina; Cloxacilina; Dicloxacilina; Meticilina; Oxacilina; Penicilina G; Penicilina V; Piperacilina Tazobactam; Ácido clavulánico-Ticarcilina; Nafcilina; Cefalosporina de 1ª Generación; Cefadroxilo; Cefazolina; Cefalexina; Cefalotina; Cefapirina; Cefradina; Cefaclor; Cefamandol; Cefonicida; Cefotetano; Cefoxitina; Cefprozil; Ceftmetazol; Cefuroxima; Loracarbef; Cefdinir; Ceftibuten; Cefoperazona; Cefixima; Cefotaxima; Cefpodoxime proxetil; Ceftazidima; Ceftizoxima; Ceftriaxona; Cefepima; Azitromicina; Claritromicina; Clindamicina; Diritromicina; Eritromicina; Lincomicina; Troleandomicina; Cinoxacina; Ciprofloxacina; Enoxacina; Gatifloxacina; Grepafloxacina; Levofloxacina; Lomefloxacina; Moxifloxacina; Ácido nalidíxico; Norfloxacina; Ofloxacina; Sparfloxacina; Trovafloxacina; Ácido oxolínico; Gemifloxacina; Perfloxacina; Imipenem-Cilastatina meropenem; Aztreonam; Amikacina; Gentamicina; Kanamicina; Neomicina; Netilmicina; Estreptomicina; Tobramicina; Paromomicina; Teicoplanina; Vancomicina; Demeclociclina; Doxiciclina; Metaciclina; Minociclina; Oxitetraciclina; Tetraciclina; Clortetraciclina; Mafenida; Sulfadiazina de plata; Sulfacetamida; Sulfadiazina; Sulfametoxazol; Sulfasalazina; Sulfisoxazol; Trimetoprima-Sulfametoxazol; Sulfametizol; Rifabutina; Rifampicina; Rifapentina; Linezolid; Estreptograminas; Quinopristina Dalfopristina; Bacitracina; Cloranfenicol; Fosfomicina; Isoniazida; Metanamina; Metronidazol; Mupirocina; Nitrofurantoína; Nitrofurazona; Novobiocina; Polimixina; Espectinomicina; Trimetoprima; Colistina; Cicloserina; Capreomicina; Etionamida; Pirazinamida; Ácido para-aminosalicíclico; y etilsuccinato de eritromicina.

Se pueden encontrar ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo en: DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909 (1993); Erb et al., Proc. Nad. Acad. Sci. USA 91:11422 (1994); Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37:2678 (1994); Cho et al., Science 261:1303 (1993); Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33.2059 (1994); Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061 (1994); y Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233 (1994). Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten, Biotechniques 13:412-421 (1992)), o en perlas (Lam, Nature 354:82-84 (1991)), chips (Fodor, Nature 364:555-556 (1993)), bacterias o esporas (Patente US-5.223,409; incorporada por referencia en el presente documento), plasmidos (Cull et al., Proc. Nad. Acad. Sci. USA 89:18651869 (1992)) o en fagos (Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990); Devlin Science 249:404-406 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382 (1990); Felici, J. Mol. Biol. 222:301 (1991)).

La capacidad del compuesto de prueba para inhibir la formación de TMA por la microflora intestinal, o un complejo de yeaW/yeaX sin células, se puede controlar marcando de manera detectable la porción de TMA de un compuesto precursor que contiene TMA. Dichos marcadores detectables incluyen, por ejemplo, radioisótopos, cromóforos,

fluoróforos o marcadores enzimáticos. Por ejemplo, los precursores que contienen TMA se pueden marcar con ^{125}I, ^{35}S ^{14}C o ^{3}H, directa o indirectamente, y el radioisótopo detectado por recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Como alternativa, el precursor que contiene TMA puede marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático detectado por determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto. En una realización, el precursor que contiene TMA o la sustancia de prueba está anclado en una fase sólida. El precursor que contiene TMA anclado en la fase sólida se puede detectar al final de la reacción.

En ciertas realizaciones, los ensayos sin células pueden realizarse en una fase líquida utilizando un complejo de yeaW/yeaX. En dicho ensayo, los productos de reacción se separan de los componentes sin reaccionar, por cualquiera de una serie de técnicas estándar, que incluyen, pero no se limitan a: centrifugación diferencial (ver, por ejemplo, Rivas and Minton, Trends Biochem Sci 18: 284-7 (1993)); cromatografía (cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico); electroforesis (ver, por ejemplo, Ausubel et al., Eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: Nueva York.); e inmunoprecipitación (ver, por ejemplo, Ausubel et al., Eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: Nueva York). Dichas resinas y técnicas cromatográficas son conocidas por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Heegaard J. Mol. Recognit 11:141-8 (1998); Hageand Tweed J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl 699:499-525 (1997)).

Esta divulgación se refiere además a agentes identificados por los ensayos de detección descritos anteriormente junto con su uso en un modelo animal apropiado para determinar la eficacia, toxicidad, efectos secundarios o mecanismo de acción del tratamiento con dicho agente. Además, los nuevos agentes identificados por los ensayos de detección descritos anteriormente se pueden usar para tratamientos como se describe en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son solo para fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

La vía de la TMAO dependiente de microbiota intestinal contribuye al desarrollo de la insuficiencia renal y al riesgo de mortalidad en la enfermedad renal crónica

Este ejemplo describe un examen de la contribución de la TMAO al desarrollo de la insuficiencia renal y al riesgo de mortalidad en la enfermedad renal crónica (ERC).

PROCEDIMIENTOS

Estudios en seres humanos. La población humana estudiada es una cohorte prospectiva de un solo centro aprobada por la Junta de Revisión Institucional de la Clínica Cleveland. Se incluyeron sujetos adultos (mayores de 18 años) que se sometieron a una angiografía coronaria diagnóstica electiva para evaluación cardíaca desde 2001 hasta 2007 como se describió anteriormente (9). Se excluyeron los sujetos con síndromes coronarios agudos conocidos o procedimientos de revascularización dentro de los 30 días posteriores al reclutamiento, o antecedentes de enfermedad cardíaca congénita. Después de otorgado el consentimiento informado, se recogieron muestras de sangre en plasma en ayunas utilizando tubos de ácido etilendiaminotetraacético antes de la administración de cualquier fármaco a través de la vaina arterial, e inmediatamente se procesaron y congelaron a -80 °C hasta el análisis. La tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) se calculó de acuerdo con la fórmula de creatinina y cistatina C CKD-EPI (17), definiéndose la ERC como eGFR> 60 ml/min/1,73 m^2 (ERC estadio 3 o superior). La verificación de la mortalidad por todas las causas a los 5 años se realizó mediante un contacto telefónico prospectivo y una revisión de la historia más el interrogatorio del Índice de defunciones de la Seguridad Social (hasta 2011).

Análisis de plasma. Las concentraciones de trimetilamina N-óxido (TMAO) se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento con dilución isotópica estable con espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización en línea (LC/MS/MS) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo AB SCIEX 5500 (AB SCIEX, Framingham MA) usando patrones internos marcados con d9-(trimetil) como se ha descrito anteriormente (10, 18). La proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), el panel de lípidos en ayunas, la cistatina C y la creatinina sérica se midieron utilizando la plataforma Architect ci8200 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

Estudio en animales. Para evaluar directamente una posible contribución de la colina o TMAO de la dieta a la promoción de la disfunción renal, los ratones C57BL6J fueron alimentados con las siguientes dietas durante 6 semanas: i) una dieta químicamente definida comparable en composición a la dieta de pienso estándar (Teklad 2018, Harland Laboratories) que contiene 0,08 % (g/g) de colina total; ii) la misma dieta suplementada con colina (1 % en total); y iii) la misma dieta suplementada con TMAO (0,12 %). Un estudio separado incluyó ratones C57BL6J con constitución ApoE/- que fueron alimentados con los mismos grupos de dieta para comparar sus niveles de cistatina C a las 14 semanas de seguimiento utilizando un ensayo inmunosorbente asociado a enzimas de ratón disponible comercialmente (R&D systems, Minneapolis MN). Este estudio ha sido aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Clínica Cleveland.

Técnicas histológicas cuantitativas. La tinción tricrómica de Masson se realizó en cortes de riñón en serie desparafinizados de 5 µm. Los cortes de riñón se montaron bajo un microscopio Leica DM 2500 y se digitalizaron con una cámara QImaging MicroPublisher 5,0 RTV para microscopía de campo amplio. El análisis morfométrico cuantitativo se realizó en campos corticales (al menos 8 de cada animal) que carecen de vasos sanguíneos principales y el volumen de colágeno se determinó utilizando algoritmos/scripts automatizados (para análisis por lotes) y personalizados (ImageIQ Inc., Cleveland, OH) escritos para Image Pro Plus 7,0, Brevemente, se elige un conjunto de imágenes representativas que demuestran una amplia gama de intensidades de tinción y prevalencia. En un script automatizado, estas imágenes de "entrenamiento" se cargaron una tras otra, lo que llevó al usuario a delinear píxeles "azules" que representan una tinción positiva de colágeno utilizando una herramienta de selección de color interactiva. Se generó un perfil de color iterativo o clasificador y posteriormente se aplicó a todas las imágenes en un directorio dado usando un algoritmo completamente automatizado. Los píxeles positivos, según lo definido por el perfil de color, se segmentaron y sumaron para proporcionar un área de tinción positiva. El área total de tejido se determinó extrayendo el canal de "saturación", aplicando un filtro de paso bajo y umbralizando el resultado. Cualquier área dentro del límite de tejido general que estaba vacía (es decir, blanco) se eliminó convirtiendo la imagen original en escala de grises y aplicando un umbral fijo para píxeles sin fondo en imágenes con balance de blancos adecuado. Finalmente, el área total de tejido y el área teñida total se exportaron a Excel. Para la verificación posterior al procesamiento, las regiones segmentadas se superpusieron a la imagen original (contornos verdes) y se guardaron para cada imagen analizada.

Preparación de homogeneizados de tejidos e inmunotransferencia. Se prepararon cantidades iguales de proteína usando procedimientos bioquímicos estándar y se sometieron a SDS-PAGE y electrotransferencia de proteínas desde geles a membranas Immobilon-P (Millipore). Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: SMAD3 y phospho-SMAD-3 (Ser423/425) (Cell Signaling Technology); tubulina (Santa Cruz Biotechnology); KIM-1 (Novus Biologicals). La detección de todas las inmunotransferencias se realizó con el sistema de detección de proteínas SNAP i.d.™ (Millipore) y los productos de sustrato quimioluminiscente Super Signal (Pierce), y la intensidad de la banda se analizó por densitometría (ImageQuant TM, GE Healthcare).

