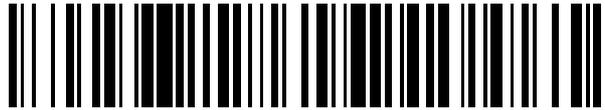


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 223**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2008.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A23L 33/105 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2017 PCT/IL2017/050187**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17138007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2017 E 17712254 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3414346**

54 Título: **Diagnóstico, predicción y tratamiento de la obesidad recidivante basados en el microbioma**

30 Prioridad:

14.02.2016 US 201662295094 P

17.11.2016 US 201662423299 P

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

06.07.2020

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
at the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**ELINAV, ERAN y
SEGAL, ERAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 771 223 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

Diagnóstico, predicción y tratamiento de la obesidad recidivante basados en el microbioma

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a métodos basados en el microbioma de mantenimiento de un peso corporal objetivo y al análisis de la probabilidad de recuperación de peso después de una dieta.

10 El siglo pasado ha atestiguado un alarmante aumento en la prevalencia de la obesidad, con más del 44% actualmente estimado de la población adulta mundial a tener sobrepeso, y más de 300 millones de adultos que padecen obesidad mórbida. Además de sus proporciones epidémicas, la obesidad se considera un factor de riesgo importante para una serie de enfermedades estrechamente relacionadas, incluida la diabetes mellitus tipo II que afecta a cerca de 500 millones de personas en todo el mundo, la enfermedad del hígado graso no alcohólico que aparece como la enfermedad hepática más común en el mundo desarrollado, y la enfermedad cardiovascular isquémica considerada la principal causa de mortalidad general. En conjunto, la obesidad global endémica tiene consecuencias de largo alcance en la esperanza de vida, la calidad de vida y los costes de la atención médica.

15 A pesar de un esfuerzo médico y científico mundial continuo, ninguna intervención médica hasta la fecha ha demostrado tener efectos duraderos para revertir la epidemia de obesidad. Se ha reivindicado que una gran cantidad de enfoques dietéticos inducen eficazmente efectos significativos de reducción de peso, sin embargo, la gran mayoría de estos han demostrado no ser eficaces durante un período prolongado de tiempo o incompatibles con la observancia del tratamiento a largo plazo. Además, en más del 80% de los casos en los que la pérdida de peso se
20 logró inicialmente, el peso reducido no se mantiene, y en su lugar fue seguido de aumento de peso recidivante y complicaciones metabólicas recidivantes dentro de los 12 meses posteriores a la reducción de peso inicial que excedieron los trastornos metabólicos previos a la dieta. El aumento de peso posterior a la dieta no está impulsado genéticamente, como se ejemplifica en un estudio de gemelos a gran escala que demuestra una tendencia significativa al aumento de peso en gemelos (algunos monocigóticos) que hacen dieta en comparación con sus
25 hermanos que no hacen dieta. Este riesgo aumentó aún más con cada ciclo de aumento de peso-dieta. El aumento exagerado de peso después de la dieta fue independiente del peso inicial, como lo señaló un estudio que demuestra que los adolescentes que no hacen dieta presentan la mitad del riesgo de desarrollar obesidad en comparación con los adolescentes que hacen dieta con un peso inicial indistinguible. Del mismo modo, se sugirió que la recaída de la obesidad es independiente del ejercicio, ya que el ciclo de pérdida-recuperación de peso predijo un aumento de
30 peso posterior incluso en un grupo de 1.800 atletas muy activos. Por lo tanto, los mecanismos subyacentes al fenómeno de obesidad inducida por el ciclo de pérdida-recuperación de peso, generalmente conocido como el 'efecto yo-yo', siguen siendo en su mayoría desconocidos.

35 Un factor emergente y anteriormente inapreciable que afecta la homeostasis metabólica humana y el riesgo de obesidad y sus complicaciones metabólicas es el microbioma intestinal. Se ha demostrado que las alteraciones de composición y funcionales del microbioma, denominadas disbiosis, tanto en modelos animales como humanos, impulsan la tendencia a la obesidad y sus complicaciones (7, 8). Además, se ha demostrado que los cambios en la dieta son un impulsor principal de la composición y función del microbioma, con alteraciones en la dieta que impactan significativamente el microbioma pocos días después del inicio (9, 10).

Compendio de la invención

40 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Según un aspecto de algunas realizaciones, se proporciona un método de análisis de la probabilidad de recuperación de peso en un sujeto que ha alcanzado un peso objetivo poniendo en práctica un programa de pérdida de peso, comprendiendo el método la determinación de una cantidad o presencia de al menos un microbio y/o
45 producto del mismo en el microbioma intestinal del sujeto, en donde la cantidad de al menos un microbio se altera durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y además en donde la cantidad de al menos un microbio se mantiene al nivel que sigue al programa de pérdida de peso, en donde la cantidad o presencia de al menos un microbio o producto del mismo pronostica la recuperación de peso.

50 Según un aspecto de algunas realizaciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de aumento de peso en un sujeto que ha alcanzado un peso objetivo practicando un programa de pérdida de peso que comprende:

(a) determinar una cantidad o presencia de al menos un microbio y/o producto del mismo en un microbioma intestinal del sujeto, en donde la cantidad del al menos un microbio se altera durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y además en donde la cantidad de al menos un microbio se mantiene al nivel que sigue al programa de pérdida de peso; y

- (b) administrar al sujeto que ha alcanzado el peso deseado una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que regula por incremento al menos un microbio o producto del mismo que está regulado por disminución durante el período de aumento de peso previo o administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que regula por disminución un microbio o producto del mismo que está regulado por incremento durante el período de aumento de peso previo, reduciendo así el riesgo de aumento de peso en el sujeto.
- 5 Según un aspecto de algunas realizaciones, se proporciona un método de seguimiento de la eficacia de un adyuvante de la dieta en un sujeto:
- (a) que trata al sujeto con un adyuvante dietético; y
- (b) que analiza la presencia o la cantidad de al menos un microbio y/o producto del mismo, en donde se altera una cantidad de al menos un microbio o producto del mismo durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativo de un sujeto obeso y además en donde la cantidad de al menos un microbio se mantiene al nivel que sigue al programa de pérdida de peso;
- 10 en donde la cantidad o la presencia del al menos un microbio o producto del mismo es indicativo de la eficacia de un adyuvante para la dieta.
- 15 Según un aspecto de algunas realizaciones, se proporciona un método para reducir el riesgo de aumento de peso en un sujeto que ha alcanzado un peso objetivo poniendo en práctica un programa de pérdida de peso, comprendiendo el método administrar al sujeto un agente que altera el microbioma intestinal del sujeto para que la característica del microbioma intestinal se vuelva más similar a la característica de un microbioma intestinal de un sujeto no obeso que no se haya sometido a un programa de pérdida de peso, reduciendo así el aumento de peso en el sujeto.
- 20 Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, al menos un microbio está diferencialmente presente en el microbioma intestinal del sujeto en comparación con en el microbioma intestinal de una referencia no obesa que no ha sido objeto de un programa de pérdida de peso.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el producto de la misma es un metabolito.
- 25 Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, la característica del microbioma intestinal comprende una diversidad de microbios.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente es un trasplante fecal de un sujeto sano que no ha sido objeto de un programa de pérdida de peso.
- 30 Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto que ha alcanzado el peso objetivo ha terminado el programa de pérdida de peso.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, la característica del microbioma intestinal es una característica del metabolito.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, la característica del microbioma intestinal es una característica bacteriana.
- 35 Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente regula por disminución al menos un metabolito seleccionado del grupo que consiste en ursodesoxicolato, glicocolato, fenilacetato y heptanoato.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente es un flavonoide.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el flavonoide es apigenina y/o naringenina.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente es un probiótico.
- 40 Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el probiótico es una población bacteriana relacionada con la síntesis de nitrato o la biosíntesis de heptosa.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente es un antibiótico.
- Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente antibiótico disminuye una cantidad y/o actividad de la clase Mollicutes o del orden Bacteroidales.
- 45 Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además el análisis de la característica del microbioma intestinal del sujeto antes de la administración.

Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, el análisis se efectúa en una muestra fecal del sujeto.

Según otras características en las realizaciones preferidas descritas, al menos un microbio se expone en la FIG. 4F.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido generalmente por cualquier experto en la técnica a la que pertenece la descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de realizaciones de la descripción, a continuación se describen ejemplos de métodos y/o materiales. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente restrictivos.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

En la presente memoria se describen algunas realizaciones de la descripción, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se hace hincapié que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para exposición ilustrativa de realizaciones de la descripción.

A este respecto, la descripción tomada con los dibujos demuestra a los expertos en la materia cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la descripción.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-L ilustran la mejora de aumento de peso recidivante después del tratamiento de la obesidad. A, B, esquema de la configuración experimental (A) y pesos (B) de ratones sometidos a ciclos de pérdida-recuperación de peso y referencias. C-J, contenido de grasa corporal (C), exploraciones por MRI coronal (arriba) y axial (abajo) (D), concentraciones de glucosa después de GTT (E), cuantificación de la concentración de glucosa (F) y concentraciones séricas de leptina (G), colesterol total (H), LDL (I) y HDL (J) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso durante el segundo ciclo de obesidad y referencias. K, L, ciclos de pérdida-recuperación de peso en ratones tratados con celastrol para perder peso (K), y ratones tratados con antagonista de leptina para inducir aumento de peso (L). Las barras de colores debajo de las curvas de peso representan la duración de los tratamientos indicados. Los resultados en B-J son representativos de más de 5 experimentos independientes; los resultados en K-L son de un experimento. * $p < 0,05$, n. s. no significativo.

Las FIG. 2A-L ilustran las alteraciones persistentes del microbioma después de la pérdida de peso. A-D, contenido de grasa corporal (A), concentraciones de glucosa después de GTT (B), la cuantificación del contenido de glucosa (C) y concentraciones de insulina (D) en ratones tras la dieta después de volver al peso normal en comparación con las referencias. E-F, Beta-diversidad (E) y alfa-diversidad (F) de la composición de microbiota a lo largo del tiempo en ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso y referencias. G, ejemplo de taxones bacterianos cuya abundancia no se recupera después de la dieta. H, I, mapas de calor de OTU determinados por secuenciación 16S (H), y genes bacterianos determinados por secuenciación metagenómica (I) en el transcurso del aumento de peso y posterior dieta. J, Análisis de componentes principales de la metagenómica bacteriana a lo largo del tiempo en ratones y referencias en el ciclo de pérdida-recuperación de peso. K-J, ejemplos de funciones KEGG cuya abundancia no se recupera después de la dieta. Los resultados son representativos de más de 5 (A-H) o 2 (I-J) experimentos independientes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n. s. no significativo.

Las FIG. 3A-L ilustran que las alteraciones del microbioma después de la pérdida de peso llevan a un aumento de peso recidivante exagerado. A, esquema de la intervención antibiótica durante el ciclo de pérdida-recuperación de peso. B, C, Beta-diversidad de la microbiota fecal (B) y curva de peso (C) a lo largo del tiempo en ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso sometidos a tratamiento con antibióticos. Las barras de colores debajo de la curva de peso representan la duración de los tratamientos indicados. D-F, contenido de grasa corporal (D), concentraciones de glucosa después de GFF (E), y cuantificación de la concentración de glucosa (F) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin tratamiento con antibióticos durante el segundo ciclo de obesidad. G, esquema del trasplante fecal a ratones sin gérmenes después de la dieta. H, PCoA de microbiota fecal en ratones receptores de FMT una semana después del trasplante fecal. I, curva de peso de ratones receptores de FMT después del trasplante fecal con o sin HFD. J, concentraciones de glucosa después de GTT en receptores de FMT una semana después del trasplante fecal. K, curva de peso de ratones a los que se le hizo seguimiento para el equilibrio de microbiota después de la dieta antes de inducir obesidad secundaria. L, disimilitud microbiana a lo largo del tiempo de los ratones de ciclo de peso y los ratones con HFD continua en comparación con referencias NC. Los resultados en B-J son representativos de 3 experimentos independientes; los resultados en K-L son de un experimento. * $p < 0,05$, n.s. no significativo.

Las FIG. 4A-F ilustran una predicción precisa de la recuperación de peso tras la dieta mediante las características de la microbiota. A, esquema del conjunto de datos 16S de ratones de idéntico peso y fenotipo metabólico, pero con diferentes antecedentes de obesidad, para la predicción del aumento de peso tras la alimentación con HFD. B,

Predicción de obesidad previa basada en datos de 16S. C, D, correlación del aumento de peso previsto frente al medido tras la alimentación de HFD basada únicamente en datos 16S (C) o en una combinación de datos 16S e información deducida sobre obesidad previa. E, Lista clasificada de OTU que contribuyen a la producción de peso basada en algoritmos. F, Lista de las 10 OTU más importantes de (E).

- 5 Las FIG. 5A-F ilustran que la modulación del microbioma mejora el aumento de peso después de la dieta. A, Esquema de los experimentos de trasplante fecal. B, Curva de peso de los ciclos de pérdida-recuperación de peso experimentados, con trasplantes fecales de ratones no obesos o en el ciclo. C, Contenido de grasa corporal de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso, con trasplantes fecales de ratones no obesos o en el ciclo, durante el segundo ciclo de obesidad. D, Esquema de puntos temporales para el análisis metabólico. E, 10 Abundancias relativas de metabolitos entre los ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso y los ratones en HFD continua antes y después de la dieta. Las líneas discontinuas indican cambios persistentes de metabolitos enriquecidos o agotados que no se recuperan con la dieta. F, Curva de peso de ratones de ciclo de peso que reciben complementos de apigenina y naringenina. Las barras de colores debajo de las curvas de peso representan la duración de los tratamientos indicados. Todos los resultados son representativos de 2 experimentos 15 independientes. * $p < 0,05$

Las FIG. 6A-B ilustran el aumento de peso recidivante mejorado después del tratamiento de la obesidad. A, Gasto energético durante 48 horas B, Aumento de peso recidivante en ratones sometidos a tres ciclos de dieta. Las barras de colores debajo de las curvas de peso representan la duración de los tratamientos indicados. N = 10 por grupo (e, n = 4). Los experimentos se repitieron por lo menos dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por ANOVA. 20

Las FIG. 7A-I ilustran las alteraciones persistentes del microbioma después de la pérdida de peso. A, Esquema de tiempos de muestreo para análisis de microbiota. B-F, análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias UniFrac no ponderadas de composición de microbiota en los puntos de tiempo indicados. I, Mapa de calor OTU de ratones y referencias de ciclo de peso antes (semana 0), durante (semana 4) y después de la obesidad (semana 7). 25 H, I, Análisis de componentes principales (PCA) (H) y mapa de calor (I) de las rutas bacterianas KEGG en ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso y referencias. N como se indica (H, n = 10). Los experimentos se repitieron por lo menos dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ por ANOVA.