Análisis estadístico. Las variables continuas se resumieron como la media ± desviación estándar si se distribuye normalmente y la mediana (rangos intercuartil [RIQ]) si no se distribuye normalmente. La prueba t de Student o la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon para variables continuas y la prueba de chi-cuadrado para variables categóricas se utilizaron para examinar la diferencia entre los grupos. La correlación de Spearman se utilizó para examinar las asociaciones entre TMAO y otras mediciones de laboratorio. Los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier y el análisis de riesgos proporcionales de Cox se utilizaron para determinar el cociente de riesgo (HR) y los intervalos de confianza del 95 % (IC 95 %) para la mortalidad por todas las causas estratificada según TMAO en cuartiles. Se hicieron ajustes para los factores de riesgo tradicionales individuales que incluyen edad, sexo, presión arterial sistólica, colesterol-lipoproteínas de baja densidad (LDLc), colesterol-lipoproteínas de alta densidad (HDLc), tabaquismo, diabetes mellitus, hsCRP transformada logarítmicamente y eGFR transformada logarítmicamente para predecir riesgos de mortalidad por todas las causas. La reclasificación neta y el área bajo la curva Características operativas del receptor se calculó de acuerdo con el riesgo de mortalidad estimado utilizando los modelos Cox ajustados para los factores de riesgo tradicionales mencionados anteriormente frente a sin TMAO como se describió anteriormente 19. Todos los análisis realizados utilizaron R 2.15.1 (Viena, Austria). P <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Unos niveles elevados de TMAO en pacientes con insuficiencia renal augura una supervivencia peor. Las características clínicas y de laboratorio basales de la cohorte se presentan en la Tabla 1,

Tabla 1. Características basales

Característica	**eGFR ≥ 60** (n = 3, 166)	**eGFR < 60** (n = 521)	**valor p**
Edad (años)	62±11	70±10	<0,001
Hombres (%)	66	48	<0,001
Diabetes (%)	27	53	<0,001
Hipertensión (%)	69	88	<0,001
Tabaquismo (%)	66	61	0,047
Antecedentes de IM (%)	40	53	<0,001
Antecedentes de accidente cerebrovascular (%)	5	13	<0,001
Antecedentes de CABG (%)	28	42	<0,001
Antecedentes de ICP (%)	31	30	0,728
LDL (mg/dl)	97 (79-118)	93 (72-114)	<0,001

(continuación)

Característica	eGFR ≥ 60 (n = 3, 166)	eGFR < 60 (n = 521)	valor p
HDL (mg/dl)	34 (28-41)	32 (26-40)	<0,001
hsCRP (mg/l)	2,2 (0,9-5,0)	4,1 (1,8-9,6)	<0,001
eGFR (ml/min/1,73m^2)	89 (78-101)	49 (38-55)	<0,001
Cistatina C (mg/l)	0,9 (0,8-1)	1,5 (1,3-1,8)	<0,001
Inhibidor de la ECA/BRA (%)	48	66	<0,001
Estatinas (%)	61	59	0,437
Bloqueadores beta (%)	63	68	0,04
Aspirina (%)	75	67	<0,001
TMAO (μM)	3,4 (2,3-5,3)	7,9 (5,2-12,4)	<0,001

Se incluyeron un total de 3.687 sujetos en este análisis, de los cuales 521 sujetos cumplían los criterios de ERC y 3.166 sujetos los criterios de no ERC. En comparación con los sujetos sin ERC, las concentraciones de TMAO fueron elevados en pacientes con ERC (mediana de TMAO: 7,9 [IQR 5,2-12,4] μM frente a 3,4 [IQR 2,3-5,3] μM, p < 0,001; Figura 1A). En general, en la cohorte ERC, TMAO se correlacionó modestamente con eGFR (r = -0,48, p < 0,001) y cistatina C (r = 0,46, p < 0,001), pero solo se correlacionó débilmente con hsCRP (r = 0,04, p = 0,332).

En la cohorte de ERC, las concentraciones más altas de TMAO (cuartiles 4 frente a 1) se asociaron con un aumento de 2,8 veces en el riesgo de mortalidad por todas las causas a los 5 años (CR sin ajustar 2,76, IC 95 % 1,74-4,37, p < 0,001). Después de ajustar los factores de riesgo de ECV tradicionales, hsCRP transformada logarítmicamente y eGFR transformada logarítmicamente, las concentraciones más altas de TMAO se seguían asociando con una supervivencia a los 5 años peor de 1,9 veces (HR ajustado 1,93, IC 95 % 1,13-3,29, p < 0,05 ; Tabla 2, curva de Kaplan-Meier que se muestra en la Figura 1B).

Tabla 2. Análisis de riesgos proporcionales de Cox de concentraciones plasmáticas de TMAO estratificadas en niveles de cuartil en la predicción del riesgo de mortalidad por todas las causas a los 5 años estratificada por cohortes ERC y sin ERC

Cohorte ERC (n=521)	**TMAO** (rango)			
	Cuartil 1	**Cuartil 2**	**Cuartil 3**	**Cuartil 4**
Rango (μM)	< 5,2	5,2-7,9	7,9-12,4	≥ 12,4
Acontecimientos	25/129 (20,2 %)	42/131 (32,1 %)	43/130 (33,1 %)	63/131 (48,1 %)
HR sin ajustar	1	1,70 (1,04-2,79)*	1,75 (1,07-2,87)*	2,76 (1,74-4,37)**
HR ajustado	1	1,42 (0,85-2,35)	1,51 (0,90-2,51)	1,93 (1,13-3,29)*
Cohorte sin ERC (n=3166)	**TMAO** (rango)			
	Cuartil 1	**Cuartil 2**	**Cuartil 3**	**Cuartil 4**
Rango (μM)	<2,3	2,3-3,4	3,4-5,3	≥5,3
Acontecimientos	48/787 (6,1 %)	59/793 (7,4 %)	81/791 (10,2 %)	104/795 (131, %)
HR sin ajustar	1	1,22 (0,83-1,79)	1,7 (1,19-2,43)**	2,21 (1,57-3,12)**
HR ajustado	1	1,08 (0,74-1,58)	1,23 (0,84-1,78)	1,47 (1,02-2,12)*

Cuando se estratificó de acuerdo con los niveles medios (7,9 μM), una TMAO más alta confirió un aumento de 1,7 veces en el riesgo de mortalidad por todas las causas (HR 1,70, IC 95 % 1,25-2,30, p < 0,001), y se mantuvo significativo después de ajustar por los factores de riesgo tradicional y hsCRP transformada logarítmica (HR ajustado 1,72, IC 95 % 1,16-2,34, p < 0,001), así como con la adición de cistatina C al modelo (HR ajustado 1,45, IC 95 % 1,05-2,02, p < 0,05). Utilizando los puntos de corte medios con concentración baja de cistatina C (<1,4 mg/dl) y concentración baja de TMAO (<7,9 μM) como referencia, aquellos con concentración alta de cistatina C y concentración alta de TMAO concomitante tuvieron un aumento de tres veces en el riesgo de mortalidad (HR 3,01, IC 95 % 1,97-4,59, p < 0,001). Estos hallazgos son consistentes con la noción de que la TMAO elevada se asocia con un mal pronóstico en pacientes con ERC establecida.

Aumento de las concentraciones de TMAO en pacientes sin ERC con cistatina C elevada. Dentro de la cohorte sin ERC (n = 3.166), el valor pronóstico de TMAO elevada (cuartil 4 frente a 1) se mantuvo predictivo del riesgo de mortalidad a los 5 años (HR 2,21, IC 95 % 1,57-3,12, p < 0,001), así como después de ajustar por factores de riesgo tradicionales, hsCRP transformada logarítmicamente y eGFR transformada logarítmicamente (HR ajustado 1,47, IC 95 % 1,02-2,12, p < 0,05, Tabla 2B). Estos hallazgos fueron similares cuando se restringieron a sujetos con eGFR preservada (≥ 60 ml/min/1,73 m^2) más cistatina C normal (<1,4 mg/dl, n = 3.151). Concentraciones elevadas de TMAO se asocian con un mayor riesgo de mortalidad a los 5 años con concentraciones normales y elevadas de cistatina C (Figura 2). Usando puntos de corte medios de la cohorte con concentraciones bajas de cistatina C (<0,9 mg/dl) y concentraciones bajas de TMAO (< 3,4 μM) como referencia, aquellos con concentraciones altas de cistatina C y concentraciones altas de TMAO concomitante tuvieron un aumento de 3,7 veces en el riesgo de mortalidad (HR 3,67, IC 95 % 2,57-5,23, p < 0,001).

Colina de la dieta y TMAO promueve la fibrosis renal y la disfunción en modelos animales

Para probar directamente las hipótesis de que la TMAO en la dieta o los nutrientes de la dieta que contribuyen a la producción de TMAO dependiente de la microbiota intestinal, pueden afectar al desarrollo y la progresión de la ERC, se realizaron estudios con modelos animales. Los ratones machos de 8 semanas de edad con alojamiento convencional (constitución C57BL/6J) fueron alimentados ad libitum con una dieta químicamente definida comparable al pienso normal (0,08 % g de colina), o la misma dieta suplementada con colina (1,0 % final) o TMAO (0,12 %), como se describe en Procedimientos. Después de 6 semanas, se observaron aumentos significativos (p < 0,01) en las concentraciones de TMAO tanto en los grupos de ratones suplementados con TMAO como en los suplementados con colina (Figura 3A), donde las concentraciones de TMAO observadas estaban dentro del rango de valores detectados entre los sujetos con ERC estudiados (percentil 97,5 77,6 μM, percentil 99 96,3 μM). Es importante destacar que las concentraciones elevadas de TMAO estaban asociadas con aumentos correspondientes en la fibrosis parenquimatosa y la deposición de colágeno (Figura 3B-C) y la fosforilación de Smad3, un regulador importante de la vía de señalización pro-fibrótica TGF-β/Smad3 durante la enfermedad renal fibrótica[20] (Figura 3E). Además, los ratones alimentados con TMAO y con colina mostraban niveles elevados del marcador de lesión renal 1 (KIM-1, Figura 4A). La ampliación de la alimentación con TMAO/colina a 16 semanas se asoció con un aumento de las concentraciones séricas de cistatina C en comparación con los ratones alimentados con pienso (Figura 4C). Tras un examen más detallado, se observaron sorprendentes relaciones dependientes de la dosis entre las concentraciones plasmáticas de TMAO y los índices monitorizados de insuficiencia renal histopatológica (Figura 3D, 3F) y funcional (Figura 4B).

DISCUSIÓN

Hay varios hallazgos clave en este ejemplo. Primero, en sujetos con ERC, se observó que las concentraciones de TMAO no solo son elevados en comparación con los sujetos sin ERC, sino que, lo que es más importante, presagian una supervivencia general peor. En segundo lugar, se observó que dentro de la cohorte sin ERC, concentraciones más elevadas de TMAO presagian una supervivencia peor tanto en la cohorte de niveles bajos como en los niveles altos de cistatina C (estratificada a niveles medios). Curiosamente, el valor pronóstico para el cuartil TMAO más alto en la predicción del riesgo de mortalidad futura en esta cohorte se mantuvo sólido incluso después del ajuste por factores de riesgo tradicionales. Tercero, ampliando a los estudios en modelos animales, la exposición en la dieta a colina o TMAO conduce al desarrollo de fibrosis parenquimatosa renal y medidas tempranas de disfunción (cistatina C elevada). Por lo tanto, estos estudios sugieren tanto una relación causal como la relevancia clínica de la formación de TMAO mediada por la microbiota intestinal inducida por colina en la dieta en el desarrollo y la progresión de la ERC.

La trimetilamina N-óxido es un compuesto de bajo peso molecular que se filtra fácilmente por el riñón y se elimina eficazmente por hemodiálisis (13). Considerado un producto de desecho nitrogenado cuyos niveles aumentan con una función renal disminuida, se han descrito niveles elevados de TMAO en pequeñas cohortes (n <20) de sujetos con enfermedad renal terminal o ERC, donde se demostró que los niveles se correlacionan con la urea y creatinina séricas (15). Se han realizado experimentos detallados en animales y humanos sobre el aclaramiento renal de metilaminas como TMA y TMAO, lo que confirma los riñones como la ruta de eliminación primaria (21). Curiosamente, los aclaramientos urinarios de TMA y TMAO son más altos que la tasa de filtración glomerular, y el aclaramiento de TMAO también disminuye con el aumento de la dosis, lo que sugiere que se produce una secreción tubular renal saturable (22). La mayoría de una dosis de TMA también se excreta en la orina, y las proporciones variables en las formas de TMA y TMAO dependen del nivel de dosis (23). Se describe que los niveles urinarios de

TMAO aumentan con episodios de disfunción del injerto renal en receptores de trasplante renal, lo que sugiere una acumulación intrínseca de TMAO (presumiblemente como un osmolito como la urea) que se libera durante el daño de las células medulares renales (24-27). El vínculo mecanicista entre TMAO elevada y el pronóstico adverso en la ERC e incluso en el contexto de insuficiencia renal subclínica (cistatina C elevada) en pacientes sin ERC observado en este ejemplo es, por lo tanto, consistente con el mayor riesgo de desarrollar ERC en la población con ERC.

Estos resultados de estudios en animales mostraron por primera vez un vínculo mecanicista directo entre la colina de la dieta, o la TMAO de la dieta, y la fibrosis y disfunción renal progresiva. De hecho, tanto la exposición breve (6 semanas) a una dieta alta en colina como a una dieta suplementada directamente con TMAO condujeron a un aumento en las concentraciones del marcador de lesión renal temprana KIM-1 y a una mayor fosforilación de Smad3, un importante regulador de la fibrosis renal (28). Una exposición más prolongada a la dieta alta en colina o a la dieta suplementada con TMAO condujo a un aumento de las concentraciones plasmáticas de cistatina C, un indicador sensible de insuficiencia renal funcional. Curiosamente, un reciente estudio metabolómico no dirigido del Framingham Heart Study identificó que las concentraciones elevadas de colina y TMAO estaban asociadas con un mayor riesgo futuro de desarrollar ERC (29). Los resultados del modelo animal de este ejemplo, por lo tanto, proporcionan una justificación mecanicista potencial para los datos de observación de Framingham y, en conjunto, vinculan aún más las concentraciones elevadas de TMAO con una mayor susceptibilidad a la ERC.

Las perspectivas de que la exposición a nutrientes dietéticos específicos a través de la microbiota intestinal pueda afectar a la susceptibilidad al desarrollo y la progresión de la ERC y la ECV tiene importantes implicaciones potenciales para la salud pública. Los estudios aleatorizados de intervención nutricional en pacientes con ERC hasta la fecha no han explorado el papel potencial de la colina, fosfatidilcolina, L-carnitina o TMAO (que puede ser abundante en ciertos tipos de peces) en la progresión de la enfermedad. Del mismo modo, los estudios epidemiológicos son bastante limitados en este tema de la dieta y los riesgos de ERC, a pesar de que una dieta renal recomendada es normalmente baja en la ingesta de proteínas.

El manejo dietético de los pacientes con ERC representa un desafío, y se sabe mucho menos acerca de los factores nutricionales que pueden predisponer a un mayor riesgo de desarrollar ERC o su progresión. Curiosamente, en un subestudio (n = 3.296) realizado entre mujeres que tenían niveles de microalbúmina en orina disponibles en el Estudio de Salud de Enfermeras, dos o más porciones de carne roja (fuente primaria de L-carnitina) por semana se asociaron directamente con un mayor riesgo de desarrollo de microalbuminuria (OR: 1,51; IC 95 %: 1,01 a 2,26) (30). Basado en el presente ejemplo, una dieta controlada siguiendo las concentraciones de TMAO y diseñada para limitar los precursores de TMAO (baja en carnes rojas, carnes, hígado, yema de huevo) y productos lácteos con alto contenido de grasa) y la propia TMAO (ciertos pescados) sería una dieta atractiva para limitar la tasa de progresión de la ERC.

En conjunto, los datos actuales indican que un mecanismo dependiente de la microbiota intestinal inducido por la dieta contribuye tanto a la fibrosis renal progresiva como a la disfunción, y a los riesgos de mortalidad, entre los sujetos con ERC. También se basan en la evidencia reciente que demuestra un vínculo mecanicista entre la desregulación metabólica asociada a la microbiota intestinal y el riesgo cardiovascular en humanos (8-11). El descubrimiento de la vía metaorganismo involucrada en la generación de TMAO brinda así una oportunidad única para investigar sistemáticamente las posibles contribuciones de participantes discretos en las vías dieta general → microbio → enzimas del hospedador para la formación y desarrollo de TMAO y la progresión de la disfunción cardio-renal, ofreciendo así información sobre la modulación de tales vías. Es interesante que tanto en modelos animales como en pacientes con ERC establecida, se hayan realizado estudios de intervención pre y probióticos, donde se describen cambios en la composición y actividad de la microbiota intestinal. Por ejemplo, se ha descrito que *Lactobacillus acidophilus* o *Bifidobacterium* reducen la señalización inflamatoria asociada con los metabolitos derivados de la microbiota que se acumulan en la ERC (31-34), además de mejorar ligeramente la función renal (35, 36). Del mismo modo, el uso de compuestos prebióticos para interrumpir las vías que conducen a toxinas urémicas derivadas de la microbiota intestinal, como el sulfato de indoxilo y el sulfato de p-cresilo, ha demostrado cierta eficacia en ensayos tanto humanos como animales de ERC (5, 37).

EJEMPLO de referencia 2

Reducción por ASA (ácido acetilsalicílico) de la producción de TMAO in vivo

Este ejemplo investigó la cuestión de si la aspirina (ASA) puede mitigar el fenotipo protrombótico asociado con una dieta relacionada alta en colina o TMAO. Y si es así, ¿hay evidencia de que la propia terapia con aspirina afecta a la producción de TMAO *in vivo*? y ¿podría ser este un mecanismo a través del cual la aspirina promueva algunos de sus beneficios cardiovasculares?

En la primera parte de este ejemplo, se examinó el impacto de la terapia con aspirina (ASA) en el fenotipo protrombótico provocado por la suplementación crónica con colina en la dieta. Esta dieta eleva la TMAO y provoca una mejor respuesta plaquetaria y trombosis. Los ratones hembras C57BL/6J se sometieron a una dieta químicamente definida comparable a la alimentación normal de ratones (pienso) frente a una dieta idéntica suplementada con 0,5 g % de colina (colina). A continuación, cada uno de estos dos grupos de ratones se dividió y la mitad se sometió a terapia con aspirina a una dosis comparable a la utilizada en humanos (ASA 4 mg/Kg pc en

agua potable). Después de 2 semanas, se determinaron las concentraciones plasmáticas de TMAO mediante análisis LC/MS/MS de dilución isotópica estable establecida. Paralelamente, se midió el potencial de trombosis *in vivo* utilizando el modelo de exposición al FeCl de la arteria carótida bien establecido con microscopía vital. En este modelo, la arteria carótida interna se expone por corte y se visualiza mediante software de imágenes por ordenador mediante microscopía vital. Las plaquetas se retiran y se marcan con fluorescencia, y luego se infunden en la vena yugular contralateral. Después de la exposición a FeCl, se puede controlar la formación de coágulos directamente a lo largo del tiempo visualizando la arteria carótida en el sitio de aplicación de FeCl. También se puede controlar el flujo sanguíneo corriente abajo desde la formación del coágulo. Por lo tanto, se puede cuantificar la formación de coágulos y el tiempo para el cese del flujo sanguíneo aguas abajo del coágulo. Cualquiera de estos representan índices cuantitativos del potencial de trombosis *in vivo*.

La Figura 5 muestra los resultados de este trabajo. En la parte inferior de la Figura 5, se muestran las concentraciones de TMAO determinadas en plasma. Hay que tener en cuenta primero que la dieta de colina indujo un aumento significativo de TMAO (8,3 frente a 43,31 μM; $p < 0,05$ para pienso frente a colina sin aspirina (ASA)). Se observa un aumento similar en TMAO en ratones tratados con ASA simultáneamente con la dieta de colina (4,5 frente a 19,7; $p < 0,05$ para los grupos de pienso frente a colina y tratamiento con ASA). También hay que tener en cuenta que en ambas dietas (pienso y colina) la adición de ASA produjo una reducción significativa de la concentración de TMAO (aprox. 2 veces; $p < 0,05$ para comparación en cada dieta). Por lo tanto, estos estudios muestran que la terapia con ASA reduce las concentraciones de TMAO. En los estudios de trombosis *in vivo*, se observa que la dieta con colina sola reduce el tiempo de interrupción del flujo sanguíneo (protrombótico; $p < 0,0001$). Sin embargo, la adición de ASA a la dieta con colina atenúa la extensión del fenotipo protrombótico observado. Por ejemplo, el grupo de dieta con colina + ASA no se observa diferencia en el tiempo hasta el cese del flujo sanguíneo respecto al grupo de control (pienso y sin ASA). Hay que destacar que la adición de colina en la dieta todavía afecta al tiempo hasta el cese del flujo sanguíneo y, por lo tanto, sigue promoviendo el efecto protrombótico en los grupos tratados con ASA, aunque el ASA promueve una mejora (la comparación de pienso + ASA frente a colina + ASA revela un efecto protrombótico significativo de la dieta con colina incluso con terapia con ASA).

En conjunto, este trabajo indica: 1) en el contexto de TMAO elevado, donde se genera un efecto protrombótico, la adición de aspirina puede mitigar el efecto adverso. 2) La terapia con ASA se puede usar para reducir la TMAO. Esto sugiere que el ASA puede usarse, por ejemplo, como una terapia para inhibir las TMA liasas microbianas, el paso limitante de la velocidad en la producción de TMAO *in vivo*. 3) Las concentraciones elevadas de TMAO pueden servir como una indicación para las intervenciones relacionadas con los antiplaquetarios, como la aspirina y otros medicamentos antiplaquetarios (por ejemplo, clopidegrel, prasugrel); abciximab (Reopro®);

Aggrenox® (dipiridamol/ASA); anagrelida (Agrylin®); cilostazol (Pletal®); clopidogrel (Plavix®); dipiridamol (Persantine®); eptifabatida (Integrilin®); prasugrel - EFFIENT™; ticagrelor (BRILINTA™); ticlopidina (Ticlid®); tirofiban (Aggrastat®); y vorapaxar (ZONTIVITY™).

En base a los hallazgos de que la terapia con ASA *in vivo* redujo la TMAO, y el conocimiento de que las TMA liasas representan el principal determinante de la TMA y, por lo tanto, las concentraciones de TMAO, se probó si ASA podría afectar directamente a la actividad microbiana de la TMA liasa. *Proteus mirabilis* (PM) es un microbio con abundante actividad de colina TMA liasa que los estudios sugieren que sirve como una excelente fuente de actividad microbiana de la TMA liasa similar a la observada *in vivo* (dentro del ciego y colon de roedores y humanos, y heces de roedores y humanos). Usando el lisado de PM (PM que se lisó en una prensa francesa para romper la pared celular y liberar el contenido enzimático) como fuente de la enzima, se examinó la actividad TMA liasa (actividad productora de TMA) en incubaciones con d9(trimetil)colina como sustrato, o d9(trimetil) glicerofosfofocolina (GPC) como sustrato. En ambos casos, se observó que la adición de un rango fisiológico de ASA inhibía la producción de TMA a partir de los sustratos. Estos datos demuestran directamente que la aspirina puede inhibir la actividad TMA liasa microbiana y probablemente promover la reducción de TMAO *in vivo* en parte a través de la inhibición directa en las TMA liasas microbianas *in vivo*. Los resultados de este trabajo se muestran en la Figura 6.