Las FIG. 8A-B ilustran alteraciones del microbioma tras la dieta que llevan al empeoramiento de la recuperación del peso. A, Curva de peso de ratones controlados para el equilibrio de microbiota después de hacer dieta antes de la inducción de obesidad secundaria. B, Disimilitud microbiana en el tiempo entre ratones cycHFD y HFD en comparación con las referencias NC. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n. s. no significativo por ANOVA. 30

FIG. 9A-K. La modulación del microbioma mejora la recuperación de peso después de la dieta. A-E, Esquema (A), curva de peso (B), cuantificación de la cantidad de glucosa después de GTT (C), contenido de grasa corporal (D) y exploraciones de resonancia magnética representativos durante la recuperación de peso de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso sometidos a trasplante de microbiota fecal (FMT) (E). F, G Abundancias relativas (F) y mapa de calor (G) de metabolitos intestinales antes, durante y después de la obesidad. H-K, Abundancias 35 intestinales normalizadas de apigenina y naringenina antes, durante y después de la obesidad, así como 15 semanas después de una dieta satisfactoria (H, I), en ratones tratados con antibióticos (Abx), sin gérmenes (GF) y de referencia (J), y en ratones tratados con antibióticos durante la pérdida de peso. N = 5. Los experimentos se repitieron por lo menos dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por ANOVA o prueba de la U de Mann-Whitney (K). 40

FIG. 10A-N. La modulación de metabolitos mejora la recuperación de peso después de la dieta. A-F, Esquema (A), curva de peso (B), exploraciones MRI representativas (C), registro representativo del gasto de energía (D) y cuantificaciones durante la fase oscura (E) y la fase con luz (F) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin complementos de apigenina y naringenina (A/N) durante la recuperación de peso. G, Registro del gasto energético durante la recuperación de peso de los ratones que realizan ciclo con o sin tratamiento con antibióticos antes de recuperar el peso. H-M, transcrito UCP-1 de tejido adiposo pardo (BAT) (H-K) o concentraciones de proteína (L, M) en ratones en HFD o NC que reciben A/N o vehículo mediante sonda diaria durante 2 semanas (H), en ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin tratamiento con A/N durante la recuperación de peso (I) en explantes de BAT cultivados con A/N durante 24 horas, y en ratones durante la recuperación de peso después del tratamiento con antibióticos durante la pérdida de peso. N, Modelo de interacciones dieta-microbiota-gasto energético durante la dieta y la recuperación de peso. N = 5. Los experimentos se repitieron por lo menos dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ por ANOVA y Prueba de la U de Mann Whitney (I, K, M). 50 55

FIG. 11A-Q. Mediciones metabólicas durante la recuperación de peso. A, Esquema que indica el punto de tiempo de las mediciones metabólicas. B, Cuantificación de la recuperación de peso por pendiente de aumento de peso. C,

aumento de peso neto inducido durante 8 semanas de HFD en ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso y referencias continuos de HFD. D, E, Exploraciones por MRI coronal (arriba) y axial (abajo) (D), y cuantificación del contenido de grasa corporal (D). F, G, concentraciones séricas de leptina (F) y HDL (G) durante la segunda exposición a HFD de ratones sometidos a ciclos de pérdida-recuperación de peso y referencias. H, I, Cuantificación del gasto energético de la fase oscura (H) y de la fase con luz (I) tras la recuperación de peso de los ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso. I-Q, registros representativos (J, M, P, Q) y cuantificaciones (K, L, N, O) del consumo de O₂ (J-L) consumo de CO₂ (M-O), actividad física (P) e ingesta de alimentos (Q) tras la recuperación de peso de los ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n. s. no significativo por ANOVA o prueba de la *U* de Mann Whitney (B, C)

FIG. 12A-Q. A, B, El efecto del celastrol sobre la pérdida de peso en ratones alimentados continuamente con un HFD (A) y ratones con dietas alternativas (B). C-F, curva de peso (C), cuantificación de recuperación de peso por AUC (D), pendiente de recuperación de peso (E) y aumento neto de peso en HFD (F) por ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso tratados con celastrol para perder peso y referencias. G, H, Cuantificación de recuperación de peso por AUC (G), pendiente de recuperación de peso (H) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso y referencias tratados con antagonista de leptina. I-K, pendiente de aumento de peso (I), contenido de grasa corporal (J) y concentraciones de colesterol en el suero (K) de ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso que experimentan un tercer ciclo de peso y referencias. L, Esquema del punto de tiempo analizado en N-Q. M, aumento de peso durante 4 semanas de HFD. N-Q, concentraciones de colesterol en suero (N), concentraciones de glucosa después de GTT (O), cuantificación de la cantidad de glucosa (P), y cuantificación del contenido de grasa corporal (Q) en ratones de ciclo de peso durante la obesidad inicial y referencias. Los experimentos se repitieron al menos dos veces. Se muestran las medias ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ por ANOVA.

FIG. 13A-L. Recuperación de parámetros metabólicos después de la dieta. A, Esquema del punto de tiempo 'nadir' analizado. B-F Contenido de grasa corporal (B), concentraciones de colesterol en suero (C), concentraciones de glucosa después de GTT (D), cuantificación del contenido de glucosa (E), y concentraciones de insulina en el suero (F) en ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso tras volver al peso normal. G-L, Registros representativos (G, J) y cuantificaciones (H, I, K, L) del consumo de O₂ y CO₂ por ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso al volver al peso normal y referencias. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias ± SEM. n. s. no significativo por ANOVA.

FIG. 14A-L. Mediciones metabólicas después de la dieta. Registros representativas (A, D, G, J), cuantificaciones de fase oscura (B, E, H, K) y cuantificaciones de fase con luz (C, F, I, L) del gasto de energía (A-C), actividad física (D-F), ingesta de alimentos (G-I) y consumo de agua (J-L) de los ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso durante la recuperación de peso y las referencias. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias ± SEM. n. s. no significativo por ANOVA.

FIG. 15A-M. Cambios persistentes en el microbioma después de la dieta. A, Cuantificación de distancias UniFrac de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso desde el control de NC en los puntos de tiempo indicados. Los gráficos corresponden a los análisis de PCoA en las FIG. 7B-F. Análisis de B-D, PCoA y cuantificación de distancia (recuadros) de secuenciación 16S de ratones dirigida a V3/V4 antes (B), durante (C) y después (D) de obesidad inducida por la dieta y posterior pérdida de peso. E-I, ejemplos de las OTU cuya abundancia se recupera (E, F) o no (G-I) después de la dieta. J-M, análisis de PCoA (J, K), distancia UniFrac (L) y diversidad alfa (M) en el punto de tiempo 'nadir' de los ratones tras la dieta que habían recibido celastrol para acelerar la pérdida de peso. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ por ANOVA.

FIG. 16A-J. Persistentes cambios metagenómicos después de la dieta. A, mapa de calor de la abundancia de genes normalizados en la microbiota de ratones antes (0 semanas), durante (4 semanas) y después de la obesidad (7 semanas). B, C, Ejemplos de genes cuya abundancia no se recupera después de la dieta. D, PCA de módulos KEGG bacterianos a lo largo del tiempo en ratones y referencias en el ciclo de pérdida-recuperación de peso. E-J, ejemplos de rutas KEGG cuya abundancia se reduce reversiblemente (E, F), aumenta reversiblemente (G, H) o disminuye persistentemente (I, J) durante la obesidad y las dietas. Los datos son de un experimento. Se muestran las medias ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por ANOVA.

FIG. 17A-L. La microbiota tras la dieta conduce a obesidad recidivante. A, B, PCoA (A) y diversidad alfa (B) de microbiota fecal después de la dieta (punto de tiempo 'nadir' en la semana 8) de ratones con o sin tratamiento con antibióticos durante la pérdida de peso. C, Aumento de peso neto inducido por 8 semanas de HFD en ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso o control continuo de HFD con o sin tratamiento con antibióticos entre las semanas 4 y 8. D, E, concentraciones de glucosa después de GTT oral (D) y cuantificación de la concentración de glucosa después de GTT (E) durante el aumento de peso secundario (semana 12) en ratones con o sin tratamiento con antibióticos durante la pérdida de peso. F-H, PCoA de microbiota fecal de ratones anteriormente obesos y referencias en el momento de la normalización del peso inducida por la dieta (F), 15 semanas después de la

normalización del peso (G) y 21 semanas después de la normalización del peso (H). I-K, Análisis de correlación (I) y ejemplos (J, K) de taxones microbianos sometidos a normalización gradual en abundancia durante un período de 21 semanas después de la normalización del peso. L, cuantificación del aumento de peso secundario después de la normalización de la microbiota. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n. s. no significativo por ANOVA.

FIG. 18A-O. Transferencia, predicción y tratamiento de recuperación de peso por las características del microbioma. A, Esquema de la transferencia de microbiota a ratones sin gérmenes después de la dieta. Los receptores fueron alimentados con HFD o NC. B-D, PCoA de la microbiota receptora (B) y distancias relativas de UniFrac a las referencias NC (C, D) de ratones sin gérmenes una semana después del trasplante con microbiota de ratones o referencias en el ciclo de pérdida-recuperación de peso, y alimentados con NC (C) o HFD (D). E, F, Cuantificaciones de aumento de peso (E) y glucemia después de GTT (F) en receptores de microbiota sin gérmenes de ratones o referencias de ciclo de peso. G, H, Correlación del aumento de peso previsto y medido cuando la predicción se basa únicamente en antecedentes deducidos de obesidad (G) o únicamente en la secuenciación 16S (H). I-K PCoA de la microbiota fecal (I) y distancias relativas de UniFrac entre los donantes (J) y los receptores (K) dos semanas después del comienzo del FMT diario de ratones cychFD o NC a ratones sometidos a ciclos de pérdida-recuperación de peso. L-O, Cuantificación del aumento de peso secundario (L), aumento de peso neto inducido por 8 semanas de alimentación de HFD (M), concentraciones de glucosa después de GTT (N) y masa magra (O) en ratones y referencias en ciclos de pérdida-recuperación de peso con o sin FMT. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, n. s. no significativo por ANOVA o prueba de la *U* de Mann-Whitney (C, D, J, K).

FIG. 19A-I. Persistentes cambios metabólicos después de la dieta. A-H, Ejemplos de metabolitos cuya abundancia disminuye reversiblemente (A, B), aumenta reversiblemente (C, D), disminuye persistentemente (E, F) o aumenta persistentemente (G, H) durante la obesidad y las dietas. I, Esquema de las rutas biosintéticas de flavonoides que conducen a la producción y conversión de naringenina. Se indican las ID de KEGG de enzimas clave. Los genes encontrados en nuestro conjunto de datos metagenómicos se indican en verde. Los datos son de un experimento. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por ANOVA.

FIG. 20A-P. Control de microbiota de complicaciones metabólicas tras la dieta a través de flavonoides intestinales. A, Esquema que muestra los tiempos de muestreo en el experimento del ciclo de obesidad/recuperación. B, flavonoides dietéticos en NC y HFD. C-E, abundancia de flavanona 4-reductasa (C), chalcona sintasa (D) y eriodictiol (E) a lo largo del tiempo en las heces de ratones sometidos a ciclos de pérdida-recuperación de peso y referencias. F, Cuantificación de las concentraciones de flavanona 4-reductasa en el ADN fecal en relación con el ADN del anfitrión en ratones que realizan ciclo de peso al final del período de pérdida de peso, con o sin tratamiento con antibióticos durante la pérdida de peso. G, Esquema del tiempo de muestreo tras la recuperación de peso. H, I, Abundancia de apigenina (H) y naringenina (I) en las heces de ratones sometidos a recuperación de peso después de la dieta y referencias. J-N, Concentraciones de flavonoides (J, K), PCoA de microbiota fecal (L), Aumento de peso neto inducido por 8 semanas de HFD (M), y cuantificación de recuperación de peso por AUC (N) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso enriquecido con apigenina y naringenina durante la recuperación de peso. O, P, Curva de peso (O) y cuantificación de aumento de peso (P) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin complementos de naringenina. Los experimentos se repitieron dos veces. Se muestran las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por ANOVA o prueba de la *U* de Mann-Whitney (F, H, I).

FIG. 21A-L. Mediciones metabólicas en ratones tratados con flavonoides. Registros representativos (A, D, G, J), cuantificaciones en la fase oscura (B, E, H, K) y cuantificaciones en la fase con luz (C, F, I, L) del consumo de O_2 (A-C), consumo de CO_2 (D-F), relación de intercambio respiratorio (G-I) y actividad física (J-L) de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin complementos de apigenina y naringenina (A/N) durante la recuperación de peso. Los datos son de un experimento. Se muestran las medias \pm SEM. ** $p < 0,01$ por ANOVA.

FIG. 22A-L. Mediciones metabólicas en ratones tratados con flavonoides y antibióticos. Registros representativos (A, D), cuantificaciones en la fase oscura (B, E) y cuantificaciones en fase con luz (C, F) de alimentos (A-C) y consumo de agua (D-F), de ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin complementos de apigenina y naringenina (A/N) durante la recuperación de peso. G, Esquema que indica el tiempo de las mediciones metabólicas durante la fase de recuperación de peso. H, I, Cuantificaciones del gasto de energía en ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin tratamiento antibiótico durante la pérdida de peso. J-L, Registro representativo (J) y cuantificaciones (K, L) del consumo de O_2 por ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin tratamiento con antibióticos (Abx) durante la pérdida de peso. Los datos son de un experimento. Se muestran las medias \pm SEM. ** $p < 0,01$ por ANOVA.

FIG. 23A-L. Mediciones metabólicas en ratones tratados con antibióticos. Registros representativas (A, D, G, F), cuantificaciones de fase oscura (B, E, H, K) y cuantificaciones de fase ligera (C, F, I, L) del consumo de CO_2 (A-C), relación de intercambio respiratorio (D-F), actividad física (G-I) e ingesta de alimentos (J-L) por ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso con o sin tratamiento con antibióticos (Abx) durante la pérdida de peso. Los datos son de un experimento. Se muestran las medias \pm SEM. ** $p < 0,01$ por ANOVA.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente descripción, en algunas de sus realizaciones, se refiere a métodos de mantener un peso corporal objetivo y al análisis de la probabilidad de recuperación de peso después de una dieta.

5 Antes de explicar al menos una realización de la descripción en detalle, debe entenderse que la descripción en detalle no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras.

10 La obesidad representa una nueva carga global, con esfuerzos significativos dedicados a la reducción de peso. Sin embargo, la mayoría de las personas que hacen dieta no logran mantener una reducción de peso a lo largo del tiempo, y en cambio experimentan una recuperación excesiva de peso. Los mecanismos que conducen a la obesidad recidivante posterior a la dieta siguen siendo difíciles de alcanzar.

15 Los presentes inventores ahora han descubierto una característica similar a la memoria del microbioma intestinal que persiste después de dieta con éxito de ratones obesos y conduce a una tendencia para la recuperación exagerada de peso y a alteraciones metabólicas tras el reencuentro de las condiciones que favorecen la obesidad. Esta memoria microbiómica se caracteriza por una característica multiómica microbiana de larga duración y es capaz de transmitir el fenotipo que favorece la obesidad.

20 Al reducir la presente descripción a la práctica, los presentes inventores desarrollaron un algoritmo de aprendizaje automático personalizado que permite la predicción basada en microbioma de las recaídas en el aumento de peso en ratones (Figs. 4A-F), y demostraron que el trasplante fecal y la intervención "posbiótica" con los flavonoides apigenina y naringenina puede evitar el aumento excesivo de peso secundario (Fig. 5A-F).

En base a los resultados descritos anteriormente, los presentes inventores proponen dirigirse al microbioma para diagnosticar y tratar la obesidad recidivante inducida por la dieta en seres humanos.

25 Los presentes inventores han descubierto, además, un posible mecanismo por el cual los flavonoides evitan el aumento de peso secundario. Específicamente, los presentes inventores han descubierto que los flavonoides apigenina y naringenina (así como el tratamiento con antibióticos) aumentan la expresión del factor termógeno que desacopla la proteína-1 (UCP-1). Por lo tanto, los presentes inventores proponen que una dieta rica en grasas (HFD) favorece el crecimiento de bacterias metabolizantes de flavonoides, que a su vez disminuyen la cantidad de flavonoides biodisponibles, regulando negativamente el gasto de energía impulsado por UCP-1 y favoreciendo el aumento de peso recidivante. Por consiguiente, los presentes inventores contemplan agentes distintos de los flavonoides mencionados anteriormente que aumentan la expresión de UCP-1 para evitar el aumento de peso secundario.

35 Por lo tanto, según un primer aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de análisis de la probabilidad de recuperación de peso en un sujeto que ha alcanzado un peso objetivo poniendo en práctica un programa de pérdida de peso, comprendiendo el método la determinación de una cantidad o presencia de al menos un microbio y/o producto del mismo en el microbioma intestinal del sujeto, en donde la cantidad de al menos un microbio se altera durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativo de un sujeto obeso y además en donde la cantidad del al menos un microbio se mantiene a ese nivel siguiendo el programa de pérdida de peso, en donde la cantidad o presencia del al menos un microbio o producto del mismo sirve para predecir la recuperación de peso.

40 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un sujeto mamífero (p. ej., ratón, vaca, perro, gato, caballo, mono, ser humano), preferiblemente ser humano.

Según este aspecto de la presente invención, el método se utiliza para predecir la probabilidad de recaída en el aumento de peso (obesidad) siguiendo un programa de pérdida de peso.

45 Por lo tanto, el sujeto de la presente descripción ha perdido al menos 0,5 kg de peso, 1 kg de peso, 1,5 kg de peso, 2 kg de peso, de 2,5 kg de peso, 3 kg de peso, 3,5 kg de peso, 4 kg de peso, 4.5 kg de peso, 5 kg de peso, 5,5 kg de peso, 6 kg de peso, 6,5 kg de peso, 7 kg de peso, 7,5 kg de peso, 8 kg de peso, 8,5 kg de peso, 9 kg de peso, 9,5 kg de peso, 10 kg de peso, 10,5 kg de peso, 11 kg de peso, 11,5 kg de peso, 12 kg de peso, 12,5 kg de peso, 13 kg de peso, 13,5 kg de peso, 14 kg de peso, 14,5 kg de peso, 15 kg de peso, 15,5 kg de peso, 16 kg de peso, 16,5 kg de peso, 17 kg de peso, 17,5 kg de peso, 18 kg de peso, 18,5 kg de peso, 19 kg de peso, 19,5 kg de peso o incluso 20 kg de peso.

Según una realización, el programa de pérdida de peso tiene efecto durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas o 10 semanas. En una realización, el programa de pérdida de peso se realiza durante 1 mes - 1 año, o 1 mes - 6 meses. Preferiblemente, el programa de pérdida de peso no se realiza durante menos de 1 semana, 2 semanas o 3 semanas.

El peso objetivo del sujeto puede ser un peso en donde el índice de masa corporal del mismo está comprendido entre 18,5 y 24,9. Según otra realización, el peso objetivo es el peso obeso del sujeto menos 1 kg, menos 2 kg, menos 3 kg, menos 4 kg, menos 5 kg, menos 6 kg, menos 7 kg, menos 8 kg, menos 9 kg, menos 10 kg o más.

5 El programa de pérdida de peso puede comprender un programa dietético depara pérdida de peso y/o un programa de ejercicios para pérdida de peso.

Preferiblemente, la pérdida de peso del sujeto es el resultado de un cambio en la dieta y/o régimen de ejercicio y no una consecuencia de la enfermedad.

10 Ejemplos no restrictivos de programas dietéticos de pérdida de peso incluyen pero no se limitan a una dieta South Beach, una dieta Dukin, una dieta Stillman, una dieta Atkins, una dieta sin gluten, una dieta cetógena, una dieta baja en residuos, una dieta líquida, una dieta vegetariana, una dieta baja en calorías (p. ej., Weight Watches, Jenny Craig, Nutrisystems), una dieta baja en grasas, una dieta baja en carbohidratos, una dieta baja en proteínas, una dieta baja en glutamato monosódico (MSG), una dieta de desintoxicación, una dieta de eliminación, una dieta específica de carbohidratos, una dieta para diabéticos, un enfoque dietético para detener la dieta para la hipertensión (DASH), una dieta de la mejor apuesta, una dieta orgánica y sus combinaciones.

15 Una vez que el sujeto ha alcanzado su peso ideal, puede reanudar el mismo régimen de alimentación/ejercicio que él tenía antes del programa de pérdida de peso. Alternativamente, el sujeto puede comenzar un nuevo régimen de alimentación/ejercicio que apunta a mantener el peso. Alternativamente, el sujeto puede continuar el mismo programa de pérdida de peso, pero no adherirse al programa tan estrictamente como cuando utilizó el programa para la pérdida de peso.

20 Como se ha mencionado, el método de este aspecto de la presente descripción comprende la determinación de una cantidad o presencia de al menos un microbio y/o producto del mismo en el microbioma intestinal del sujeto. Si bien se puede medir la cantidad de cualquier número de microbios o productos de los mismos, se apreciará que los microbios que se usan en la predicción (es decir, la característica relevante) son generalmente aquellos que cumplen dos criterios:

- 25 (i) su cantidad se modifica durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso; y
- (ii) el microbio se mantiene en la cantidad representativa del sujeto obeso después del programa de pérdida de peso (p. ej., no cambia más del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10% en cualquier dirección).

30 Según una realización concreta, la cantidad de microbios se incrementa durante el período previo de aumento de peso del sujeto. El incremento puede ser al menos 10% mayor, 20% mayor, 30% mayor, 40% mayor, 50% mayor, 60% mayor, 70% mayor, 80% mayor, 90% mayor o incluso 100% mayor que la cantidad antes del período de aumento de peso.

35 Según otra realización, la cantidad de microbios disminuye durante el período previo de aumento de peso del sujeto. La disminución puede ser al menos un 10% menor, un 20% menor, un 30% menor, un 40% menor, un 50% menor, un 60% menor, un 70% menor, un 80% menor, un 90% menor o incluso 100% menor que la cantidad antes del período de aumento de peso.

40 En otras realizaciones, el microbio que se utiliza en la predicción (es decir, el que se utiliza en la característica microbioma) es el que está presente de manera diferencial (por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 7%, 80%, 90% o más) en el microbioma intestinal del sujeto en comparación con el microbioma intestinal de una referencia no obesa que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso.

Como se emplea en la presente memoria, el término "microbioma" se refiere a la totalidad de los microbios (bacterias, hongos, protistas), a sus elementos genéticos (genomas) en un medio definido.

Según una realización concreta, el microbioma es un microbioma del intestino (es decir microbioma intestinal).

45 En algunas realizaciones, una muestra microbiota se recoge por cualquier medio que permita la recuperación de los microbios y sin alterar a las cantidades relativas de microbios o componentes o productos de los mismos de un microbioma. En algunas realizaciones, la muestra de microbiota es una muestra fecal. En otras realizaciones, la muestra microbiota se recupera directamente del intestino.

Según una realización, la muestra de microbioma (p. ej., muestra fecal) se congela y/o liofiliza antes del análisis. Según otra realización, la muestra puede someterse a métodos de extracción en fase sólida.

50 En algunas realizaciones, se miden la presencia, cantidad y/o actividad de entre 5 y 100 tipos de microbios (p. ej., bacterias). En algunas realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de entre 50 y 500 tipos de microbios (p. ej., bacterias). En algunas realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de

sustancialmente todas las especies/clases/familias de bacterias dentro del microbioma. En aún más realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de sustancialmente todas las bacterias dentro del microbioma.

En algunas realizaciones, se miden sólo los microbios que cumplen los dos criterios establecidos en la presente memoria anteriormente.

- 5 En otras realizaciones más, la mayoría de los microbios que se miden cumplen los dos criterios establecidos en la presente memoria anteriormente.

En otras realizaciones más, se miden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o diez clasificaciones de microbios que se describen en la FIG. 4F del apartado de Ejemplos.

En otras realizaciones más, la mayoría de los microbios que se miden se describen en la FIG. 4F.

- 10 La medición de una cantidad o presencia de un microbio puede realizarse analizando la presencia de un componente microbiano o un subproducto microbiano. Así, por ejemplo, la cantidad o la presencia de un microbio puede efectuarse midiendo la cantidad de una secuencia de ADN. En algunas realizaciones, la cantidad o la presencia de un microbio puede efectuarse midiendo secuencias del gen 16S de ARNr o secuencias del gen 18S de ARNr. En otras realizaciones, la cantidad o la presencia de un microbio puede efectuarse midiendo transcripciones de ARN. En otras realizaciones más, la cantidad o la presencia de un microbio puede efectuarse midiendo proteínas. En otras realizaciones más, la cantidad o la presencia de un microbio puede efectuarse midiendo los metabolitos.

Cuantificación de contenidos microbianos:

- 20 Se apreciará que la determinación de la abundancia de microbios puede verse afectada al tener en cuenta cualquier característica del microbioma. Por lo tanto, la abundancia de microbios puede verse afectada teniendo en cuenta la abundancia a diferentes niveles filogenéticos; a nivel de abundancia de genes; abundancia de genes de la vía metabólica; identificación de cepas de subespecies; SNP e inserciones y eliminaciones en regiones bacterianas específicas; tasas de crecimiento de bacterias, la diversidad de los microbios del microbioma, como se describe más adelante en la presente memoria.

- 25 En algunas realizaciones, la determinación de una cantidad o serie de cantidades de uno o más tipos de microbios o componentes o productos del mismo comprende la determinación de una cantidad o serie de cantidades de una o más secuencias de ADN. En algunas realizaciones, una o más secuencias de ADN comprenden cualquier secuencia de ADN que pueda usarse para diferenciar entre diferentes tipos de microbios. En algunas realizaciones, una o más secuencias de ADN comprenden secuencias del gen 16S de ARNr. En algunas realizaciones, una o más secuencias de ADN comprenden secuencias del gen 18S de ARNr. En algunas realizaciones, se amplifican 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 20, 25, 50, 100, 1.000, 5.000 o más secuencias.

- 35 Las secuencias de genes de ARNr 16S y 18S codifican componentes de subunidades pequeñas de ribosomas procariotas y eucariotas, respectivamente. Los genes de ARNr son particularmente útiles para distinguir entre tipos de microbios porque, aunque las secuencias de estos genes difieren entre especies microbianas, los genes tienen regiones muy conservadas para la unión de cebadores. Esta especificidad entre las regiones de unión de cebadores conservadas permite que los genes de ARNr de muchos tipos diferentes de microbios se amplifiquen con un único serie de cebadores y luego se distinguen por secuencias amplificadas.

- 40 En algunas realizaciones, en una muestra microbiota (p. ej., muestra fecal) se analiza directamente una cantidad o serie de cantidades de una o más secuencias de ADN. En algunas realizaciones, el ADN se aísla de una muestra de microbiota y en el ADN aislado se analiza una cantidad o serie de cantidades de una o más secuencias de ADN. Los métodos para aislar el ADN microbiano son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, entre otros, la extracción con fenol-cloroformo y una amplia variedad de equipos disponibles en el mercado, incluido el QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, California).

- 45 En algunas realizaciones, una cantidad o serie de cantidades de una o más secuencias de ADN se determina amplificando secuencias de ADN utilizando PCR (p. ej., PCR convencional, semicuantitativa o PCR cuantitativa). En algunas realizaciones, se determina una cantidad o serie de cantidades de una o más secuencias de ADN amplificando secuencias de ADN usando PCR cuantitativa. Estos y otros procedimientos básicos de amplificación de ADN son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en Ausebel *et al.* (Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: Nueva York).

- 50 En algunas realizaciones, las secuencias de ADN se amplificaron usando cebadores específicos para una o más secuencias que diferencian tipos microbianas individuales de otros tipos microbianos diferentes. En algunas realizaciones, las secuencias del gen 16S de ARNr o uno de sus fragmentos se amplifican usando cebadores específicos para secuencias del gen 16S de ARNr. En algunas realizaciones, las secuencias de 18S de ADN se amplifican usando cebadores específicos para secuencias de 18S de ADN.

- En algunas realizaciones, una cantidad o serie de cantidades de una o más secuencias de genes 16S de ARNr se determina utilizando tecnología PhyloChip. El uso de phylochips es bien conocido en la técnica y se describe en Hazen *et al.* ("Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria." *Science*, 330, 204-208, 2010). En resumen, las secuencias de genes 16S de ARNr se amplifican y se marcan en el ADN extraído de una muestra de microbiota. El ADN amplificado se hibrida luego con una matriz que contiene sondas para genes microbianos 16S de ARNr. El nivel de unión a cada sonda se cuantifica proporcionando una cantidad de muestra de tipo microbiano correspondiente a la secuencia del gen 16S de ARNr sondeado. En algunas realizaciones, el análisis phylochip lo realiza un proveedor comercial. Los ejemplos incluyen, entre otros a, Second Genome Inc. (San Francisco, California).
- 5
- 10 En algunas realizaciones, la determinación de una cantidad o serie de cantidades de uno o más tipos de microbios comprende determinar una cantidad o serie de cantidades de uno o más moléculas de ARN microbiano (p. ej., transcripciones). Los métodos para cuantificar niveles de transcripciones de ARN son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, análisis Northern, PCR de transcriptasa inversa semicuantitativa, PCR de transcriptasa inversa cuantitativa y análisis de chips.
- 15 En algunas realizaciones, la determinación de una cantidad o serie de cantidades de uno o más tipos de microbios comprende determinar una cantidad o serie de cantidades de uno o más polipéptidos microbianos. Los métodos para cuantificar las cantidades de polipéptidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, análisis Western y espectrometría de masas.
- Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, así como (o en lugar de) analizar la cantidad de microbios, la presente descripción también contempla el análisis de la cantidad de productos microbianos.
- 20 Los ejemplos de productos microbianos incluyen, entre otros a ARNm, polipéptidos, carbohidratos y metabolitos.
- En algunas realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de los metabolitos de al menos diez tipos de microbios. En otras realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de metabolitos de entre 5 y 100 tipos de microbios. En algunas realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de metabolitos de entre 100 y 1.000 o más tipos de microbios. En otras realizaciones, se analiza la presencia, cantidad y/o actividad de metabolitos de todos los tipos de bacterias dentro del microbioma. En otras realizaciones, se mide la presencia, cantidad y/o actividad de los metabolitos de todos los microbios dentro del microbioma.
- 25
- En algunas realizaciones, sólo se miden metabolitos que cumplen los dos criterios siguientes.
- (i) su cantidad se modifica durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso; y
- 30 (ii) el metabolito se mantiene en la cantidad representativa del sujeto obeso después del programa de pérdida de peso (p. ej., no cambia más del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10% en cualquier dirección).
- En otras realizaciones más, la mayoría de los metabolitos que se miden cumplen los dos criterios establecidos en la presente memoria anteriormente.
- 35 Como se emplea en la presente memoria, un "metabolito" es un producto intermedio o de metabolismo. El término metabolito generalmente está restringido a moléculas pequeñas y no incluye compuestos poliméricos como el ADN o las proteínas. Un metabolito puede servir como sustrato para una enzima de una ruta metabólica, un intermedio de dicha ruta o el producto obtenido por la ruta metabólica.
- Según una realización concreta, el metabolito es el que altera la composición o función del microbioma.
- 40 En realizaciones preferidas, los metabolitos incluyen, entre otros a azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, hormonas, vitaminas, oligopéptidos (menos de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud), así como fragmentos iónicos de los mismos. Las células también se pueden lisar para medir los productos celulares presentes en la célula. En particular, los metabolitos tienen menos de aproximadamente 3.000 Daltons de peso molecular, y más particularmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 3.000 Daltons.
- 45 El metabolito puede ser un metabolito primario (es decir, esencial para el crecimiento del microbio) o un metabolito secundario (el que no desempeña una función en el crecimiento, desarrollo o reproducción, y se forma durante el final o cerca de la fase estacionaria de crecimiento).
- Ejemplos representativos de rutas metabólicas en las que están involucrados metabolitos incluyen, sin limitación, ciclo de ácido cítrico, cadena respiratoria, fotosíntesis, fotorrespiración, glucólisis, gluconeogénesis, ruta de hexosa monofosfato, ruta oxidativa de pentosa fosfato, producción y β -oxidación de ácidos grasos, ciclo de la urea, rutas de biosíntesis de aminoácidos, rutas de degradación de proteínas tales como degradación proteasómica, rutas de degradación de aminoácidos, biosíntesis o degradación de: lípidos, policétidos (incluidos, p. ej., flavonoides e
- 50

isoflavonoides), isoprenoides (incluidos, p. ej., terpenos, esteroides, esteroides, carotenoides, xantofilas), carbohidratos, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, bencenoides, indoles, compuestos de indol-azufre, porfirinas, antocianos, hormonas, vitaminas, cofactores tales como grupos prostéticos o portadores de electrones, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y moléculas relacionadas tales como ARNt, microARN (miARN) o ARNm.

Ejemplos representativos de metabolitos que pueden analizarse incluyen, entre otros a, componentes de ácidos biliares tales como ursodesoxicolato, glicocolato, fenilacetato y heptanoato y flavonoides tales como apigenina y naringenina.

En algunas realizaciones, las cantidades de metabolitos se determinan por espectrometría de masas, como se describe con detalle en la presente memoria a continuación. En algunas realizaciones, las cantidades de metabolitos se determinan por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, como se describe más adelante en la presente memoria. En algunas realizaciones, las cantidades de metabolitos se determinan mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En algunas realizaciones, las cantidades de metabolitos se determinan por colorimetría. En algunas realizaciones, las cantidades de metabolitos se determinan por espectrofotometría, como se describe más adelante en la presente memoria.