Se realizó un examen adicional del impacto de ASA en la actividad TMA liasa por el lisado de PM. Se incubaron tres mg de lisado PM con colina 25 μM y colina(d9) 25 μM en 2 ml de PBS a 37 °C durante 20 horas. En la Figura 7, las líneas discontinuas a 81 mg y 320 mg de ASA representan las concentraciones plasmáticas de aspirina del estado estacionario determinadas a esas dosis en sujetos humanos. Por lo tanto, a una dosis de una aspirina al día (320 mg), las concentraciones plasmáticas de ASA previstas dan provocan aproximadamente un 40 % de inhibición de la TMA liasa. A la luz de esto, en algunas realizaciones, la aspirina con recubrimiento entérico o los derivados de aspirina que tienen una absorción retardada pueden emplearse para tratar la enfermedad, ya que se disolverían en el intestino más allá del estómago, de modo que la concentración de ASA o su derivado administrado en la luz intestinal será más alto. Existen formulaciones de liberación aún más retardada de medicamentos que también podrían usarse. Por ejemplo, un análogo de la aspirina, el ácido 5 amino salicílico, podría usarse para el tratamiento de enfermedades con producción excesiva de TMAO en el intestino. Este enfoque no solo puede lograr niveles significativamente más altos de ASA dentro de la luz intestinal distal, sino que además de las formulaciones de liberación retardada, las formulaciones de profármacos liberadas por la acción microbiana intestinal en el ilion y el colon están disponibles y podrían emplearse (ver, por ejemplo, Williams et al., Therap Adv Gastroenterol. Julio de 2011; 4(4):237-248; incorporado en el presente documento por referencia, que describe algunas de estas formulaciones y aplicaciones que se han aplicado al 5-ASA y, por lo tanto, también se pueden aplicar al ASA).

En trabajos posteriores, se incluyeron sujetos voluntarios humanos en el siguiente estudio. Los individuos fueron examinados al inicio del estudio para detectar TMAO en plasma y se extrajo sangre para estudios de agregación de plaquetas con estimulación ADP submáxima. Los sujetos fueron examinados tanto sin administración de aspirina, como después en diferentes momentos después de la administración crónica de aspirina (81 mg diarios) durante al menos un mes. Como se muestra en la Figura 8, al inicio del estudio, observando solo a los sujetos que no habían recibido aspirina, la adición de suplementos de colina en la dieta (equivalente al contenido de colina de 2 huevos duros al día, ver a continuación) mostró un aumento acompañante en las concentraciones plasmáticas de TMAO en el punto temporal de 1 y 2 meses, y los aumentos correspondientes en la agregación de plaquetas. Después de un período de lavado de al menos 4 meses sin suplemento de colina, los sujetos recibieron ASA diariamente (81 mg) y después de un mes de ASA, se controló el nivel basal de TMAO y la medida de agregación plaquetaria. A continuación, la suplementación diaria de colina se reanudó nuevamente. El impacto de la dieta de colina en el aumento de TMAO se vio mitigado. Y el aumento correspondiente en la agregación plaquetaria también se vio mitigado. Todos los sujetos presentados en la Figura 8 eran omnívoros.

Estos estudios muestran que la terapia con ASA ayuda a reducir las concentraciones de TMAO y reduce el efecto protrombótico asociado con una dieta alta en colina (TMAO alta). Subrayan que la elevación de TMAO también puede ser una indicación para una terapia de profilaxis con ASA para prevenir la hiperreactividad plaquetaria y el riesgo de coágulos o para tratar otras enfermedades con TMAO intestinal elevada.

La Figura 9 muestra el mismo tipo de datos que la Figura 8, excepto que los veganos se examinaron antes y después de comenzar la suplementación con colina. El suplemento de colina se usó en sujetos (bitartrato de colina, 2 X 500 mg/día = colina 2 X2 05,7 mg/día), durante un período de 2 meses. Se recogieron muestras al inicio y se extrajeron muestras de sangre mensuales (1,2 meses). Se midieron las concentraciones plasmáticas de TMAO y se midió la agregación plaquetaria en respuesta a ADP 5μM. Se observó que la dieta vegana no protege al sujeto completamente de la elevación de TMAO de la dieta de colina, ni produce un aumento significativo en la hiperreactividad plaquetaria de la dieta de colina.

EJEMPLO de referencia 3

Identificación de yeaW y yeaX como TMA liasas

Como parte de este ejemplo, se buscaron enzimas microbianas de función desconocida que se agruparon con aquellas que se sabe que sintetizan o usan malato o succinato (productos potenciales formados después de la utilización de carnitina) y un supuesto transportador de betaína-carnitina-colina. Un candidato potencial era un par de genes denominado previamente yeaW/X en *E. Coli* DH10B (yeaW (dioxigenasa), GeneID: 6060925 y yeaX (oxidorreductasa), GeneID: 6060982). Usando un plásmido pET20 modificado, *E. coli* BL21pLysS se transformó con cada alelo y posteriormente se purificó individualmente yeaW y yeaX recombinantes de lisados bacterianos usando la cromatografía de afinidad con metal 8xHis. Cuando se combinan las proteínas purificadas, el complejo yeaW/X demostró actividad carnitina TMA liasa (controlada por la producción de d9-TMA a partir de d9-carnitina). Curiosamente, la caracterización adicional del complejo microbiano yeaW/X recombinante reveló la promiscuidad del sustrato, catalizando la producción de d9-TMA a partir de múltiples precursores sintéticos de d9-trimetilamina (yBB, L-carnitina, colina y betaína; Figura 12).

La clonación, expresión, aislamiento y caracterización de yeaW/yeaX fue la siguiente. Se identificó un complejo génico consistente con las características buscadas, incluidos los genes yeaU (deshidrogenasa), GeneID: 6060908; yeaV (supuesto transportador de BCCT), GeneID: 6060973; yeaW (dioxigenasa), GeneID: 6060925 y yeaX (oxidorreductasa), GeneID: 6060982. Los genes de yeaW y yeaX son contiguos y se sometieron a PCR del ADN genómico de *E. Coli* DH10B, GeneBank: CP000948,1, nucleótidos 1973260-1975405 usando los siguientes cebadores directo e inverso, respectivamente, (las secuencias específicas de genes están subrayadas), 5' AGGAGATACCATGAGCAATCTGAGCCCTGACTTTGTACTAC (SEQ ID NO:5), y 5' AGGAGATATACCATGTCAGACTATCAAATGTTTGAAGTACAGGTG (SEQ ID NO:6). Las reacciones de PCR se realizaron en partes alícuotas de 50 µl usando el siguiente programa de temperatura: 2 min a 95 °C; 1x (20 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C, 80 segundos a 68 °C); 30x (20 segundos a 95 °C, 30 segundos a 62 °C, 80 segundos a 68 °C); 3 minutos a 68 °C y 4 °C de retención. Las reacciones de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de PCR se purificó en gel, se cuantificó y se usó para clonar en un vector pET20 modificado en los sitios Nco I/HindIII usando InFusion (Clontech). Después de la verificación de la secuencia de ADN de los clones, los estudios piloto de expresión confirmaron que se estaban produciendo las proteínas del tamaño correcto y que el lisado, pero no el lisado de las células BL21 nativas inducidas, tenía actividad carnitina TMA-liasa (d9-TMA producida a partir de d9-carnitina). Los genes individuales yeaW y yeaX se sometieron a PCR a partir de este clon de expresión usando cebadores específicos de gen y se clonaron en marco detrás de una etiqueta 8X-His en un vector pET20 modificado. Tras la verificación de la secuencia, los alelos individuales yeaW y yeaX marcados con epítopo individualmente se transformaron en células de *E. Coli* BL21 DE3 pLysS (Invitrogen) y las colonias individuales de cada una se expandieron para el crecimiento, la inducción, la cosecha y la preparación del extracto, como se describió anteriormente (Gogonea et al., 2010, Biochemistry 49, 7323-7343). Las células que expresaban yeaW o yeaX etiquetadas con 8X se cultivaron hasta una DO600 de 0,5, se indujeron a temperatura ambiente con IPTG 0,4 mM durante 18 h, y luego se cosecharon y se extrajeron las proteínas usando un microfluidizador, como se describió anteriormente (Gogonea et al., 2010). Las proteínas recombinantes se purificaron usando resina IMAC

cargada con Ni, como se ha descrito anteriormente (Gogonea et al., 2010). La actividad enzimática se determinó por incubación de yeaW y yeaX purificadas (30 µg cada una) con compuestos que contienen trimetilamina marcada con deuterio 100 µM en presencia de NADH 200 µM en 1 ml de PBS a 37 °C en viales herméticos a los gases. El producto, d9-TMA, se determinó por LC/MS/MS como se ha descrito anteriormente.

REFERENCIAS

1. Mafra et al., Role of altered intestinal microbiota in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. Future Microbiol 2014;9:399-410.
2. Vaziri et al., Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. Kidney Int 2013;83(2):308-15.
3. Stenvinkel and Alvestrand, Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. Semin Dial 2002;15(5):329-37.
4. Anders et al., The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. Kidney Int 2013;83(6):1010-6.
5. Lee et al., Effects of AST-120 on blood concentrations of protein-bound uremic toxins and biomarkers of cardiovascular risk in chronic dialysis patients. Blood Purif 2014;37(1):76-83.
6. Lekawanvijit et al., Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. Circ Res 2012;111(11):1470-83.
7. Ramezani and Raj. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. J Am Soc Nephrol 2014;25(4):657-70.
8. Koeth et al., Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nat Med 2013;19(5):576-85.
9. Tang et al., Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. N Engl J Med 2013;368(17):1575-84.
10. Wang et al., Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature 2011;472(7341):57-63.
11. Wang et al., Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiotagenerated metabolite trimethylamine-N-oxide. Eur Heart J 2014;35(14):904-10.
12. Bennett et al. Trimethylamine-Noxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. Cell Metab 2013;17(1):49-60.
13. Bain et al., Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 2006;21(5):1300-4.
14. Bain et al., Oral L-carnitine: metabolite formation and hemodialysis. Curr Drug Metab 2006;7(7):811-6.
15. Bell et al., Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. Biochim Biophys Acta 1991;1096(2):101-7.
16. Robert et al., A pair analysis of the delayed graft function in kidney recipient: the critical role of the donor. Journal of critical care 2010;25(4):582-90.
17. Inker et al.,. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. N Engl J Med 2012;367(1):20-9.
18. Wang et al., Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Biochem 2014;455:35-40.
19. Pencina et al., Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med 2008;27(2):157-72; discussion 207-12.
20. Qu et al., Regulation of renal fibrosis by Smad3 thr388 phosphorylation. Am J Pathol 2014;184(4):944-52.
21. Al-Waiz et al., The metabolism of 14C-labelled trimethylamine and its N-oxide in man. Xenobiotica 1987;17(5):551-8.
22. Smith et al., Metabolism and excretion of methylamines in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1994;125(2):296-308.
23. Zeisel et al., Conversion of dietary choline to trimethylamine and dimethylamine in rats: dose-response relationship. J Nutr 1989;119(5):800-4.
24. Hauet et al., Proton NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of citrate and trimethylamine-N-oxide excretion after kidney preservation. Transplant Proc 1997; 29(5):2323-5.
25. Le Moyec et al., Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine and plasma in renal transplantation follow-up. Nephron 1993;65(3):433-9.
26. Serkova et al., H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. Kidney Int 2005;67(3):1142-51.
27. Foxall et al., NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. Kidney Int. 1993;43(1):234-45.
28. Runyan et al., Smad3 and PKCdelta mediate TGF-betal-induced collagen I expression in human mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol 2003;285(3):F413-22.
29. Rhee et al., A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. J Am Soc Nephrol 2013;24(8):1330-8.
30. Lin et al., Associations of diet with albuminuria and kidney function decline. Clin J Am Soc Nephrol 2010;5(5):836-43.
31. Hegazy and El-Bedewy, Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2010;16(33):4145-51.
32. Seth et al., Probiotics ameliorate the hydrogen peroxideinduced epithelial barrier disruption by a PKC- and