Quantificación de las cantidades de metabolitos:

En una realización, los metabolitos se identifican utilizando un método de separación física.

La expresión "método de separación física", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier método conocido por los expertos en la técnica suficiente para producir un perfil de cambios y diferencias en moléculas pequeñas producidas en hSLC, en contacto con un compuesto químico tóxico, teratógeno o de prueba. En una realización preferida, los métodos de separación física permiten la detección de metabolitos celulares que incluyen, entre otros a, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, hormonas, vitaminas y oligopéptidos, así como fragmentos iónicos de los mismos y compuestos de bajo peso molecular (preferiblemente con un peso molecular inferior a 3.000 Daltons, y más concretamente entre 50 y 3.000 Daltons). Por ejemplo, se puede usar espectrometría de masas. En realizaciones concretas, este análisis se lleva a cabo por cromatografía líquida/espectrometría de masas en tiempo de vuelo con ionización por electroatomización (LC/ESI-TOF-MS), sin embargo, debe entenderse que los metabolitos como se expone en la presente memoria pueden detectarse utilizando métodos alternativos de espectrometría u otros métodos conocidos en la técnica para analizar estos tipos de compuestos en este intervalo de tamaño.

Algunos metabolitos pueden ser identificados por, por ejemplo, análisis de expresión génica, incluidos PCR en tiempo real, RT-PCR, análisis Northern e hibridación *in situ*.

Además, los biomarcadores pueden ser identificados usando espectrometría de masas tal como MALDI/TOF (tiempo de vuelo), SELDI/TOF, espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC-MS), espectrometría de cromatografía de gases-masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (HPLC-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas en tandem (p. ej., MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS, etc.), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) o espectrometría de movilidad de iones (p. ej., GC-IMS, IMS-MS, LC-IMS, LC-IMS-MS, etc.).

Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica y se han utilizado para cuantificar y/o identificar biomoléculas, tales como proteínas y otros metabolitos celulares (véase, p. ej., Li *et al.*, 2000; Rowley *et al.*, 2000; y Kuster y Mann, 1998).

En algunas realizaciones, se utiliza un espectrofotómetro de iones en fase gas. En otras realizaciones, se usa espectrometría de masas por desorción/ionización por láser para identificar metabolitos. La espectrometría de masas por desorción/ionización láser moderna ("LDI-MS") se puede poner en práctica en dos variaciones principales: la espectrometría de masas por desorción/ionización asistida por matriz ("MALDI") y la desorción/ionización por láser con superficie mejorada ("SELDI").

En MALDI, el metabolito se mezcla con una solución que contiene una matriz, y una gota de líquido se coloca en la superficie de un sustrato. La solución de la matriz luego cristaliza junto con los biomarcadores. El sustrato se inserta en el espectrómetro de masas. La energía del láser se dirige a la superficie del sustrato donde desabsorbe e ioniza las proteínas sin fragmentarlas significativamente. Sin embargo, MALDI tiene limitaciones como herramienta analítica. No proporciona medios para fraccionar el fluido biológico, y el material de la matriz puede interferir con la detección, especialmente para analitos de bajo peso molecular.

En SELDI, la superficie del sustrato se modifica para que sea un participante activo en el proceso de desorción. En una variante, la superficie se modifica con reactivos adsorbentes y/o de captura que se unen selectivamente al biomarcador de interés. En otra variante, la superficie se modifica con moléculas que absorben energía que no se desabsorben cuando impactan con el láser. En otra variante, la superficie se modifica con moléculas que se unen al

biomarcador de interés y que contienen un enlace fotolítico que se rompe tras la aplicación del láser. En cada uno de estos métodos, el agente modificador generalmente se localiza en un lugar específico en la superficie del sustrato donde se aplica la muestra. Los dos métodos se pueden combinar, por ejemplo, utilizando una superficie de afinidad SELDI para capturar un analito (p. ej. un biomarcador) y añadiendo líquido que contiene la matriz al analito capturado para proporcionar el material que absorbe energía.

Para más información respecto a los espectrómetros de masas, véase, p. ej., *Principles of Instrumental Analysis*, 3ª edición, Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; y *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4ª ed. vol. 15 (John Wiley & Sons, Nueva York, 1995), págs. 1071-1094.

En algunas realizaciones, los datos de espectrometría de masas se representan como un cromatograma de masas. Un "cromatograma de masas" es una representación de datos de espectrometría de masas como un cromatograma, donde el eje de las x representa el tiempo y el eje de las y representa la intensidad de la señal. En un aspecto, el cromatograma de masas es un cromatograma de corriente iónica total (TIC). En otro aspecto, el cromatograma de masas es un cromatograma de base punta. En otras realizaciones, el cromatograma de masas es un cromatograma de control de iones (SIM) seleccionado. En otra realización más, el cromatograma de masas es un cromatograma de control de reacción seleccionado (SRM). En una realización, el cromatograma de masas es un cromatograma de iones extraídos (EIC).

En un EIC, una sola función se controla a lo largo de toda la serie. La intensidad total o la intensidad de base punta dentro de un intervalo de tolerancia de masa alrededor de una relación masa/carga de un analito concreto se representa en cada punto del análisis. El tamaño del intervalo de tolerancia de masa depende generalmente de la precisión de la masa y la resolución de la masa del instrumento que recopila los datos. Como se emplea en la presente memoria, el término "característica" se refiere a un único metabolito pequeño o a un fragmento de un metabolito. En algunas realizaciones, el término característica también puede incluir ruido tras una investigación adicional.

La detección de la presencia de un metabolito generalmente implicará la detección de la intensidad de la señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y el carácter de un biomarcador unido al sustrato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la intensidad de la señal de los valores máximos de los espectros de una primera muestra y una segunda muestra puede compararse (p. ej., visualmente, mediante análisis informático, etc.) para determinar las cantidades relativas de determinados metabolitos. Los programas informáticos como el programa Biomarker Wizard (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, California) se pueden usar para ayudar a analizar los espectros de masas. Los espectrómetros de masas y sus técnicas son bien conocidos.

Un experto en la técnica entiende que cualquiera de los componentes de un espectrómetro de masas, p. ej., fuente de desorción, analizador de masas, detector, etc., y preparaciones de muestras variadas se pueden combinar con otros componentes adecuados o preparaciones descritas en la presente memoria, o a los conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una muestra de referencia puede contener átomos pesados, p. ej., ^{13}C , permitiendo así que la muestra de prueba se mezcle con la muestra de referencia conocida en la misma serie de espectrometría de masas. Se incluye un buen marcaje isotópico estable.

En una realización, se usa un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con desorción por láser (TOF). En la espectrometría de masas con desorción por láser, se introduce un sustrato con un marcador unido en un sistema de entrada. El marcador se desabsorbe e ioniza en la fase gaseosa con láser desde la fuente de ionización. Los iones generados son recolectados por un conjunto de iones ópticos, y luego en un analizador de masa de tiempo de vuelo, los iones se aceleran a través de un campo corto de alto voltaje y se dejan desviar a una cámara de alto vacío. En el extremo más alejado de la cámara de alto vacío, los iones acelerados golpean una superficie sensible del detector en un momento diferente. Dado que el tiempo de vuelo es una función de la masa de los iones, el tiempo transcurrido entre la formación de iones y el impacto del detector de iones se puede utilizar para identificar la presencia o ausencia de moléculas de relación específica de masa a carga.

En una realización, los niveles de metabolitos se detectan por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los métodos para detectar metabolitos también incluyen el uso de resonancia de plasmón superficial (SPR). La tecnología de biodetección SPR se ha combinado con la espectrometría de masas MALDI-TOF para la desorción e identificación de metabolitos.

Los datos para el análisis estadístico se pueden extraer de cromatogramas (espectros de señales de masa) usando programas informáticos para métodos estadísticos conocidos en la técnica. "Estadística" es la ciencia de hacer un uso efectivo de los datos numéricos relacionados con grupos de individuos o experimentos. Los métodos para el análisis estadístico son bien conocidos en la técnica.

En una realización se utiliza un ordenador para el análisis estadístico.

- En una realización, el programa informático Agilent MassProfiler o MassProfilerProfessional se usa para análisis estadístico. En otra realización, el programa informático Qual del programa informático Agilent MassHunter se usa para análisis estadístico. En otras realizaciones, se pueden usar métodos de análisis estadísticos alternativos. Dichos otros métodos estadísticos incluyen la prueba de análisis de variancia (ANOVA), la prueba de la χ^2 al cuadrado, la prueba de correlación, la prueba de análisis factorial, la prueba U de Mann-Whitney, la derivación ponderada cuadrática media (MSWD), coeficiente de correlación momento-producto de Pearson, análisis de regresión, coeficiente de correlación de intervalo de Spearman, la prueba de la T de Student, la prueba de la T de Welch, la prueba de Tukey y análisis de series temporales.
- En diferentes realizaciones, las señales de la espectrometría de masas pueden transformarse de diferentes maneras para mejorar el rendimiento del método. Las señales individuales o los resúmenes de las distribuciones de señales (como la media, la mediana o la variancia) pueden transformarse de este modo. Las posibles transformaciones incluyen tomar el logaritmo, tomar algo de potencia positiva o negativa, por ejemplo, la raíz cuadrada o inversa, o tomar el arco seno (Myers, Classical and Modern Regression with Applications, 2ª edición, Duxbury Press, 1990).
- En una realización, el método se lleva a cabo analizando los microbios del microbioma del sujeto y comparando su composición microbiana con la composición microbiana de un microbioma de un sujeto no obeso que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso. Cuando los dos microbiomas tienen una característica similar estadísticamente significativa, entonces la probabilidad de aumentar de peso se reduce en comparación con un sujeto que tiene un microbioma que no es estadísticamente significativamente similar al del sujeto no obeso que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso.
- En otra realización, el método se lleva a cabo analizando los metabolitos del metaboloma del sujeto y comparando su composición de metabolitos con la composición de metabolitos de un metaboloma de un sujeto no obeso que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso. Cuando los dos metabolomas tienen una característica similar estadísticamente significativa, la probabilidad de aumentar de peso se reduce en comparación con un sujeto que tiene un metaboloma que estadísticamente no es significativamente similar al del sujeto no obeso que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso.
- Las presentes realizaciones abarcan el reconocimiento de que se puede confiar en las características microbianas como indicador de la composición y/o actividad del microbioma. Las características microbianas comprenden puntos de datos que son indicadores de la composición y/o actividad del microbioma. Por lo tanto, los cambios en los microbiomas se pueden detectar y/o analizar mediante la detección de una o más características de las características microbianas.
- En algunas realizaciones, una característica microbiana incluye información relacionada con la cantidad absoluta de uno o más tipos de microbios, y/o productos de los mismos. En algunas realizaciones, una característica microbiana incluye información relacionada con cantidades relativas de cinco, diez, veinte, cincuenta, cien o más tipos de microbios y/o productos de los mismos.
- En otras realizaciones, la característica microbiana del microbioma intestinal comprende una diversidad microbiana.
- En otras realizaciones, la característica microbiana del microbioma intestinal comprende la característica del metabolito.
- En otras realizaciones, la característica microbiana del microbioma intestinal comprende una característica bacteriana.
- Preferiblemente, la característica comprende al menos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300 microbios o productos de los mismos que cumplen los dos criterios expuestos en la presente memoria anteriormente.
- Según una realización, dos características de microbioma pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando comprenden al menos 50% de los mismos microbios, al menos 60% de los mismos microbios, al menos 70% de los mismos microbios, al menos 80% de los mismos microbios, al menos 90% de los mismos microbios, al menos 91% de los mismos microbios, al menos 92% de los mismos microbios, al menos 93% de los mismos microbios, al menos 94% de los mismos microbios, al menos el 95% de los mismos microbios, al menos el 96% de los mismos microbios, al menos el 97% de los mismos microbios, al menos el 98% de los mismos microbios, al menos el 99% de los mismos microbios o el 100% de los mismos microbios.
- Además, o alternativamente, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la cantidad (p. ej., incidencia) en el microbioma de al menos un microbio de interés es idéntica. Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 10% de sus microbios es idéntica. Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 20% de sus microbios es idéntica.

Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 30% de sus microbios es idéntica. Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 40% de sus microbios es idéntica. Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 50% de sus microbios es idéntica.

Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 60% de sus microbios es idéntica. Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 70% de sus microbios es idéntica. Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos el 80% de sus microbios es idéntica.

Según otra realización, los microbiomas pueden tener una característica similar estadísticamente significativa cuando la relación relativa en el microbioma de al menos 90% de sus microbios es idéntica. Por lo tanto, el porcentaje fraccionario de microbios (p. ej., cantidad relativa, relación, distribución, frecuencia, porcentaje, etc.) del total puede ser estadísticamente similar.

Según otra realización, con el fin de clasificar un microbio como perteneciente a un género, familia, orden, clase o tipo determinado, debe comprender al menos 90% de homología de secuencia, al menos 91% de homología de secuencia, al menos el 92% homología de secuencia, al menos 93% de homología de secuencia, al menos 94% de homología de secuencia, al menos 95% de homología de secuencia, al menos 96% de homología de secuencia, al menos 97% de homología de secuencia, al menos 98% de homología de secuencia, al menos 99% de secuencia homología con un microbio de referencia que se sabe que pertenece al género determinado. Según una realización determinada, la homología de secuencia es al menos del 95%.

Según otra realización, con el fin de clasificar un microbio como pertenecientes a una especie determinada, debe comprender al menos 90% de homología de secuencia, al menos 91% de homología de secuencia, al menos 92% de homología de secuencia, al menos 93% de homología de secuencia, al menos 94% de homología de secuencia, al menos 95% de homología de secuencia, al menos 96% de homología de secuencia, al menos 97% de homología de secuencia, al menos 98% de homología de secuencia, al menos 99% de homología de secuencia con un microbio de referencia que se sabe que pertenece a una especie determinada. Según una realización particular, la homología de secuencia es al menos 97%.

Al determinar si un ácido nucleico o proteína es sustancialmente homólogo o comparte un cierto porcentaje de identidad de secuencia con una secuencia de la descripción, la similitud de secuencia puede definirse mediante algoritmos convencionales, que generalmente permiten la introducción de un pequeño número de espacios con objeto de conseguir el mejor ajuste. En particular, el "porcentaje de identidad" de dos polipéptidos o dos secuencias de ácido nucleico se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, 1993). Dicho algoritmo se incorpora a los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* (*J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la descripción.

Igualmente, las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX para obtener secuencias de aminoácidos que son homólogas a un polipéptido de la descripción.

Para obtener alineaciones separadas para su comparación, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (*Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). Para más detalles véase [www\(dot\)ncbi\(dot\)nml\(dot\)nih\(dot\)gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Según todavía otra realización, dos características de microbioma pueden clasificarse como similares, si el número relativo de genes que pertenecen a una determinada ruta es similar.

Según todavía otra realización, dos características de microbioma pueden clasificarse como similares, si la cantidad relativa de un producto generado por los microbios es similar.

La predicción puede realizarse utilizando un algoritmo (p. ej., una máquina de algoritmo de aprendizaje) que tiene en cuenta la relevancia (es decir, el peso) de los microbios y/o productos particulares de los mismos en la composición. El algoritmo puede construirse utilizando datos de microbioma intestinal de una población de sujetos clasificados según su estado dietético (p. ej., una clasificación de sujetos no obesos, sin dieta, una clasificación de sujetos obesos y una clasificación de sujetos no obesos, tras la dieta).

La base de datos puede incluir otros parámetros relacionados con los sujetos, por ejemplo, el peso del sujeto, la química sanguínea del sujeto, las características genéticas del sujeto, el IMC del sujeto, los hábitos alimenticios del

sujeto y/o la salud del sujeto (p. ej., trastorno diabético, pre-diabético, otro trastorno metabólico, hipertensión, trastorno cardíaco, etc.).

5 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "aprendizaje automático" se refiere a un procedimiento incorporado como programa informático configurado para inducir patrones, regularidades o reglas a partir de datos recopilados previamente para desarrollar una respuesta apropiada a datos futuros, o describir los datos de manera significativa.

El uso del aprendizaje automático es especialmente, pero no exclusivamente, ventajoso cuando la base de datos incluye entradas multidimensionales.

10 La base de datos se puede usar como un conjunto de entrenamiento del cual el procedimiento de aprendizaje automático puede extraer los parámetros que mejor describen el conjunto de datos. Una vez que se extraen los parámetros, se pueden usar para predecir la probabilidad de recuperación de peso en un sujeto.

15 En el aprendizaje automático, la información se puede adquirir mediante el aprendizaje supervisado o el aprendizaje no supervisado. En algunas realizaciones, el procedimiento de aprendizaje automático comprende, o es, un procedimiento de aprendizaje supervisado. En el aprendizaje supervisado, las funciones de objetivos globales o locales se utilizan para optimizar la estructura del sistema de aprendizaje. En otras palabras, en el aprendizaje supervisado hay una respuesta deseada, que el sistema utiliza para guiar el aprendizaje.

20 En algunas realizaciones, el procedimiento de aprendizaje automático comprende, o es, un procedimiento de aprendizaje no supervisado. En el aprendizaje no supervisado, generalmente no hay funciones de objetivos. En particular, el sistema de aprendizaje no cuenta con un conjunto de reglas. Una forma de aprendizaje no supervisado según algunas realizaciones es la agrupación no supervisada en la que los objetos de datos no están etiquetados de clase, *a priori*.

25 Ejemplos representativos de procedimientos de "aprendizaje automático" adecuados para las presentes realizaciones, incluidos, entre otros, agrupación, algoritmos de reglas de asociación, algoritmos de evaluación de características, algoritmos de selección de subconjuntos, máquinas de vectores soporte, reglas de clasificación, clasificadores sensibles al costo, algoritmos de votación, algoritmos de apilamiento, Redes bayesianas, árboles de decisión, redes neuronales, algoritmos basados en ejemplos, algoritmos de modelado lineal, análisis de vecinos más próximos a k, algoritmos de aprendizaje por conjuntos, modelos probabilísticos, modelos gráficos, métodos de regresión, métodos de ascenso de gradiente, métodos de descomposición de valores singulares y análisis de componentes principales. Entre los modelos de redes neuronales, el mapa de autoorganización y la teoría de resonancia adaptativa son algoritmos de aprendizaje no supervisados comúnmente empleados. El modelo de la teoría de resonancia adaptativa permite que el número de agrupaciones varíe con el tamaño del problema y permite al usuario controlar el grado de similitud entre los miembros de los mismos grupos mediante una constante definida por el usuario denominada parámetro de vigilancia.

35 A continuación, se presenta una visión general de algunos procedimientos de aprendizaje automático adecuados para las presentes realizaciones.

El algoritmo de regla de asociación es una técnica para extraer patrones de asociación significativos entre las características.

40 El término "asociación", en el contexto del aprendizaje automático, se refiere a cualquier interrelación entre características, no solo las que predicen una clase determinada o valor numérico. La asociación incluye, pero no se limita a, encontrar reglas de asociación, encontrar patrones, realizar la evaluación de características, realizar la selección de subconjuntos de características, desarrollar modelos predictivos y comprender las interacciones entre características.

45 La expresión "reglas de asociación" se refiere a elementos que coexisten frecuentemente dentro de las bases de datos. Incluye, entre otros, patrones de asociación, patrones discriminativos, patrones frecuentes, patrones cerrados y patrones colosales.

Una etapa primaria habitual del algoritmo de regla de asociación es encontrar un conjunto de elementos o características que son los más frecuentes entre todas las observaciones. Una vez se obtiene la lista, se pueden extraer reglas de ellos.

50 El mapa autoorganizado mencionado anteriormente es una técnica de aprendizaje no supervisada que a menudo se utiliza para la visualización y el análisis de datos de grandes dimensiones. Las aplicaciones típicas se centran en la visualización de las dependencias centrales dentro de los datos en el mapa. El mapa generado por el algoritmo puede usarse para acelerar la identificación de reglas de asociación por otros algoritmos. El algoritmo generalmente incluye una cuadrícula de unidades de procesamiento, denominadas "neuronas". Cada neurona está asociada a un vector de características denominado observación. El mapa intenta representar todas las observaciones disponibles

con una precisión óptima utilizando un conjunto restringido de modelos. Al mismo tiempo, los modelos se ordenan en la cuadrícula de modo que modelos similares estén cerca uno del otro y modelos diferentes lejos uno del otro. Este procedimiento permite la identificación, así como la visualización de dependencias o asociaciones entre las características en los datos.

- 5 Los algoritmos de evaluación de características están dirigidos a la clasificación de características o a la clasificación seguida de la selección de características en función de su impacto en la probabilidad de que el sujeto analizado recupere peso.

El término "característica" en el contexto del aprendizaje automático se refiere a una o más variables de entrada sin procesar, a una o más variables procesadas, o a una o más combinaciones matemáticas de otras variables, incluidas las variables sin procesar y las variables procesadas. Las características pueden ser continuas o discretas.

- 10

El aumento de información es uno de los métodos de aprendizaje automático adecuados para la evaluación de características. La definición de aumento de información requiere la definición de entropía, que es una medida de impureza en una colección de ejemplos de entrenamiento. La reducción en la entropía de la característica objetivo que ocurre al conocer los valores de una determinada característica se denomina aumento de información. El aumento de información puede usarse como un parámetro para determinar la eficacia de una característica para explicar la probabilidad de que el sujeto bajo análisis recupere peso. La incertidumbre simétrica es un algoritmo que puede utilizar un algoritmo de selección de características, según algunas realizaciones. La incertidumbre simétrica compensa el sesgo del aumento de información hacia las características con más valores normalizando las características a un intervalo $[0,1]$.

- 15

- 20 Los algoritmos de selección de subconjuntos se basan en una combinación de un algoritmo de evaluación y un algoritmo de búsqueda. Al igual que los algoritmos de evaluación de características, los algoritmos de selección de subconjuntos clasifican subconjuntos de características. Sin embargo, a diferencia de los algoritmos de evaluación de características, un algoritmo de selección de subconjuntos adecuado para las presentes realizaciones tiene como objetivo seleccionar el subconjunto de características con el mayor impacto en la probabilidad de que el sujeto bajo análisis recupere peso, al tiempo que explica el grado de redundancia entre las características incluidas en el subconjunto. Los beneficios de la selección de subconjuntos de características incluyen facilitar la visualización y comprensión de datos, reducir los requisitos de medición y almacenamiento, reducir los tiempos de capacitación y utilización, y eliminar las funciones de distracción para mejorar la clasificación.

- 25

- 30 Dos métodos básicos para los algoritmos de selección de subconjuntos son el proceso de agregar características a un subconjunto de trabajo (selección hacia adelante) y eliminar del subconjunto actual de características (eliminación hacia atrás). En el aprendizaje automático, la selección hacia adelante se realiza de manera diferente que el procedimiento estadístico con el mismo nombre. La característica que se agregará al subconjunto actual en el aprendizaje automático se encuentra al evaluar el rendimiento del subconjunto actual aumentado por una nueva característica mediante validación cruzada. En la selección hacia adelante, los subconjuntos se crean agregando cada característica restante a su vez al subconjunto actual mientras se evalúa el rendimiento esperado de cada nuevo subconjunto mediante validación cruzada. La característica que conduce al mejor rendimiento cuando se agrega al subconjunto actual se conserva y el proceso continúa. La búsqueda finaliza cuando ninguna de las características disponibles restantes mejora la capacidad predictiva del subconjunto actual. Este proceso encuentra un conjunto local óptimo de características.

- 35

- 40 La eliminación hacia atrás se realiza de manera similar. Con la eliminación hacia atrás, la búsqueda finaliza cuando una mayor reducción en el conjunto de características no mejora la capacidad predictiva del subconjunto. Las realizaciones presentes contemplan algoritmos de búsqueda que buscan hacia adelante, hacia atrás o en ambas direcciones. Los ejemplos representativos de algoritmos de búsqueda adecuados para las presentes realizaciones incluyen, sin limitación, búsqueda exhaustiva, escalada codiciosa, perturbaciones aleatorias de subconjuntos, algoritmos envolventes, búsqueda de competencia probabilística, búsqueda de esquemas, búsqueda de competencia por intervalo y clasificador bayesiano.

- 45

Un árbol de decisión es un algoritmo de soporte de decisión que forma una ruta lógica de pasos involucrados en considerar la entrada para tomar una decisión.

- 50 La expresión "árbol de decisión" se refiere a cualquier tipo de algoritmos de aprendizaje arbóreo, incluidos entre otros, árboles modelo, árboles de clasificación y árboles de regresión.

- 55 Se puede usar un árbol de decisión para clasificar las bases de datos o su relación jerárquicamente. El árbol de decisión tiene una estructura de árbol que incluye nodos rama y nodos hoja. Cada nodo rama especifica un atributo (atributo de división) y una prueba (prueba de división) que se llevará a cabo sobre el valor del atributo de división, y se ramifica a otros nodos para todos los resultados posibles de la prueba de división. El nodo rama que es la raíz del árbol de decisión se llama nodo raíz. Cada nodo hoja puede representar una clasificación (p. ej., si una parte determinada de la base de datos del grupo coincide con una parte determinada de la base de datos específica del

sujeto) o un valor (p. ej., a predijo la probabilidad de que el sujeto bajo análisis recupere peso). Los nodos hoja también pueden contener información adicional sobre la clasificación representada, como una puntuación de confianza que mide la confianza en la clasificación representada (es decir, la probabilidad de que la clasificación sea precisa). Por ejemplo, la puntuación de confianza puede ser un valor continuo que varía de 0 a 1, cuya puntuación de 0 indica una confianza muy baja (p. ej., el valor de indicación de la clasificación representada es muy bajo) y una puntuación de 1 que indica una confianza muy alta (p. ej., la clasificación representada es casi seguro precisa).

Las máquinas de vectores soporte son algoritmos que se basan en la teoría del aprendizaje estadístico. Una máquina de vectores soporte (MVS) según algunas realizaciones puede usarse con fines de clasificación y/o para predicción numérica. Una máquina de vector soporte para clasificación se denomina en la presente memoria "clasificador de vector soporte", máquina de vector soporte para predicción numérica se denomina en la presente memoria "regresión de vector soporte".

Una MVS se caracteriza generalmente por una función del núcleo, cuya selección determina si la MVS resultante proporciona clasificación, regresión u otras funciones. Mediante la aplicación de la función del núcleo, la MVS asigna vectores de entrada en un espacio de características de gran dimensión, en donde se puede construir una hipersuperficie de decisión (también conocida como separador) para proporcionar clasificación, regresión u otras funciones de decisión. En el caso más simple, la superficie es un hiperplano (también conocido como separador lineal), pero también se contemplan separadores más complejos y se pueden aplicar utilizando las funciones del núcleo. Los puntos de datos que definen la hipersuperficie se denominan vectores soporte.

El clasificador de vector soporte selecciona un separador donde la distancia del separador desde los puntos de datos más cercanos es lo más grande posible, separando así los puntos de vector de característica asociados a objetos en una clase dada de los puntos de vector de característica asociados a objetos fuera de la clase. Para la regresión del vector soporte, se construye un tubo de gran dimensión con un radio de error aceptable que minimiza el error del conjunto de datos al tiempo que maximiza la horizontalidad de la curva o función asociada. En otras palabras, el tubo es una envoltura alrededor de la curva de ajuste, definida por una colección de puntos de datos más cercanos a la curva o superficie.

Una ventaja de una máquina de vectores soporte es que una vez que se han identificado los vectores soporte, las observaciones restantes pueden eliminarse de los cálculos, reduciendo así en gran medida la complejidad informática del problema. Un MVS generalmente opera en dos fases: una fase de entrenamiento y una fase de prueba. Durante la fase de entrenamiento, se genera un conjunto de vectores soporte para su uso en la ejecución de la regla de decisión. Durante la fase de prueba, las decisiones se toman utilizando la regla de decisión. Un algoritmo de vector soporte es un método para entrenar una MVS. Mediante la ejecución del algoritmo, se genera un conjunto de parámetros de entrenamiento, incluidos los vectores soporte que caracterizan la MVS. Un ejemplo representativo de un algoritmo de vector soporte adecuado para las presentes realizaciones incluye, sin limitación, optimización secuencial mínima.

El algoritmo del operador de contracción y selección menos absoluta (LASSO) es un algoritmo de contracción y/o selección para la regresión lineal. El algoritmo LASSO puede minimizar la suma habitual de errores al cuadrado, con una regularización, que puede ser una regularización de la norma L1 (un límite en la suma de los valores absolutos de los coeficientes), una regularización de la norma L2 (un límite en la suma de los cuadrados de los coeficientes) y similares. El algoritmo LASSO puede estar asociado a un umbral suave de coeficientes de ondícula, regresión por etapas hacia adelante y métodos de refuerzo. El algoritmo LASSO se describe en el documento: Tibshirani, R, Regression, Shrinkage and Selection a través de Lasso, *J. Royal. Statisc. Soc. B.*, vol. 58, n° 1, 1996, páginas 267-288.

Una red bayesiana es un modelo que representa variables e interdependencias condicionales entre variables. En una red bayesiana, las variables se representan como nodos, y los nodos pueden conectarse entre sí mediante uno o más enlaces. Un enlace indica una relación entre dos nodos. Los nodos suelen tener tablas de probabilidad condicional correspondientes que se utilizan para determinar la probabilidad de un estado de un nodo dado el estado de otros nodos a los que está conectado el nodo. En algunas realizaciones, se emplea un algoritmo clasificador óptimo de Bayes para aplicar al máximo una hipótesis a posteriori a un nuevo registro con el fin de predecir la probabilidad de su clasificación, así como para calcular las probabilidades de cada una de las demás hipótesis obtenidas de un conjunto de entrenamiento y usar estas probabilidades como factores de ponderación para futuras predicciones sobre la probabilidad de que un sujeto recupere peso. Un algoritmo adecuado para la búsqueda de la mejor red bayesiana, incluye, sin limitación, el algoritmo basado en métrica de puntuación global. En un enfoque alternativo para construir la red, se puede emplear la manta de Markov. La manta de Markov aísla a un nodo de que se vea afectado por cualquier nodo fuera de su límite, que está compuesto por los padres del nodo, sus hijos y los padres de sus hijos.

Los algoritmos basados en ejemplos generan un nuevo modelo para cada ejemplo, en lugar de basar las predicciones en árboles o redes generados (una vez) a partir de un conjunto de entrenamiento.

El término "ejemplo", en el contexto del aprendizaje automático, se refiere a un ejemplo de una base de datos.

Los algoritmos basados en ejemplos generalmente almacenan toda la base de datos en la memoria y construyen un modelo a partir de un conjunto de registros similares a los que se están probando. Esta similitud se puede evaluar, por ejemplo, a través del método de vecino más cercano o ponderado localmente, p. ej., utilizando distancias euclidianas. Una vez seleccionado un conjunto de registros, el modelo final se puede construir usando varios algoritmos diferentes, como el Bayes sencillo.

Además de predecir la probabilidad de que un sujeto recupere peso después de un producto de pérdida de peso, el presente método también puede usarse para determinar la eficacia de un adyuvante dietético.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para controlar la eficacia de un auxiliar de dieta en un sujeto:

(a) tratando al sujeto con un adyuvante dietético; y

(b) analizando la presencia o la cantidad de al menos un microbio y/o producto del mismo, en donde se altera una cantidad de al menos un microbio o producto del mismo durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y además en donde la cantidad de al menos un microbio se mantiene al nivel que sigue al programa de pérdida de peso;

en donde la cantidad o la presencia del al menos un microbio o producto del mismo es indicativo de la eficacia de un adyuvante dietético.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "adyuvante dietético" se refiere a un agente, procedimiento o actividad que ayuda a la reducción de peso.

El agente dietético puede ser un alimento, un producto químico, un agente nutracéutico, un agente farmacéutico.

El procedimiento puede ser un procedimiento quirúrgico.

Un ejemplo de una actividad es un régimen de ejercicio.

Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay un aumento en la cantidad (p. ej., al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) de al menos un microbio (y/o producto del mismo), que disminuye durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde el microbio se mantiene a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay un aumento (p. ej., al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos 20 microbios (y/o productos de los mismos), que se regulan negativamente durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde los microbios se mantienen a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay un aumento (p. ej., en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos 50 microbios (y/o productos de los mismos), que disminuyen durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde los microbios se mantienen a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay un aumento (p. ej., de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos 100 microbios (y/o productos de los mismos), que disminuyen durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde los microbios se mantienen a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay una disminución (p. ej., al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos un microbio (y/o producto del mismo), que se incrementa durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde el microbio se mantiene a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay una disminución (p. ej., al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos 20 microbios (y/o productos de los mismos), que se incrementan durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de

un sujeto obeso y en donde los microbios se mantienen a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

5 Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay una disminución (p. ej., en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos 50 microbios (y/o productos de los mismos), que se incrementan durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde los microbios se mantienen a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

10 Según este aspecto de la presente descripción, cuando hay una disminución (p. ej., al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en la cantidad de al menos 100 microbios (y/o productos de los mismos), que se incrementan durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y en donde los microbios se mantienen a ese nivel después del programa de pérdida de peso, es indicativo de que el adyuvante dietético es eficaz.

15 Los presentes inventores proponen además que es posible reducir el riesgo de aumento de peso en un sujeto administrando al sujeto agentes que modulan su microbioma de tal manera que su microbioma se vuelva más similar a un sujeto que no es obeso, ni sigue una dieta.

20 Por lo tanto, se proporciona un método para reducir el riesgo de aumento de peso en un sujeto que ha alcanzado un peso objetivo poniendo en práctica un programa de pérdida de peso, comprendiendo el método administrar al sujeto un agente que altera el microbioma intestinal del sujeto para que la característica del microbioma intestinal se vuelva más similar a la característica de un microbioma intestinal de un sujeto que no es obeso que no se haya sometido a un programa de pérdida de peso, reduciendo así el aumento de peso en el sujeto.

Según una realización, el agente es el que incrementa al menos un microbio o producto del mismo (que disminuye durante el aumento de peso y permanece disminuido durante la pérdida de peso posterior).

Los ejemplos de composiciones microbianas contempladas por los presentes inventores incluyen las que están relacionadas con la síntesis de nitrato y/o la biosíntesis de heptosa.

25 Por ejemplo, la presente descripción contempla composiciones microbianas (p. ej., composiciones probióticas), que proceden del microbioma intestinal de un sujeto sano que no tiene sobrepeso (p. ej., tiene un IMC entre 18,5 – 24,9) y además que no se ha sometido un programa de pérdida de peso (p. ej., en el último año, preferiblemente los últimos dos años).

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "probiótico" se refiere a cualquier tipo microbiano que está relacionado con beneficios para la salud en un organismo anfitrión y/o reducción del riesgo y/o síntomas de una enfermedad, trastorno, afección o episodio en un organismo anfitrión. En algunas realizaciones, los probióticos se formulan en un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico. En algunas realizaciones, los probióticos son tipos de bacterias.

35 Las composiciones microbianas pueden ser estadísticamente similares de manera significativa a un microbioma de un sujeto no obeso que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso (p. ej., en el último año, preferiblemente los últimos dos años).

Las composiciones microbianas pueden tomarse de una muestra de microbiota del sujeto no obeso, que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso.

40 Una muestra de microbiota comprende una muestra de microbios y/o componentes o productos de los mismos de un microbioma.

Alternativamente, la composición microbiana se puede crear artificialmente añadiendo cantidades conocidas de diferentes microbios.

45 Se apreciará que la composición microbiana que procede de la muestra de microbiota de un sujeto que no es obeso puede manipularse antes de la administración aumentando la cantidad de una cepa particular o agotando de la cantidad de una cepa determinada. Alternativamente, las composiciones microbianas se tratan de tal manera que no alteren el equilibrio relativo entre las especies microbianas y los taxones comprendidos en ellas.

En algunas realizaciones, la composición microbiana se expande *ex vivo* usando métodos de cultivo conocidos antes de la administración. En otras realizaciones, la composición microbiana no se expande *ex vivo* antes de la administración.

50 Según una realización, la composición microbiana no procede del material fecal.

Según todavía otra realización, la composición microbiana está desprovista (o comprende solo pequeñas cantidades) de material fecal (p. ej., fibra).

El microorganismo probiótico puede estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo en forma seca en polvo. Además, el microorganismo probiótico puede haber sido procesado para aumentar su supervivencia. Por ejemplo, el

5 microorganismo puede estar recubierto o encapsulado en un polisacárido, grasa, almidón, proteína o en una matriz de azúcar. Se pueden usar técnicas de encapsulación convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse las técnicas expuestas en la patente de EE.UU. nº 6.190.591.

Según una realización particular, la composición de microorganismos probióticos se formula en un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico.

- 10 En algunas realizaciones, un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico es o comprende un producto lácteo. En algunas realizaciones, un producto lácteo es o comprende un producto de yogur. En algunas realizaciones, un producto lácteo es o comprende un producto de la leche.

En algunas realizaciones, un producto lácteo es o comprende un producto de queso. En algunas realizaciones, un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico es o comprende un zumo u otro producto derivado de fruta.

- 15 En algunas realizaciones, un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico es o comprende un producto derivado de vegetales. En algunas realizaciones, un producto alimenticio, un alimento funcional o nutracéutico es o comprende un producto en grano, que incluye entre otros a cereales, galletas, pan y/o avena. En algunas realizaciones, un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico es o comprende un producto de arroz. En algunas realizaciones, un producto alimenticio, alimento funcional o nutracéutico es o comprende un producto
- 20 cármico.

Como se ha mencionado, los presentes inventores proponen además administrar metabolitos de microbios como un sustituto de los propios microbios.

Ejemplos de metabolitos que pueden proporcionarse incluyen, entre otros, flavonoides, tales como apigenina y/o naringenina.

- 25 Antes de la administración del probiótico o metabolito, el sujeto puede tratarse previamente con un agente que reduce el número de microbios que se producen de forma natural en el microbioma (p. ej., por tratamiento con antibióticos). Según una realización particular, el tratamiento elimina significativamente la microflora intestinal natural en al menos 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o incluso 90%.

En otras realizaciones más, el agente es el que reduce el ursodesoxicolato, glicocolato, fenilacetato y/o heptanoato.

- 30 Según otra realización, el agente es el que hace disminuir al menos un microbio o producto del mismo (que se incrementa durante el aumento de peso y permanece disminuido durante la pérdida de peso posterior).

Por lo tanto, los presentes inventores contemplan el uso de agentes antibióticos para evitar la recuperación de peso.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente antibiótico" se refiere a un grupo de sustancias químicas, aisladas de fuentes naturales o derivadas de agentes antibióticos aislados de fuentes naturales, que

- 35 tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o destruir bacterias. Los ejemplos de agentes antibióticos incluyen, entre otros a: Amikacina; Amoxicilina; Ampicilina; Azitromicina; Azlocilina; Aztreonam; Aztreonam; Carbenicilina; Cefaclor; Cefepima; Cefetamet; Cefinetazol; Cefixima; Cefonicida; Cefoperazona; Cefotaxima; Cefotetano; Cefoxitina; Cefpodoxima; Cefprozil; Cefsulodina; Ceftazidima; Ceftizoxima; Ceftriaxona; Cefuroxima; Cefalexina; Cefalotina; Cetromicina; Cloranfenicol; Cinoxacina; Ciprofloxacina; Claritromicina; Clindamicina; Cloxacilina; Co-amoxiclavuanate; Dalbavancina; Daptomicina; Dicloxacilina; Doxiciclina; Enoxacina; Estolato de eritromicina; Eritromicina etil succinato; Glucoheptonato de eritromicina; Lactobionato de eritromicina; Estearato de eritromicina; Eritromicina; Fidaxomicina; Fleroxacina; Gentamicina; Imipenem; Kanamicina; Lomefloxacina; Loracarbef; Meticilina; Metronidazol; Mezlocilina; Minociclina; Mupirocina; Nafcilina; Ácido nalidíxico; Netilmicina; Nitrofurantoína; Norfloxacina; Ofloxacina; Oxacilina; Penicilina G; Piperacilina; Retapamulina; Rifaxamina, Rifampicina;
- 40 Roxitromicina; Estreptomicina; Sulfametoxazol; Teicoplanina; Tetraciclina; Ticarcilina; Tigeciclina; Tobramicina; Trimetoprima; Vancomicina; combinaciones de Piperacilina y Tazobactam; y sus diversas sales, ácidos, bases y otros derivados. Los antibióticos antibacterianos incluyen, entre otros, aminoglucósidos, los carbacefem, los carbapenem, cefalosporinas, cefamicinas, fluoroquinolonas, glucopéptidos, lincosamidas, macrólidos, monobactamas, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

- 50 En una realización, el antibiótico es un antibiótico de amplio espectro (p. ej., vancomicina, neomicina, ampicilina y metronidazol).

En otra realización, el antibiótico es un antibiótico de espectro estrecho.

Los agentes antibacterianos incluyen también péptidos antibacterianos. Los ejemplos incluyen entre otros a abaecina; andropina; apidaecinas; bombinina brevininas; buforina II; CAP18; cecropinas; ceratotoxina; defensinas; dermaseptina; dermcidina; drosomicina; esculentinas; indolicidina; LL37; magainina; maximum H5; melitina; moricina profenina protegrina; y / o taquiplesinas.

- 5 Según realizaciones particulares, el agente antibiótico reduce una cantidad y/o actividad de bacterias de la clase Mollicutes o del orden Bacteroidales.

- Se apreciará que el método descrito anteriormente para reducir el riesgo o la recuperación de peso puede realizarse de manera personalizada o no personalizada. Como terapia personalizada, el método incluye una etapa para determinar una cantidad o presencia de al menos un microbio y/o producto del mismo en un microbioma intestinal del sujeto, en donde la cantidad de al menos un microbio se altera durante un período previo de aumento de peso del sujeto para alcanzar un nivel representativo de un sujeto obeso y además en donde la cantidad de al menos un microbio se mantiene al nivel que sigue al programa de pérdida de peso.
- 10

- Los agentes que se administran se adaptan de acuerdo con los resultados del análisis, en donde se administra un agente que incrementa al menos un microbio o producto del mismo que disminuye durante el período de aumento de peso antes o se administra un agente que disminuye un microbio o producto del mismo que se incrementa durante el período anterior de aumento de peso.
- 15

Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos y expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "incluido", "que tiene" y sus conjugados significan "incluidos entre otros".

- 20 La expresión "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

- Como se emplea en la presente memoria, la forma singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias a los plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir numerosos compuestos, incluidas las mezclas de los mismos.
- 25

- En toda esta solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los subintervalos posibles, así como cada uno de los valores numéricos dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo como del 1 al 6 debe considerarse que tiene específicamente subintervalos tales como del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 a 6, etc., así como cada uno de los números dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.
- 30

- Siempre que se indique un intervalo numérico en la presente memoria, significa que incluye cualquier número citado (fraccionado o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que oscila/oscila entre" un primer número de indicación y un segundo número de indicación y "que oscila/oscila entre" un primer número de indicación "a" un segundo número de indicación se usan indistintamente en la presente memoria y significan que incluyen el primer y el segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.
- 35

- Como se emplea en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada que incluye, entre otros, esas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos de profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.
- 40

- Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" incluye suprimir, inhibir, ralentizar o invertir sustancialmente la evolución de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o evitar sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.
- 45

- Cuando se hace referencia a listados de secuencias determinados, debe entenderse que dicha referencia también abarca secuencias que corresponden sustancialmente a su secuencia complementaria que incluye variaciones de secuencia menores, que resultan de, p. ej., errores de secuencia, errores de clonación u otras alteraciones en sustitución de bases, eliminación de bases o adición de bases, siempre que la frecuencia de dichas variaciones sea menor que 1 en 50 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 100 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 200 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 500 nucleótidos, alternativamente, menos de 1 en 1.000
- 50

nucleótidos, alternativamente, menos de 1 en 5.000 nucleótidos, alternativamente, menos de 1 en 10.000 nucleótidos.

- Se aprecia que determinadas características que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuada en cualquier otra realización descrita. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.
- 10 Diversas realizaciones y aspectos descritos anteriormente en la presente memoria y reivindicados en el apartado de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace referencia a continuación a los ejemplos siguientes, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no restrictiva.

- 15 Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ingeniería genética. Dichas técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las Pat. de EE.UU. n° 4.666.828; n° 4.683.202; n° 4.801.531; n° 5.192.659 y n° 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), 3ª edición; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoanálisis disponibles están extensamente descritos en la patente y bibliografía científica, véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. n° 3.791.932; n° 3.839.153; n° 3.850.752; n° 3.850.578; n° 3.853.987; n° 3.867.517; n° 3.879.262; n° 3.901.654; n° 3.935.074; n° 3.984.533; n° 3.996.345; n° 4.034.074; n° 4.098.876; n° 4.879.219; n° 5.011.771 y n° 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Los procedimientos en él se consideran bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Materiales y métodos

- 40 **Ratones:** Se compraron ratones C57B1/6 de Harlan y se dejaron aclimatar al entorno de la instalación de animales durante 2 semanas antes de utilizarse para experimentación. Los ratones exentos de gérmenes Swiss Webster no consanguíneos nacieron en las instalaciones sin gérmenes del Instituto Weizmann y se controló la esterilidad de manera rutinaria. Para los experimentos de trasplante fecal, se volvieron a poner en suspensión 100 mg de heces en 1 ml de PBS, se homogeneizaron y se filtraron a través de un filtro de 70 µm. Los ratones receptores se calibraron con 200 µl del filtrado.

En todos los experimentos, se usaron ratones machos de la misma edad. Los ratones tenían 8 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Para el tratamiento con antibióticos, a los ratones se les administró una combinación de vancomicina (1 g/l), ampicilina (1 g/l), kanamicina (1 g/l) y metronidazol (1 g/l) en su bebida. Todos los antibióticos se adquirieron en Sigma Aldrich y se administraron durante los períodos de tiempo indicados.

- 50 Se recogieron muestras de heces frescas y sobre la base de cada uno de los ratones. Se recogieron muestras de heces frescas en tubos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido tras la recolección y se almacenaron a -80°C hasta el aislamiento del ADN.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el IACUC local.

- 55 **Prueba de tolerancia a la glucosa:** Se dejaron en ayunas los ratones durante 6 horas y posteriormente se administraron 200 µl de una solución de 0,2 g/ml de glucosa (JT Baker) mediante sonda oral. Se determinó la

glucemia a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la prueba de provocación con glucosa (medidor de glucemia Contour™, Bayer, Suiza).

5 *Diagnóstico por la imagen por resonancia magnética:* Se anestesiaron los ratones con isoflurano (5% para inducción, 1-2% para mantenimiento) mezclados con oxígeno (1 litro/min) y se administraron a través de una máscara nasal. Una vez anestesiados, los animales se colocaron en un soporte para la cabeza para asegurar una colocación reproducible dentro del imán. Se controló la frecuencia respiratoria y se mantuvo durante todo el período experimental alrededor de 60-80 respiraciones por minuto. Los experimentos de IMR se realizaron en el sistema 9.4 Tesla BioSpec Magnet 94/20 USR (Bruker, Alemania) equipado con un sistema de bobinas de gradiente capaz de producir un gradiente de pulso de hasta 40 gauss/cm en cada una de las tres direcciones. Todas las imágenes de RM se obtuvieron con una bobina de resonancia en cuadratura (Bruker). El protocolo de IMR incluyó dos conjuntos de imágenes de RM ponderadas en T2 coronal y axial de múltiples cortes. Las imágenes ponderadas en T2 se obtuvieron utilizando la secuencia RARE multicorte (TR = 2.500 ms, TE = 35 ms, Factor RARE = 8), con un tamaño de matriz de 256 x 256, cuatro promedios, correspondientes a un tiempo de adquisición de imagen de 2 minutos y 40 segundos por conjunto. El primer conjunto se usó para obtener 21 cortes axiales con un espesor de corte de 1,00 mm (sin hueco). El campo de visión se seleccionó con 4,2 x 4,2 cm². El segundo conjunto se utilizó para obtener 17 cortes coronales con un espesor de corte de 1,00 mm (sin hueco). El campo de visión se seleccionó con 7,0 x 5,0 cm².