MAP kinase-dependent mechanism. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008;294(4):G1060-9.
33. Simenhoff et al., Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried Lactobacillus acidophilus. Miner Electrolyte Metab 1996;22(1-3):92-6.
34. Takayama et al., Bifidobacterium in gastro-resistant seamless capsule reduces serum levels of indoxyl sulfate in patients on hemodialysis. Am J Kidney Dis 2003;41(3 Suppl 1):S142-5.
35. Ranganathan et al., Probiotic amelioration of azotemia in 5/6th nephrectomized Sprague-Dawley rats. ScientificWorldJournal 2005;5:652-60.
36. Ranganathan et al., Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. Adv Ther 2010;27(9):634-47.
37. Niwa and Ise, Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. J Lab Clin Med 1994;124(1):96-104.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

<120> TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CON AGENTES REDUCTORES DE LA TMA Y LA TMAO

<130> CCF-34107/WO-2/ORD

<150> US 62/056,168
<151> 2014-09-26

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1125
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 1

```
atgagcaatc tgagccctga ctttgtacta cccgaaaatt tttgcgctaa cccgcaagag      60
gcgtggacca ttcctgcccg tttttatacc gatcagaacg cgtttgaaca cgaaaaagag     120
aacgtcttcg ccaaaagctg gatttgcgtc gctcacagca gcgaactggc gaatgccaat     180
gattatgtga cgcgtgagat cattggcgaa agcatcgtgc tggtacgcgg tcgtgataag     240
gttttgcgcg cgttctataa cgtgtgtccg caccgtggtc atcagttgtt gagcggtgaa     300
ggaaaagcaa aaaatgtgat tacctgcccg tatcacgcat gggcattcaa actcgatggc     360
aacctggccc atgcacgtaa ctgcgaaaac gtcgccaatt tcgatagcga caaagcgcaa     420
ctggttccgg tgcgtctgga agaatatgcc ggattcgtct tcatcaacat ggaccccaac     480
gccaccagcg tagaagatca attacccggc ctgggcgcga aagtgctgga agcctgcccg     540
gaagtccacg atctgaaact ggcggcccgc tttaccaccc gcacgcctgc caactggaag     600
aacattgtcg ataactatct cgagtgctat cactgtggtc cggcgcatcc aggtttctcc     660
gactccgtac aggttgatcg ttactggcac accatgcacg gtaactggac gctgcaatac     720
ggtttcgcca aaccgtccga acagtcgttt aaatttgaag agggtacgga tgcggcattc     780
cacggtttct ggctgtggcc gtgcacgatg ctgaacgtca ccccgatcaa agggatgatg     840
acggtcattt atgaattccc ggtggattct gaaactaccc tgcaaaacta cgatatttac     900
ttcaccaatg aagagttaac cgacgagcaa aaatcgctga ttgagtggta tcgcgatgtg     960
ttccgtccgg aagatttacg tctggttgaa agcgtacaga aagggctgaa atcgcgtggc    1020
tatcgtggtc aggggcgcat catggccgac agtagcggta gtggcatttc cgaacatggt    1080
atcgcccatt tccataatct gctggcgcag gtgtttaagg actaa                    1125
```

<210> 2
<211> 374
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 2

Met Ser Asn Leu Ser Pro Asp Phe Val Leu Pro Glu Asn Phe Cys Ala
1 5 10 15

Asn Pro Gln Glu Ala Trp Thr Ile Pro Ala Arg Phe Tyr Thr Asp Gln
20 25 30

Asn Ala Phe Glu His Glu Lys Glu Asn Val Phe Ala Lys Ser Trp Ile
35 40 45

Cys Val Ala His Ser Ser Glu Leu Ala Asn Ala Asn Asp Tyr Val Thr
50 55 60

Arg Glu Ile Ile Gly Glu Ser Ile Val Leu Val Arg Gly Arg Asp Lys
65 70 75 80

Val Leu Arg Ala Phe Tyr Asn Val Cys Pro His Arg Gly His Gln Leu
85 90 95

Leu Ser Gly Glu Gly Lys Ala Lys Asn Val Ile Thr Cys Pro Tyr His
100 105 110

Ala Trp Ala Phe Lys Leu Asp Gly Asn Leu Ala His Ala Arg Asn Cys
115 120 125

Glu Asn Val Ala Asn Phe Asp Ser Asp Lys Ala Gln Leu Val Pro Val
130 135 140

Arg Leu Glu Glu Tyr Ala Gly Phe Val Phe Ile Asn Met Asp Pro Asn
145 150 155 160

Ala Thr Ser Val Glu Asp Gln Leu Pro Gly Leu Gly Ala Lys Val Leu
165 170 175

Glu Ala Cys Pro Glu Val His Asp Leu Lys Leu Ala Ala Arg Phe Thr
180 185 190

Thr Arg Thr Pro Ala Asn Trp Lys Asn Ile Val Asp Asn Tyr Leu Glu
195 200 205

Cys Tyr His Cys Gly Pro Ala His Pro Gly Phe Ser Asp Ser Val Gln
210 215 220

Val Asp Arg Tyr Trp His Thr Met His Gly Asn Trp Thr Leu Gln Tyr
225 230 235 240

Gly Phe Ala Lys Pro Ser Glu Gln Ser Phe Lys Phe Glu Glu Gly Thr
245 250 255

Asp Ala Ala Phe His Gly Phe Trp Leu Trp Pro Cys Thr Met Leu Asn
260 265 270

Val Thr Pro Ile Lys Gly Met Met Thr Val Ile Tyr Glu Phe Pro Val
275 280 285

Asp Ser Glu Thr Thr Leu Gln Asn Tyr Asp Ile Tyr Phe Thr Asn Glu
290 295 300

Glu Leu Thr Asp Glu Gln Lys Ser Leu Ile Glu Trp Tyr Arg Asp Val
305 310 315 320

Phe Arg Pro Glu Asp Leu Arg Leu Val Glu Ser Val Gln Lys Gly Leu
325 330 335

Lys Ser Arg Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Arg Ile Met Ala Asp Ser Ser
340 345 350

Gly Ser Gly Ile Ser Glu His Gly Ile Ala His Phe His Asn Leu Leu
355 360 365

Ala Gln Val Phe Lys Asp
370

<210> 3
<211> 966
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 3

atgtcagact atcaaatgtt tgaagtacag gtgagccagg ttgaacccct taccgaacag 60

gtgaaacgct tcacgctggt ggcaaccgat ggcaaaccat tacctgcgtt taccggagga 120

agtcacgtca ttgtgcagat gagcgatggt gataaccagt acagcaatgc gtattcacta 180

ctgagttcgc cgcatgacac ctcttgttat cagattgccg ttcggctgga ggaaaactcg 240

cgcggcggtt cccgcttttt gcatcagcag gtaaaagtgg gcgatcggtt aacgatttca 300

acgcctaata acctgtttgc gctaattccc tcagccagaa agcatctgtt tatcgcgggc 360

ggtattggta tcaccccttt cctgtcgcac atggcagagc tgcaacacag cgacgtcgac 420

tggcagctac attactgctc gcgaaatcca gaaagttgcg catttcgtga tgagctagtc 480

cagcatccgc aggctgagaa agtccatttg catcattcat caaccggaac acgactggaa 540

ttagcgcgat tattggcgga tatcgaacct ggcacacacg tttatacctg tggccccgag 600

gcgctaattg aagcggtaag aagtgaagct gcgcgtctgg acatcgccgc cgatacgctg 660

cactttgagc aatttgctat cgaagacaaa accggcgatg catttaccct ggtgcttgcc 720

cgttccggaa aagagtttgt ggtgccggaa gagatgacta ttttgcaggt tattgaaaat 780

aataaagccg cgaaagtgga atgtttatgt cgtgaagggg tatgcggaac ctgcgaaaca 840

gcaatactgg aaggtgaagc tgaccatcgg gatcaatatt ttagcgatga agagcgtgcc 900

agccagcaaa gtatgttgat ctgttgttcg cgtgcgaagg gtaaacgcct ggtgttggat 960

ttgtag 966

<210> 4
<211> 321
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 4

Met Ser Asp Tyr Gln Met Phe Glu Val Gln Val Ser Gln Val Glu Pro
1 5 10 15

Leu Thr Glu Gln Val Lys Arg Phe Thr Leu Val Ala Thr Asp Gly Lys
20 25 30

Pro Leu Pro Ala Phe Thr Gly Gly Ser His Val Ile Val Gln Met Ser
35 40 45

Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Ser Asn Ala Tyr Ser Leu Leu Ser Ser Pro
50 55 60

His Asp Thr Ser Cys Tyr Gln Ile Ala Val Arg Leu Glu Glu Asn Ser
65 70 75 80

Arg Gly Gly Ser Arg Phe Leu His Gln Gln Val Lys Val Gly Asp Arg
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Thr Pro Asn Asn Leu Phe Ala Leu Ile Pro Ser Ala
100 105 110

Arg Lys His Leu Phe Ile Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Phe Leu
115 120 125

Ser His Met Ala Glu Leu Gln His Ser Asp Val Asp Trp Gln Leu His
130 135 140

Tyr Cys Ser Arg Asn Pro Glu Ser Cys Ala Phe Arg Asp Glu Leu Val
145 150 155 160

Gln His Pro Gln Ala Glu Lys Val His Leu His His Ser Ser Thr Gly

165 170 175

Thr Arg Leu Glu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Asp Ile Glu Pro Gly Thr
180 185 190