La grasa total y la masa magra de los ratones se midieron con EchoMRI-100™ (Echo Medical Systems, Houston, TX).

20 *Mediciones metabólicas:* La ingesta de alimentos y la actividad locomotora se midieron usando el sistema PhenoMaster (TSE-Systems, Bad Homburg, Alemania), que consiste en una combinación de detectores de alimentación sensibles para la medición automatizada y un sistema de control de actividad basado en un haz de luz detecta y registra los movimientos ambulatorios, incluidos el trepado y ascenso, en cada jaula. Todos los parámetros se midieron de forma continua y simultánea. Los ratones fueron entrenados alojados individualmente en jaulas idénticas antes de la adquisición de datos.

25 Se midieron las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total y lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero de ratón con el SpotChem EZ Chemistry Analyzer (Arkray, Japón).

Se midieron las concentraciones de leptina (Mouse Leptin DUO set, R&D Systems) e insulina (Ultra-sensitive mouse insulin ELISA kit, Crystal Chem) en el suero usando ELISA según las instrucciones del fabricante.

30 *Citometría de flujo:* Se obtuvo la fracción estromal-vascular del tejido adiposo blanco visceral. Las células aisladas se lavaron con PBS frío y se volvieron a poner en suspensión en PBS que contenía BSA al 1% para la tinción directa de la superficie celular. Las suspensiones monocelulares se tiñeron con anticuerpos durante 30 minutos en hielo frente a CD45, F4/80, CD11b, TCRβ y NK1.1 (todos obtenidos de Biolegend). Las células teñidas se analizaron en un citómetro BD-LSRFortessa y se analizaron con el programa informático FlowJo.

35 *Análisis taxonómico del microbiota:* Las muestras fecales congeladas se procesaron para aislamiento de ADN utilizando el kit MoBio PowerSoil según las instrucciones del fabricante. Para la amplificación por PCR del gen 16S ARNr, se usó 1 ng del ADN fecal purificado para la amplificación por PCR. Se generaron amplicones que abarcan la región variable 1/2 (V1/2) del gen 16S de ARNr utilizando los siguientes cebadores con código de barras: Directo 5'-XXXXXXXXAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID nº: 1), Inverso 5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' (SEQ ID nº: 2), donde X representa una base de código de barras. Posteriormente, las reacciones se agruparon y limpiaron (kit de limpieza de PCR, Promega), y los productos de PCR se secuenciaron luego en un Illumina MiSeq en un método de extremo emparejado de 500 pb. Las lecturas se procesaron a continuación utilizando la tubería de análisis QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, [www\(dot\)qiime\(dot\)org](http://www.dot.qiime.org)) como ha descrito Caporaso, J. G. *et al. Nature methods* 7, 335-336, doi: 10.1038/nmeth.f.303 (2010); Elinav, E. *et al. Cell* 145, 745-757, doi: 10.1016/j.cell.2011.04.022 (2011). En resumen, los archivos de calidad fasta y un archivo cartográfico que indica la secuencia del código de barras correspondiente a cada muestra se usaron como entradas, las lecturas se dividieron por muestras según el código de barras, se realizó una clasificación taxonómica utilizando el clasificador RDP y se creó una tabla OTU. Se empleó cartografía OTU de referencia cerrada utilizando la base de datos Greengenes. Se utilizó rarefacción para excluir muestras con recuento insuficiente de lecturas por muestra. Las secuencias que comparten el 97% de identidad de secuencia de nucleótidos en la región V2 se agruparon en unidades taxonómicas operativas (97% ID OTU). Para la diversidad beta, las mediciones unifrac ponderadas se representaron gráficamente según las dos coordenadas principales basadas en 10.000 lecturas por muestra. Las tablas OTU utilizadas para nuestros análisis están disponibles en línea.

55 *Cartografía de secuencia metagenómica:* Se cartografiaron lecturas de secuenciación Illumina para un catálogo de genes microbianos intestinales³⁴ usando cartografiador GEM³⁵ con los siguientes parámetros: -m 0:08 -s 0 -q offset33- gemqualitythreshold 26.

Asignación funcional: Las lecturas cartografiadas para el catálogo de genes microbianos intestinales se les asignó una KEGG^{36,37}. Posteriormente, los genes se cartografiaron a módulos y rutas KEGG. Para el análisis de la ruta KEGG, solo se incluyeron las rutas cuya cobertura de genes era superior a 0,2. La asignación bacteriana a las rutas metabólicas se realizó mediante la cartografía de lecturas metagenómicas a genes de los respectivos módulos metagenómicos. Las lecturas cartografiadas se extrajeron y se recartografiaron en una base de datos de genomas bacterianos. Las lecturas que se cartografiaron con éxito se agruparon en géneros, y las que no se cartografiaron se marcaron como "desconocidas".

Estudio de metabolómica: Se recogieron muestras fecales, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Metabolon Inc. realizó la preparación y el análisis de la muestra. Las muestras se prepararon usando el sistema automatizado MicroLab STAR® de (Hamilton). Para eliminar proteínas, se disocian pequeñas moléculas unidas a proteínas o atrapadas en la matriz de proteínas precipitadas, y para recuperar metabolitos químicamente diversos, las proteínas se precipitaron con metanol. El extracto resultante se dividió en cinco fracciones: una para el análisis por UPLC-MS/MS con ionización por electropulverización en modo de iones positivos, otra para el análisis por UPLC-MS/MS con ionización por electropulverización en modo de iones negativos, otra para plataforma polar LC, otra para análisis por GC-MS, y otra muestra se reservó para copia de seguridad. Las muestras se colocaron brevemente en un TurboVap® (Zymark) para eliminar el disolvente orgánico. Para LC, Las muestras se almacenaron durante la noche bajo nitrógeno antes de la preparación para el análisis. Para GC, cada muestra se secó al vacío durante la noche antes de la preparación para su análisis.

Extracción de datos e identificación de compuestos: Se extrajeron los datos en bruto, se identificaron los picos y se procesaron con QC usando el equipo y programa informático de Metabolon. Los compuestos se identificaron por comparación con las entradas a la biblioteca de patrones purificados o entidades desconocidas recidivantes. Cuantificación de metabolitos y normalización de datos: se cuantificaron los picos utilizando el área bajo la curva. Para los estudios que abarcan varios días, se realizó una etapa de normalización de datos para corregir la variación resultante de las diferencias de ajuste entre días del instrumento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t para dos muestras de Welch. Para las pruebas de significación estadística, se dan valores p y los valores q para la cantidad de 0,05 es la tasa de falsos positivos.

Análisis estadístico: Los datos se expresan como media \pm SEM. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Se realizaron comparaciones entre dos grupos por la prueba de la t de Student de dos colas a menos que se especifique lo contrario. La comparación entre múltiples grupos se realizó mediante ANOVA, y se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney para corregir comparaciones múltiples.

Clasificación de los antecedentes de obesidad: Se predijeron los antecedentes de obesidad del ratón utilizando la Random Forest Classification (sklearn 0.15.2) (Pedregosa *et al.*, 2011) siendo las características las abundancias relativas de las OTU 16S producidas por QIIME. La clasificación se realizó en validación cruzada dejando uno fuera.

Predicción de la recuperación de peso después de la dieta HFD: Se predijo el aumento de peso futuro de los ratones en la validación cruzada dejando uno fuera. Para cada ratón fuera, primero se aprendió un clasificador del historial de obesidad y se usó para clasificar el historial de obesidad del ratón fuera como se describió anteriormente. A continuación, se tomaron ratones con datos de entrenamiento con los mismos antecedentes de obesidad que el ratón fuera, y se aplicó la regresión de aumento de gradiente (GBR, sklearn 0.15.2) para aprender un modelo que predice su recuperación de peso con la dieta HFD. La entrada a este modelo consiste en las OTU 16S que se usaron dentro del algoritmo GBR para predecir el aumento de peso.

Análisis metagenómico: Los presentes inventores filtraron lecturas metagenómicas que contienen adaptadores Illumina, filtraron lecturas de baja calidad y bordes de lectura recortados de baja calidad. Detectaron el ADN del anfitrión cartografiando con GEM (Marco-Sola *et al.*, 2012) al genoma del ratón con parámetros inclusivos, y eliminaron esas lecturas. Asignaron RA de longitud normalizada de genes, obtenidos por cartografía similar con GEM al catálogo de referencia de (Li *et al.*, 2014), a las entradas de KEGG Orthology (KO) (Kanehisa y Goto, 2000), y a continuación se normalizaron a una suma de 1. Calcularon RA de módulos KEGG y rutas por suma. Solo consideraron muestras con lecturas de metagenómica $> 100K$.

Control de calidad de lecturas metagenómicas y eliminación de ADN del anfitrión: Los presentes inventores aplicaron Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) con los siguientes parámetros:

ILLUMINACLIP:<TruSeq3 adapters fasta file>:2:30:10 LEADING:25 TRAILING:25 MINLEN:50. Eliminaron el ADN del anfitrión cartografiando al genoma del ratón (mm10, descargado de www.genome (dot)ucsc(dot)edu) y eliminaron cualquier lectura cartografiada (ver el apartado a continuación).

Cartografía de lecturas de secuenciación metagenómica. La cartografía se realizó utilizando el cartografiador GEM (Marco-Sola *et al.*, 2012) con los siguientes parámetros:

-q offset-33 --gem-quality-threshold 26 -m 0.1 -e 0.1 --min-matched-bases 0.8- max-big-indel-length 15 -s 3 -d' all' -D 1 -v -T 2 -p -E 0.3 --max-extendable-matches 'all' --max-extensions-per-match 5; con la adición de modificador:

-m ajustado a 0,05 para cartografiar el genoma del ratón. Las cartografías resultantes se conservaron siempre que tuvieran al menos 50 bases coincidentes con una calidad mínima de 26.

- 5 Cálculo de abundancia relativa del contenido genético. Los presentes inventores cartografiaron las lecturas al catálogo de referencia integrado del microbioma intestinal humano (Xiao *et al.*, 2014). Para cada gen en el catálogo, contaron la fracción de lecturas cartografiadas de cada muestra, se normalizaron por la longitud del gen en kilobases. Las lecturas asignadas a más de una posición se dividieron para que cada posición recibiera una fracción igual de la lectura asignada. Posteriormente asignaron lecturas cartografiadas a las entradas de KEGG Orthology (KO) (Kanehisa y Goto, 2000) utilizando la tabla de anotación de genes disponible en [www.meta\(dot\)genomics\(dot\)cn/](http://www.meta(dot)genomics(dot)cn/). Luego calcularon las abundancias relativas de genes normalizando los genes KEGG de cada muestra para sumar 1. Para calcular las abundancias de las rutas y módulos KEGG, sumaron la abundancia relativa de genes en cada ruta y módulo.

Ejemplo 1

- 15 Aumento de peso recidivante mejorado después del tratamiento de obesidad

Para estudiar los mecanismos subyacentes al aumento de peso después de la dieta, se utilizó un modelo de obesidad recidivante en ratones, en el que los ratones se expusieron a ciclos de alimentación con una alimentación de dieta rica en grasas (HFD), interrumpida por el consumo normal de comida (NC) (cycHFD). En consecuencia, en estos ratones, el aumento de peso y las características del síndrome metabólico se desarrollaron durante la exposición a HFD, seguido de la recuperación y la reducción de peso durante la exposición a NC, resultante de un segundo ciclo de HFD y los trastornos metabólicos relacionados. Como referencias, los ratones se alimentaron continuamente con una HFD, los ratones se alimentaron continuamente una dieta NC y se usaron los ratones que fueron expuestos a un solo ciclo de HFD (primHFD) (FIG. 1A). Como se observó en seres humanos que hacen dieta de forma recidivante (3), un ciclo anterior de obesidad-pérdida de peso hizo a los ratones sensibles a un aumento de peso secundario acelerado y mejorado, incluso después de regresar completamente al peso de referencia (FIG. 1B). Esta obesidad recidivante se caracterizaba por un aumento en la grasa corporal total determinada por MRI (FIG. 1C-D), intolerancia a la glucosa mejorada medida por una prueba de tolerancia a la glucosa oral (figuras 1E-F) y niveles séricos elevados de leptina, colesterol total, lipoproteína de baja densidad (LDL) y triglicéridos (FIG 1G-J) en comparación con ratones que presentan una única exposición idéntica a HFD.

- 30 Además, se observaron alteraciones metabólicas agravadas después de un ciclo de aumento de peso/reducción de peso cuando la pérdida de peso observada mejoró con fármacos, como se ejemplifica mediante experimentos usando celastrol, un meturo de quinona recientemente encontrado para inducir la pérdida de peso. En este modelo, el aumento de peso inducido por el consumo de HFD fue seguido por una 'dieta activa' mediada por celastrol). Tras el restablecimiento de la HFD, los ratones desarrollaron un aumento de peso secundario agravado (FIG. 1K), en comparación con las referencias tratadas con celastrol sin obesidad previa.

Para descartar que este fenómeno estuviera relacionado con factores relacionados con la composición de la dieta, más que con el efecto de las dietas posteriores a la obesidad, se empleó un modelo diferente de aumento de peso recidivante, que utilizaba inhibición competitiva de la señalización de leptina. Recientemente se demostró que los inhibidores hiperactivos de la leptina alteran la señalización periférica de la leptina y el transporte de leptina al sistema nervioso central, lo que induce un estado adquirido y reversible de insuficiencia de leptina caracterizado por hiperfagia y aumento de peso incluso con una dieta normal de comida (13). De hecho, los ratones a los que se inyectó el antagonista de leptina durante una semana mientras consumían NC aumentaron significativamente de peso, y volvieron completamente al peso normal al cesar la inyección de antagonista de leptina (FIG. 1J). Como en los modelos anteriores, tras una segunda prueba de provocación por el antagonista de la leptina, estos ratones presentaron una recuperación de peso mejorada en comparación con los ratones en exposición primaria al antagonista de leptina (FIG. 1J). Juntos, estos experimentos demuestran que un ciclo previo de aumento de peso-dieta aumenta la predisposición a un aumento de peso secundario y agravaba sus complicaciones metabólicas relacionadas, recapitulando así el 'efecto yo-yo' de la obesidad recidivante después de la dieta.

Ejemplo 2

- 50 Persistencia de una característica del microbioma similar a la memoria después de la pérdida de peso

Dado que el aumento de peso secundario estaba relacionado con trastornos metabólicos mejorados a pesar de un retorno completo al peso normal, se supuso que la obesidad inicial había producido anomalías persistentes que predisponían a los ratones a la enfermedad metabólica recidivante al volver a alimentarse con HFD. Por lo tanto, los presentes inventores realizaron un perfil metabólico en la fase nadir, es decir, cuando los ratones anteriormente obesos habían vuelto a su peso original. Sin embargo, a pesar de los marcados trastornos metabólicos durante la fase de obesidad, el contenido de grasa corporal, la tolerancia a la glucosa y los niveles de insulina en suero eran

- indistinguibles entre los ratones tras la dieta y sus referencias no en el ciclo (FIG. 2A-D). Del mismo modo, otras características de la obesidad, como la actividad física, la ingesta de alimentos y bebidas, el consumo de oxígeno, el gasto energético, los niveles séricos de leptina y la inflamación del tejido adiposo volvieron todos a los niveles normales tras la pérdida de peso. Por el contrario, la composición del microbioma intestinal, que había supuesto un estado disbiótico durante la obesidad, no volvió a la composición original incluso después del peso tras la dieta y la normalización metabólica, y presentó una configuración intermedia entre los estados disbiótico y normal (FIG. 2E). Asimismo, la diversidad bacteriana se perdió durante el estado obeso, pero no se recuperó a pesar del retorno al peso normal y la homeostasis metabólica (FIG. 2F). La persistencia de los efectos inducidos por la obesidad en el microbioma fue impulsada por múltiples taxones bacterianos que no volvieron a los niveles normales tras la pérdida de peso, incluidos Mollicutes y Bacteroidales (FIG. 2G-H). Además, la funcionalidad del microbioma, determinada por la secuenciación metagenómica de escopeta, no se recuperó completamente en ratones anteriormente a dieta, tanto en cuanto al contenido de genes (FIG. 2I-J) como en las funcionalidades KEGG (FIG. 2K-L). Por ejemplo, la respiración bacteriana de nitrato y la biosíntesis de heptosa se eliminaron de manera persistente en ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso (FIG. 2K-L).
- 15 Dichas características de memoria también se observaron en la microbiota de ratones tratados con celastrol, y en ratones a los que se les había administrado un antagonista de leptina para inducir el ciclo del peso, lo que indica que el efecto de persistencia observado de la disbiosis inducida por la obesidad se aplica a varios modos de aumento de peso y de tratamiento dietético.