His Val Tyr Thr Cys Gly Pro Glu Ala Leu Ile Glu Ala Val Arg Ser
195 200 205

Glu Ala Ala Arg Leu Asp Ile Ala Ala Asp Thr Leu His Phe Glu Gln
210 215 220

Phe Ala Ile Glu Asp Lys Thr Gly Asp Ala Phe Thr Leu Val Leu Ala
225 230 235 240

Arg Ser Gly Lys Glu Phe Val Val Pro Glu Glu Met Thr Ile Leu Gln
245 250 255

Val Ile Glu Asn Asn Lys Ala Ala Lys Val Glu Cys Leu Cys Arg Glu
260 265 270

Gly Val Cys Gly Thr Cys Glu Thr Ala Ile Leu Glu Gly Glu Ala Asp
275 280 285

His Arg Asp Gln Tyr Phe Ser Asp Glu Glu Arg Ala Ser Gln Gln Ser
290 295 300

Met Leu Ile Cys Cys Ser Arg Ala Lys Gly Lys Arg Leu Val Leu Asp
305 310 315 320

Leu

<210> 5
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN directo

<400> 5
aggagatacc atgagcaatc tgagccctga ctttgtacta c 41

<210> 6
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN inverso

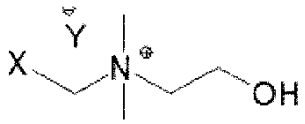
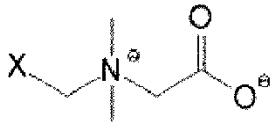
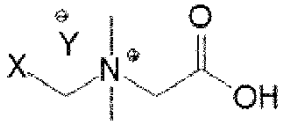
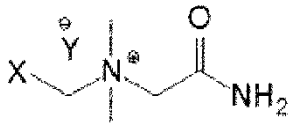
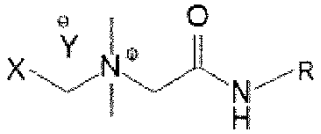
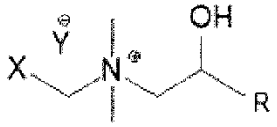
<400> 6
aggagatata ccatgtcaga ctatcaaatg tttgaagtac aggtg 45

REIVINDICACIONES

1. Un agente seleccionado de:

a) una halometil colina,
b) una halometil betaína,
c) una sal de halometil betaína,
d) una amida de halometil betaína, y
e) un halometil dimetil amino alcohol,

teniendo las estructuras y grupos químicos mostrados a continuación

Halometilcolinas: (Fluorocolina, Clorocolina, Bromocolina, Yodocolina) X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: Y = I, Br, Cl	
Halometil betaínas: **(Fluorodimetilglicina, Clorodimetilglicina, Bromodimetilglicina, Yododimetilglicina)** X = F, Cl, Br, I	
Sales de halometil betaína: X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: Y = I, Br, Cl	
Amidas de halometil betaína: X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: Y = I, Br, Cl	
Amidas de halometil betaína: X = F, Cl, Br, I Y representa contraiones: R = metilo, etilo, propilo, aminoácidos, péptidos	
Halometil dimetil amino alcoholes: X = F, Cl, Br, I Y = I, Br, Cl R = metilo, etilo, propilo (por ejemplo, N-Yodometilo N,N-dimetilamina-2-hidroxipropanol, cuando X = I, R = metilo)	

para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto con enfermedad renal y/o cardiovascular.

2. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una muestra de dicho sujeto se analiza para determinar las concentraciones de eGFR, eCrCl, cistatina C, KIM1, cociente albúmina/creatinina urinaria elevado, trimetilamina N-óxido (TMAO), TMA y/o un compuesto que contiene TMA antes y/o después de dicho tratamiento.

3. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha muestra se selecciona de sangre completa, suero, plasma, orina y saliva.

4. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende dicha halometil colina.

5. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende dicha halometil betaína.

6. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende dicha sal de halometil betaína.

7. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende dicha amida de halometil betaína.

8. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende dicho halometil dimetil amino alcohol.

FIG. 1A

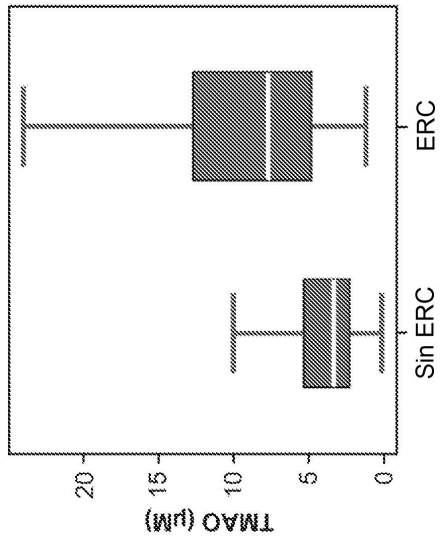

TMAO (µM)
20
15
10
5
0
Sin ERC
ERC

FIG. 1B

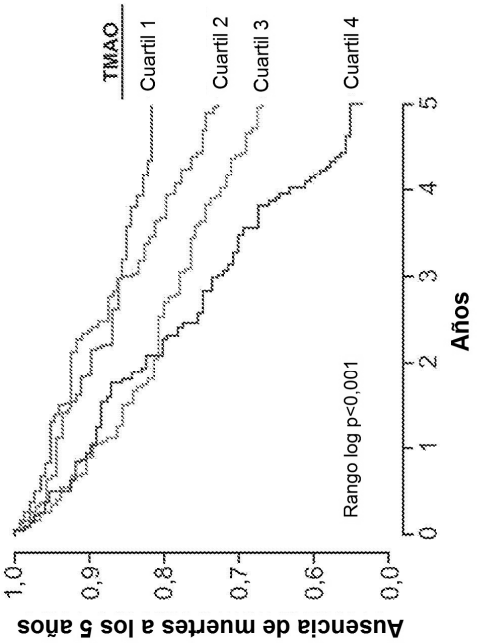

Ausencia de muertes a los 5 años
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,0
0
1
2
3
4
5
Años
Rango log p<0,001
TMAO
Cuartil 1
Cuartil 2
Cuartil 3
Cuartil 4

FIG. 2

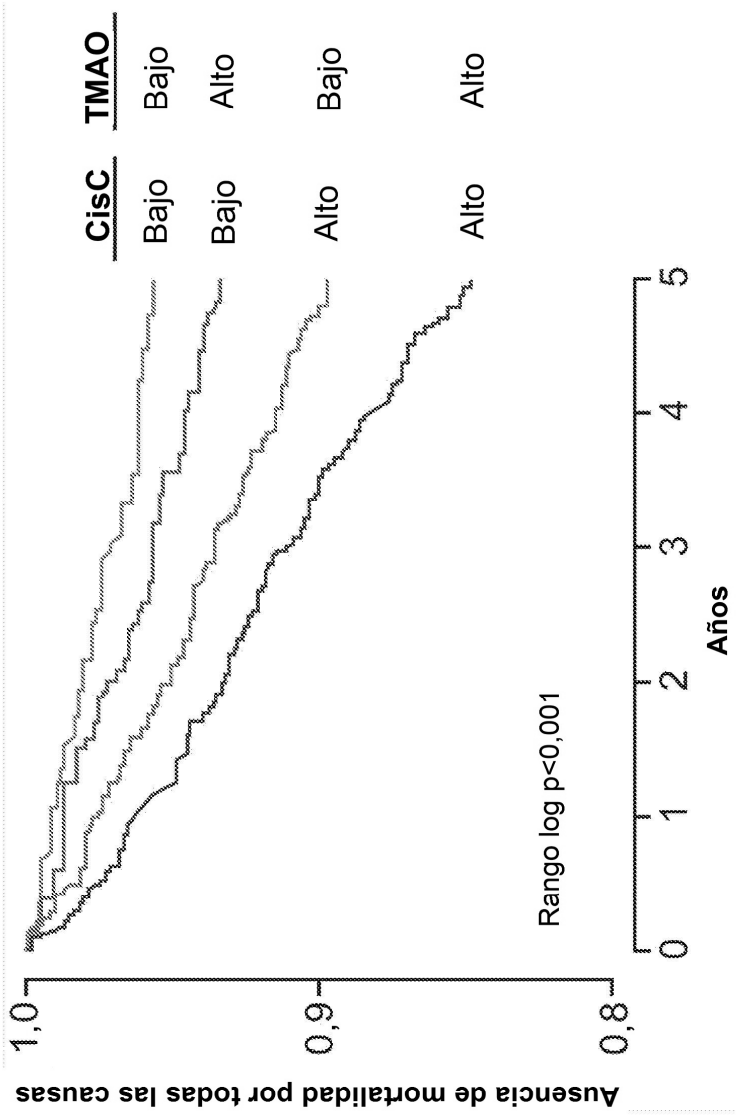

Ausencia de mortalidad por todas las causas
1,0
0,9
0,8
0
1
2
3
4
5
Años
Rango log p<0,001
CisC
TMAO
Bajo
Bajo
Bajo
Alto
Alto
Bajo
Alto
Alto

FIG. 3A

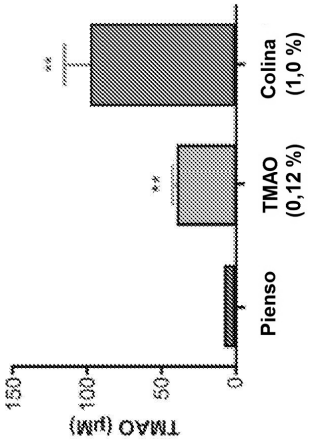

TMAO (µM)
150
100
50
0
**
**
Pienso
TMAO (0,12 %)
Colina (1,0 %)

FIG. 3B

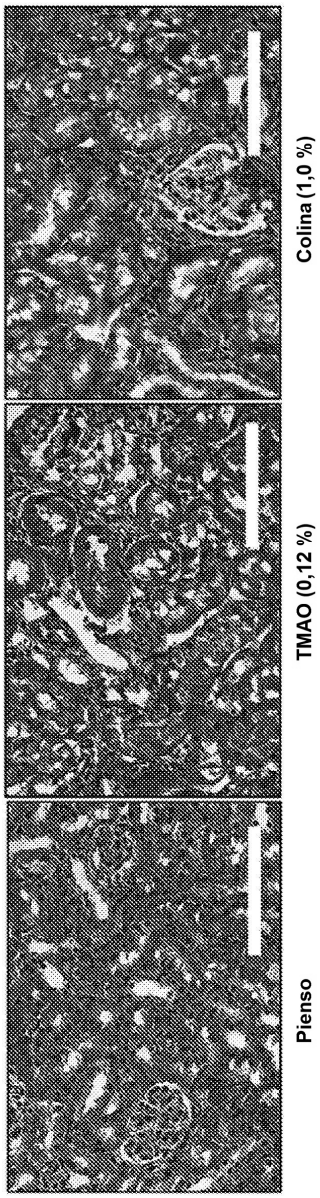

Pienso
TMAO (0,12 %)
Colina (1,0 %)

FIG. 3C

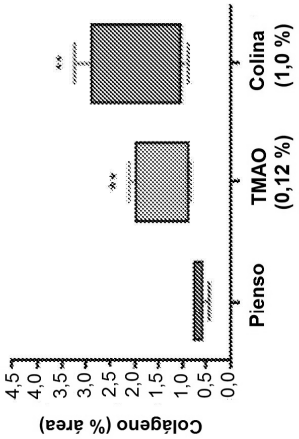

Colágeno (% área)
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
**
**
Pienso
TMAO (0,12 %)
Colina (1,0 %)

FIG. 3D

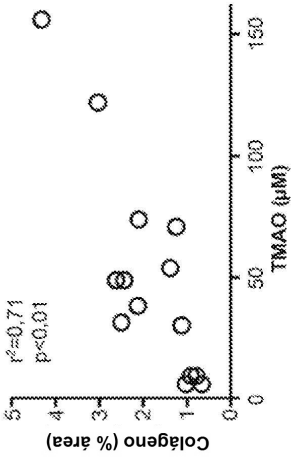
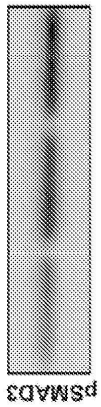

Colágeno (% área)
5
4
3
2
1
0
r²=0,71
p<0,01
0
50
100
150
TMAO (µM)

FIG. 3E


pSMAD3

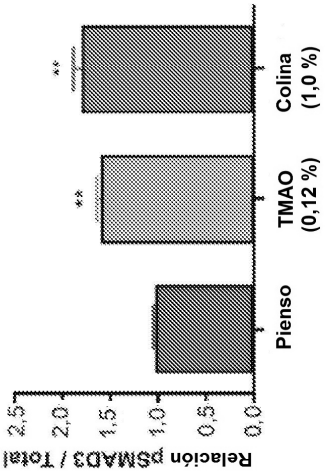

Relación pSMAD3 / Total
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
**
**
Pienso
TMAO (0,12 %)
Colina (1,0 %)

FIG. 3F

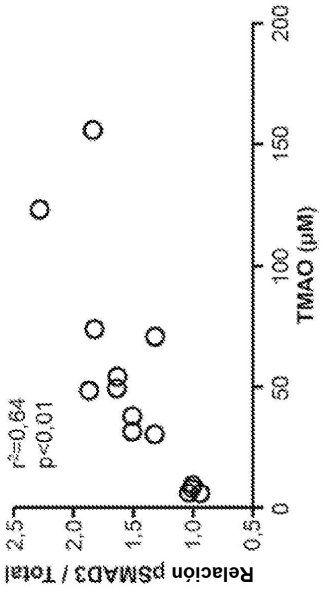

Relación pSMAD3 / Total
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
r²=0,64
p<0,01
0
50
100
150
200
TMAO (µM)

FIG. 4A

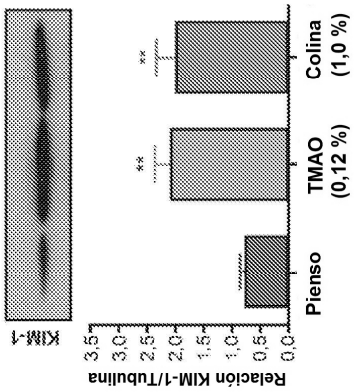


FIG. 4B

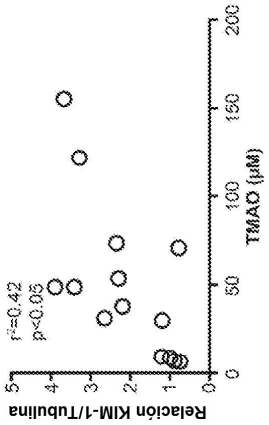


FIG. 4C

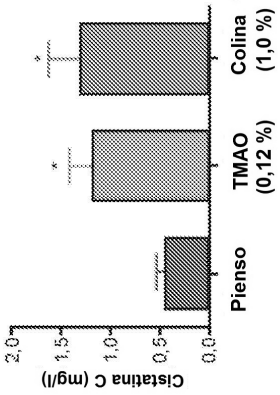
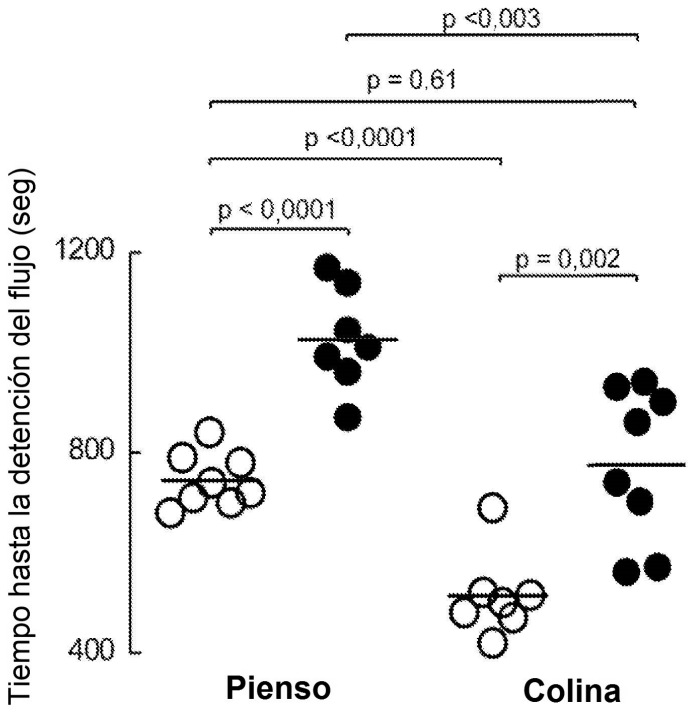


FIG. 5



	Control n=8	ASA n=7	Control n=7	ASA n=8
TMAO(µM)	8,3 ± 0,6	4,5 ± 0,4	43,31 ± 7,8	19,7 ± 2,0

FIG. 6

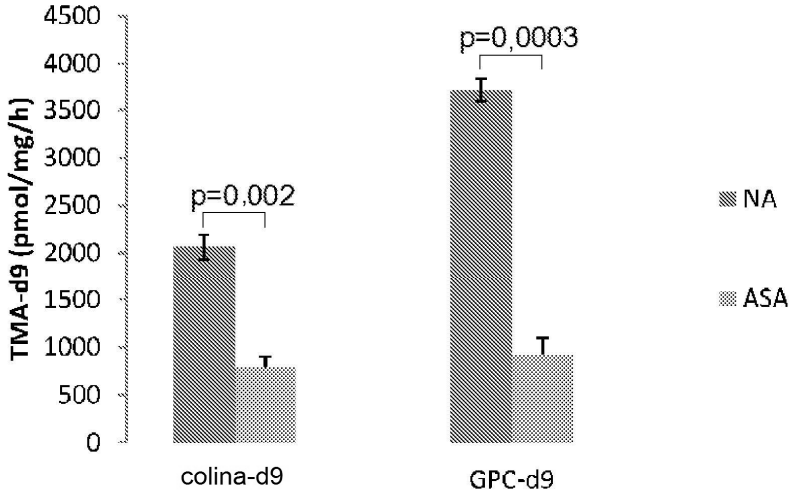

4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
TMA-d9 (pmol/mg/h)
p=0,002
p=0,0003
colina-d9
GPC-d9
NA
ASA

FIG. 7

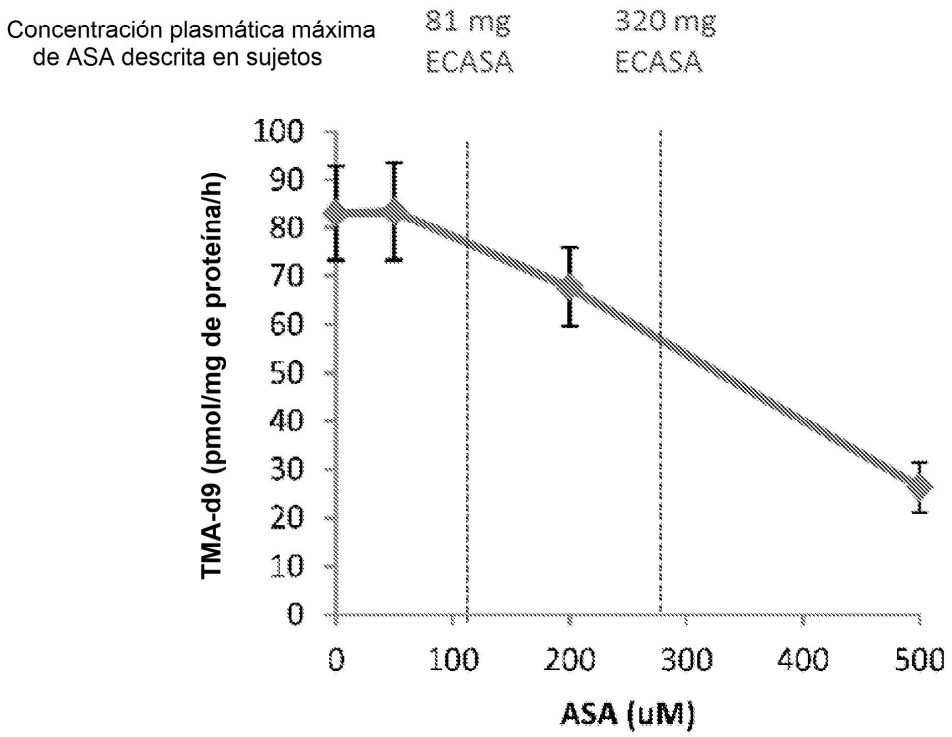

Concentración plasmática máxima
de ASA descrita en sujetos
81 mg
ECASA
320 mg
ECASA
TMA-d9 (pmol/mg de proteína/h)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
ASA (uM)

FIG. 8

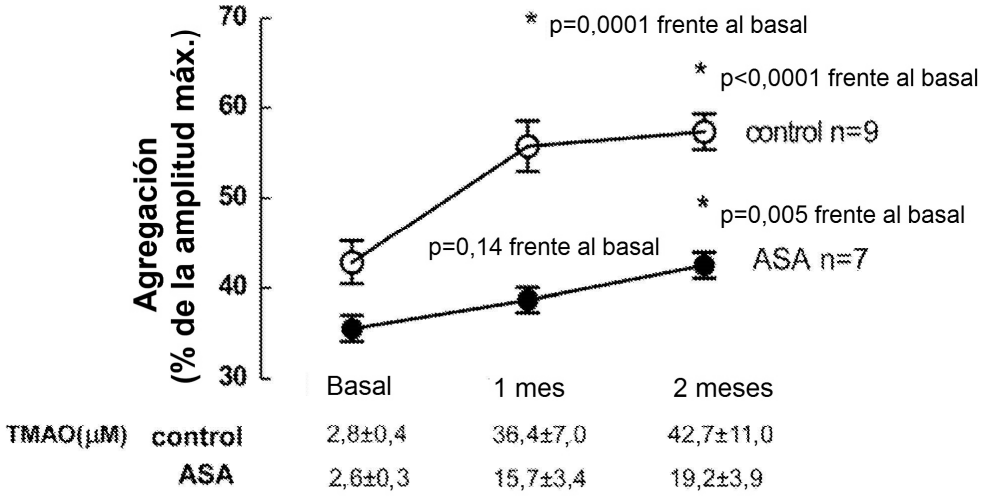
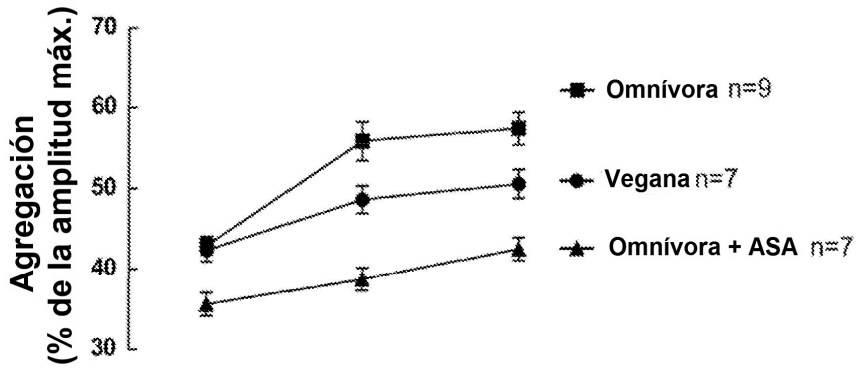

Agregación
(% de la amplitud máx.)
70
60
50
40
30
* p=0,0001 frente al basal
* p<0,0001 frente al basal
control n=9
* p=0,005 frente al basal
p=0,14 frente al basal
ASA n=7
Basal
1 mes
2 meses
TMAO(μM)
control
2,8±0,4
36,4±7,0
42,7±11,0
ASA
2,6±0,3
15,7±3,4
19,2±3,9

FIG. 9



		Basal	1 mes	2 meses
TMAO(μM)	Omnívora	2,8±0,4	36,4±7,0	42,7±11,0
		2,6±0,6	27,3±5,3	28,9±5,0
		2,6±0,3	15,7±3,4	19,2±3,9

FIG. 10

yeaW

GeneID|6060925|ref|NC_010473.1|1973260-1974384 Escherichia coli str. K-12 substr. DH10B

(SEQ ID NO:1)

ATGAGCAATCTGAGCCCTGACTTTGTACTACCCGAAAATTTTTGCGCTAACCCGCAAGAGGCGTGGACCA
TTCCTGCCCGTTTTTATACCGATCAGAACGCGTTTGAACACGAAAAAGAGAACGTCTTCGCCAAAAGCTG
GATTTGCGTCGCTCACAGCAGCGAACTGGCGAATGCCAATGATTATGTGACGCGTGAGATCATTGGCGAA
AGCATCGTGCTGGTACGCGGTCGTGATAAGGTTTTGCGCGCGTTCTATAACGTGTGTCCGCACCGTGGTC
ATCAGTTGTTGAGCGGTGAAGGAAAAGCAAAAAATGTGATTACCTGCCCGTATCACGCATGGGCATTCAA
ACTCGATGGCAACCTGGCCCATGCACGTAACTGCGAAAACGTCGCCAATTTCGATAGCGACAAAGCGCAA
CTGGTTCCGGTGCGTCTGGAAGAATATGCCGGATTCGTCTTCATCAACATGGACCCCAACGCCACCAGCG
TAGAAGATCAATTACCCGGCCTGGGCGCGAAAGTGCTGGAAGCCTGCCCGGAAGTCCACGATCTGAAACT
GGCGGCCCGCTTTACCACCCGCACGCCTGCCAACTGGAAGAACATTGTCGATAACTATCTCGAGTGCTAT
CACTGTGGTCCGGCGCATCCAGGTTTCTCCGACTCCGTACAGGTTGATCGTTACTGGCACACCATGCACG
GTAACTGGACGCTGCAATACGGTTTCGCCAAACCGTCCGAACAGTCGTTTAAATTTGAAGAGGGTACGGA
TGCGGCATTCCACGGTTTCTGGCTGTGGCCGTGCACGATGCTGAACGTCACCCCGATCAAAGGGATGATG
ACGGTCATTTATGAATTCCCGGTGGATTCTGAAACTACCCTGCAAAACTACGATATTTACTTCACCAATG
AAGAGTTAACCGACGAGCAAAAATCGCTGATTGAGTGGTATCGCGATGTGTTCCGTCCGGAAGATTTACG
TCTGGTTGAAAGCGTACAGAAAGGGCTGAAATCGCGTGGCTATCGTGGTCAGGGGCGCATCATGGCCGAC
AGTAGCGGTAGTGGCATTTCCGAACATGGTATCGCCCATTTCCATAATCTGCTGGCGCAGGTGTTTAAGG
ACTAA

(SEQ ID NO:2)

MSNLSPDFVLPENFCANPQEAWTIPARFYTDQNAFEHEKENVFAKSWICVAHSSELANANDYVTREIIGE
SIVLVRGRDKVLRAFYNVCPHRGHQLLSGEGKAKNVITCPYHAWAFKLDGNLAHARNCENVANFDSDKAQ
LVPVRLEEYAGFVFINMDPNATSVEDQLPGLGAKVLEACPEVHDLKLAARFTTRTPANWKNIVDNYLECY
HCGPAHPGFSDSVQVDRYWHTMHGNWTLQYGFAKPSEQSFKFEEGTDAAFHGFWLWPCTMLNVTPIKGMM
TVIYEFPVDSETTLQNYDIYFTNEELTDEQKSLIEWYRDVFRPEDLRLVESVQKGLKSRGYRGQGRIMAD
SSGSGISEHGIAHFHNLLAQVFKD

FIG. 11

yeaX

GeneID|6060982|ref|NC_010473.1|1974440-1975405 Escherichia coli str. K-12 substr. DH10B

(SEQ ID NO:3)

ATGTCAGACTATCAAATGTTTGAAGTACAGGTGAGCCAGGTTGAACCCCTTACCGAACAGGTGAAACGCT
TCACGCTGGTGGCAACCGATGGCAAACCATTACCTGCGTTTACCGGAGGAAGTCACGTCATTGTGCAGAT
GAGCGATGGTGATAACCAGTACAGCAATGCGTATTCACTACTGAGTTCGCCGCATGACACCTCTTGTTAT
CAGATTGCCGTTCGGCTGGAGGAAAACTCGCGCGGCGGTTCCCGCTTTTTGCATCAGCAGGTAAAAGTGG
GCGATCGGTTAACGATTTCAACGCCTAATAACCTGTTTGCGCTAATTCCCTCAGCCAGAAAGCATCTGTT
TATCGCGGGCGGTATTGGTATCACCCCTTTCCTGTCGCACATGGCAGAGCTGCAACACAGCGACGTCGAC
TGGCAGCTACATTACTGCTCGCGAAATCCAGAAAGTTGCGCATTTCGTGATGAGCTAGTCCAGCATCCGC
AGGCTGAGAAAGTCCATTTGCATCATTCATCAACCGGAACACGACTGGAATTAGCGCGATTATTGGCGGA
TATCGAACCTGGCACACACGTTTATACCTGTGGCCCCGAGGCGCTAATTGAAGCGGTAAGAAGTGAAGCT
GCGCGTCTGGACATCGCCGCCGATACGCTGCACTTTGAGCAATTTGCTATCGAAGACAAAACCGGCGATG
CATTTACCCTGGTGCTTGCCCGTTCCGGAAAAGAGTTTGTGGTGCCGGAAGAGATGACTATTTTGCAGGT
TATTGAAAATAATAAAGCCGCGAAAGTGGAATGTTTATGTCGTGAAGGGGTATGCGGAACCTGCGAAACA
GCAATACTGGAAGGTGAAGCTGACCATCGGGATCAATATTTTAGCGATGAAGAGCGTGCCAGCCAGCAAA
GTATGTTGATCTGTTGTTCGCGTGCGAAGGGTAAACGCCTGGTGTTGGATTTGTAG

(SEQ ID NO:4)

MSDYQMFEVQVSQVEPLTEQVKRFTLVATDGKPLPAFTGGSHVIVQMSDGDNQYSNAYSLLSSPHDTSCY
QIAVRLEENSRGGSRFLHQQVKVGDRLTISTPNNLFALIPSARKHLFIAGGIGITPFLSHMAELQHSDVD
WQLHYCSRNPESCAFRDELVQHPQAEKVHLHHSSTGTRLELARLLADIEPGTHVYTCGPEALIEAVRSEA
ARLDIAADTLHFEQFAIEDKTGDAFTLVLARSGKEFVVPEEMTILQVIENNKAAKVECLCREGVCGTCET
AILEGEADHRDQYFSDEERASQQSMLICCSRAKGKRLVLDL

FIG. 12

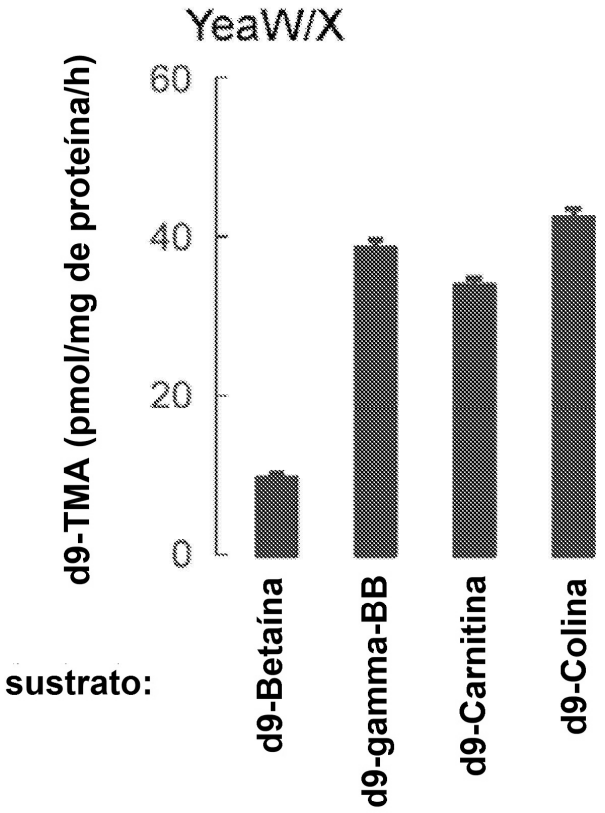
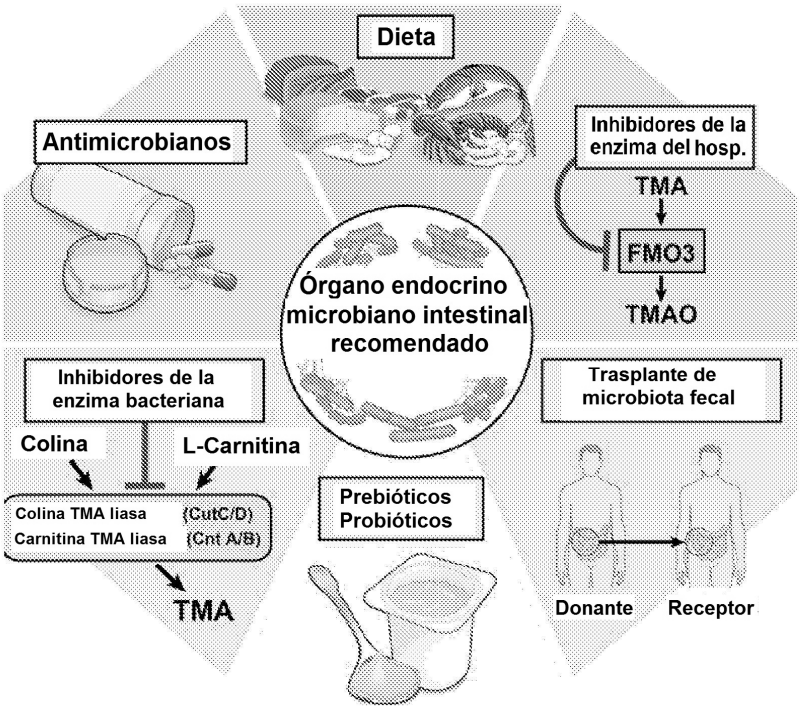

YeaW/X
d9-TMA (pmol/mg de proteína/h)
60
40
20
0
sustrato:
d9-Betaína
d9-gamma-BB
d9-Carnitina
d9-Colina

FIG. 13


Dieta
Antimicrobianos
Inhibidores de la enzima del hosp.
TMA
FMO3
TMAO
Órgano endocrino microbiano intestinal recomendado
Inhibidores de la enzima bacteriana
Colina
L-Carnitina
Colina TMA liasa (CutC/D)
Carnitina TMA liasa (Cnt A/B)
TMA
Prebióticos
Probióticos
Trasplante de microbiota fecal
Donante
Receptor