20 En conjunto, estos datos indican que el microbioma presenta una configuración similar a la memoria tras la inversión de la obesidad por el tratamiento dietético, incluso en un estado en donde se alcanza la normalidad metabólica.

Ejemplo 3

El microbioma alterado persistente conduce al aumento de peso recidivante exagerado

25 Los presentes inventores a continuación trataron de investigar si la característica del microbioma posterior a la obesidad estaba causalmente relacionada con las complicaciones metabólicas asociadas al aumento de peso recidivante.

30 Con este fin, después de un período de consumo de HFD, se trató a los ratones con antibióticos de amplio espectro (vancomicina, neomicina, ampicilina y metronidazol) durante el siguiente período de pérdida de peso (FIG. 3A). En particular, el tratamiento con antibióticos durante la dieta abolió la persistencia de una característica de microbioma posterior a la obesidad al volver al peso normal, determinado por la secuenciación 16S, y equilibró la composición de microbiota entre ratones anteriormente obesos y referencias continuamente delgados (FIG. 3B). Sorprendentemente, el tratamiento con antibióticos también eliminó el empeoramiento de los trastornos metabólicos al recuperar el peso, incluido el contenido de grasa corporal y la intolerancia a la glucosa, mientras que los ratones de referencia sin antibióticos que se incluyeron en el mismo experimento mostraron aberraciones metabólicas mejoradas en el segundo ciclo de peso (FIG. 3B-F).

35 Para corroborar aún más el papel causal del microbioma alterado tras la dieta en la conducción de un aumento de peso secundario, se realizaron experimentos de trasplante fecal, en los que la microbiota de ratones anteriormente obesos (cycHFD) y de referencias fenotípicamente idénticas (NC) se transfirieron a ratones sin gérmenes, que posteriormente fueron alimentados con una dieta NC o HFD (FIG. 3G). Las diferencias de composición entre la microbiota de los ratones y las referencias que anteriormente en el ciclo de pérdida-recuperación de peso persistieron en los receptores sin gérmenes (FIG. 3L). Curiosamente, en condiciones normales de alimentación, los ratones sin gérmenes trasplantados con microbioma y después del ciclo presentaron una similar peso y tolerancia a la glucosa (FIG. 3I, J), lo que indica que el microbioma tras la obesidad de por sí no contenía propiedades inductoras de obesidad. Por el contrario, cuando se alimentaba con una HFD, los receptores de la microbiota después del ciclo de pérdida-recuperación de peso presentaban un aumento de peso significativamente mayor e intolerancia a la glucosa en comparación con los receptores del microbioma de los ratones de referencia (FIG. 3I, J). Por lo tanto, los receptores sin gérmenes reflejaron con detalle los fenotipos de los ratones donantes, lo que demuestra que la predisposición al aumento de peso secundario puede transferirse mediante trasplante fecal e inducir alteraciones metabólicas mejoradas, incluso en ausencia de antecedentes de obesidad. Juntos, estos datos sugieren que la microbiota tras la dieta es tanto necesaria como suficiente para conferir sensibilidad a complicaciones metabólicas tras la reexposición a condiciones inductoras de obesidad.

45 Para determinar la duración de la persistencia de las alteraciones del microbioma después de la dieta, la composición de la microbiota se controló cada tres semanas tras el retorno de los ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso antes de la normalidad fenotípica (FIG. 3K). Especialmente, solo 21 semanas después del equilibrio de peso, es decir, un período de tiempo más de cinco veces más largo que el aumento de peso inicial o el período de dieta, la composición de la microbiota de los ratones anteriormente en el ciclo se volvió indistinguible de la de los ratones delgados de la misma edad (FIG. 3L). Especialmente, la recuperación completa de la composición de microbiota estaba relacionada con una recuperación de peso mejorada tras la reexposición a HFD (FIG. 3K).

Juntos, estos resultados demuestran que después de la obesidad y el tratamiento dietético, una configuración de microbioma persistente da larga duración conduce a una tendencia marcada para una recuperación exagerada de peso y trastornos metabólicos relacionados producidos por un segundo periodo de aumento de peso.

Ejemplo 4

5 Predicción precisa de la recuperación de peso después de la dieta mediante parámetros de microbiota

Dado el vínculo causal entre el microbioma alterado persistentemente después del aumento de peso en el ciclo y la dieta y la predisposición a anomalías metabólicas secundarias empeoradas, los presentes inventores a continuación buscaron desarrollar una estrategia para predecir las probabilidades individuales de experimentar un aumento de peso recidivante basado en la composición de microbiota en el periodo "nadir" después de la dieta. Por lo tanto, idearon un algoritmo de aprendizaje automatizado que realiza una predicción de dos etapas de la extensión de la recuperación de peso tras la exposición secundaria a HFD en comparación con la exposición primaria a HFD. En la primera etapa, los microbiomas fecales de ratones "exobesos" después de la dieta se caracterizan de una manera que está cegada con respecto a los antecedentes de obesidad (FIG. 4A). Estas características se emplean a continuación para predecir la probabilidad de que la muestra fecal se haya obtenido de un ratón después de la dieta o de referencia utilizando un esquema de validación cruzada dejando uno fuera convencional, que se realizó con una tasa positiva verdadera muy alta (puntuación ROC 0,96, FIG. 4B). Las características de la microbiota también se utilizan para predecir el grado de aumento de peso tras la exposición a HFD, lo que se consiguió con una precisión considerable ($R = 0,58$, FIG. 4C). En la segunda etapa, tanto la información inferida sobre los antecedentes de obesidad como el aumento de peso previsto en la DFH se integran para conseguir una mayor precisión en la predicción del aumento de peso. En la cohorte de esta invención, esto arrojó una alta correlación entre el aumento de peso previsto y medido tras la exposición a HFD ($R = 0,76$, FIG. 4D).

Para determinar qué características de la microbiota contribuyen a la capacidad del algoritmo para predecir el grado de aumento de peso, todas las unidades taxonómicas operativas (OTU) detectadas en los microbiomas fecales se clasificaron según la importancia de las características para la predicción (FIG. 4E). Cabe destacar que un total de 189 OTU contribuyeron a las predicciones del algoritmo, con modestas contribuciones relativas de cada OTU (FIG. 4E), lo que indica que un consorcio completo de bacterias comensales, en lugar de un pequeño grupo de especies, dirige la memoria del microbioma después de dieta y la predisposición a la obesidad recidivante. Entre las 10 OTU con la mayor contribución a la predicción de aumento de peso se encuentran *Lactobacillus spp.* y la clase de Mollicutes (FIG. 4F), de las cuales se han descrito relaciones con la obesidad (15, 16).

Juntos, estos resultados indican que las estructuras persistentes después de la obesidad en la microbiota pueden usarse no solo para deducir los antecedentes de obesidad, sino también para predecir con precisión el grado de recuperación de peso ante la recurrencia de afecciones productoras de obesidad.

Ejemplo 5

La modulación del microbioma mejora el aumento de peso después de la dieta

Por último, los presentes inventores determinaron si la modulación de microbioma durante el período del ciclo posterior al peso puede emplearse para mejorar la tendencia al aumento de peso exagerado y sus complicaciones metabólicas. Se han sugerido varios métodos de modulación de microbioma, con varias eficacias clínicas. Estos incluyen la terapia probiótica que involucra la introducción exógena de cepas bacterianas comensales en una configuración de microbioma alterada (17), el tratamiento prebiótico que involucra la modulación dietética del microbioma (18), la intervención posbiótica que involucra la administración de combinaciones de moléculas de microbioma segregadas o moduladas que participan en interacciones anfitrión-microbioma (19-21) y trasplante de microbioma fecal (FMT) que implica una sustitución total de un microbioma asociado a la enfermedad con un microbioma 'sano'. Dado que uno de los distintivos de la característica de la microbiota después del ciclo de pérdida-recuperación de peso era la diversidad bacteriana reducida de manera persistente (FIG. 2F), los presentes inventores realizaron la FMT durante el período 'nadir' posterior a la dieta, utilizando microbiomas sin tratamiento previo o de referencia después de la dieta como donantes (FIG. 5A).

Especialmente, los receptores de microbiota 'sana' presentaban un aumento de peso secundario mejorado, que era indistinguible de la de los ratones que estuvieron expuestos a HFD por primera vez (FIG. 5B). Los receptores del microbioma 'fuera del ciclo' también presentaron menos masa de grasa corporal en comparación con los ratones sometidos a un FMT de control con microbioma 'ciclado' (FIG. 5C). Estos resultados indican que la restauración de la función normal de la microbiota después de la dieta puede evitar el agravamiento de los trastornos metabólicos tras la recuperación de peso.

Por último, dada la eficacia de las intervenciones del FMT, los presentes inventores buscaron determinar los mecanismos por los cuales la microbiota predispone a la obesidad recidivante después de la pérdida de peso. Por lo tanto, compararon los metabolomas fecales de los ratones que experimentaron un aumento de peso inducido por la dieta y volvieron al peso normal para controlar los ratones que permanecieron delgados (FIG. 5D). Como era de

esperar, la HFD provocó alteraciones importantes en el metaboloma fecal. En la mayoría de los casos, los niveles de metabolitos volvieron a la normalidad tras la pérdida de peso. Sin embargo, para numerosos metabolitos, los cambios provocados por la obesidad persistieron después del retorno a la normalidad fenotípica (FIG. 5E). Entre los metabolitos persistentes producidos por la obesidad se encuentran los componentes de los ácidos biliares ursodesoxicolato y glicocolato, así como el fenilacetato y el heptanoato. Los metabolitos agotados por la HFD cuyos niveles no se recuperaron al recuperar la salud metabólica estaban los flavonoides dietéticos apigenina y naringenina (FIG. 5D), dos compuestos descritos que influyen en la ingesta de alimentos y la diferenciación de adipocitos (23-26). Se supuso que FMT mejoraba la obesidad recidivante mediante complementos de niveles anulados de apigenina y naringenina después de la dieta. Por lo tanto, los presentes inventores administraron por vía oral ambos flavonoides a ratones después de la dieta cuando su peso y parámetros metabólicos habían vuelto a niveles normales. Sorprendentemente, este tratamiento con metabolitos, similar al FMT, mejoró el aumento de peso secundario y las complicaciones metabólicas (FIG. 5F). Este efecto también se logró administrando naringenina sola. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con metabolitos puede restaurar la función saludable del microbioma después de la dieta y, por lo tanto, evitar las complicaciones metabólicas relacionadas con la recuperación de peso y la recaída de la obesidad.

Ejemplo 6

Aumento de peso recidivante mejorado después de la resolución de la obesidad (además del ejemplo 1)

Para estudiar los mecanismos que modulan la recuperación de peso después de la dieta, se utilizó un modelo de obesidad recidivante en ratones, en el que los ratones se expusieron a ciclos de alimentación con dieta rica en grasas (HFD), intercalados por el consumo de comida normal (NC) (cycHFD, fig. 1A). En consecuencia, en estos ratones, el aumento de peso y el síndrome metabólico se desarrollaron durante la exposición primaria a HFD, seguido por la recuperación y la reducción de peso durante la exposición a NC, y luego por el resurgimiento del aumento de peso y las alteraciones metabólicas relacionadas en los ciclos posteriores de obesidad mediados por HFD. Como referencias, se utilizaron los ratones se alimentaron continuamente con una HFD, los ratones se alimentaron continuamente con una dieta NC y los ratones que estaban expuestos a un solo ciclo de HFD (primHFD) (FIG. 1A). Como se observó en las personas que siguen una dieta recidivante, un ciclo anterior de obesidad-pérdida de peso hizo a los ratones sensibles al aumento de peso secundario acelerado, incluso después de volver completamente al peso de referencia (figuras 1B-C y figuras 11A-B). Como resultado, el aumento de peso neto, es decir, el peso inducido durante duraciones idénticas de alimentación con alto contenido de grasa, fue mayor en el grupo del ciclo de pérdida-recuperación de peso en comparación con los ratones alimentados continuamente con una HFD (FIG. 11C). El peso máximo alcanzado tanto por ambos grupos de ciclo de peso y HFD en continuo fue comparable y mayor que en los ratones expuestos a un primer ciclo de HFD (FIG. 1B). Además, en comparación con los ratones que presentan una única exposición a la HFD, la obesidad recidivante se caracterizó por un aumento significativo en la grasa corporal total según lo determinado por MRI (figuras 11D-E), mejor intolerancia a la glucosa (figuras 1E-F) y concentraciones elevadas de leptina sérica (FIG. 11F) y de lipoproteína de baja densidad (LDL) (FIG. 1I), pero no de lipoproteína de alta densidad (HDL) (figura 11G). La recuperación acelerada de peso en ratones después de la dieta se asoció a una disminución del gasto de energía (FIG. 6A y figuras 11H-O), mientras que la actividad física y la ingesta de alimentos no se vieron afectadas (figuras 11P-Q).

Asimismo, se observaron alteraciones metabólicas agravadas después de un ciclo de aumento/reducción de peso cuando el celastrol aumentó farmacológicamente la pérdida de peso, un meturo de quinona recientemente encontrado para provocar la pérdida de peso¹² (figuras 12A-B). Al restablecer la HFD, los ratones desarrollaron un aumento de peso secundario significativamente empeorado (figuras 12C-F), en comparación con las referencias tratadas con celastrol sin obesidad previa. Además, para modelar la obesidad recidivante producida por hiperfagia en lugar de la composición dietética, la señalización de leptina se inhibió farmacológicamente. Se administró a los ratones un antagonista de leptina durante una semana, mientras que consumiendo NC aumentó significativamente el peso, y volvió completamente al peso normal al cesar el tratamiento con antagonista de leptina. Tras una segunda prueba de provocación con antagonista de leptina, estos ratones presentaron una recuperación de peso más pronunciada en comparación con los ratones a los que se administró por primera vez el antagonista de la leptina (FIG. 1L y figuras 12G-H).

Cuando se expusieron a un tercer ciclo de obesidad inducida por HFD, los ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso presentaron un empeoramiento adicional en el aumento de peso (FIG. 6B y FIG. 12I), obesidad (FIG. 12J) y dislipidemia (FIG. 12K) en comparación con los animales de referencia que experimentan ciclos de aumento de peso secundarios o primarios. Juntos, estos experimentos sugieren que los ciclos de obesidad-dieta previos aumentan progresivamente la sensibilidad a la recuperación acelerada de peso y las complicaciones metabólicas relacionadas.

Ejemplo 7

Persistencia de alteraciones del microbioma provocadas por la obesidad después de la pérdida de peso (además del ejemplo 2)

Dados los resultados anteriores, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la obesidad inicial había producido anomalías persistentes que predisponían a los ratones a la enfermedad metabólica recidivante al volver a alimentarse con HFD. Por lo tanto, realizaron un perfil metabólico en la fase de 'obesidad primaria' (FIG. 12L) y en la fase 'nadir' (FIG. 13A), es decir, cuando los ratones obesos anteriormente habían vuelto al peso normal que era indistinguible del de las referencias alimentadas con NC. A pesar de los notables trastornos metabólicos durante la fase de obesidad primaria (figuras 12M-Q), ni el contenido de grasa corporal, ni el colesterol sérico, ni la tolerancia a la glucosa, ni las concentraciones de insulina sérica fueron significativamente diferentes entre los ratones tras la dieta y sus referencias fuera del ciclo durante la fase 'nadir' posterior a la obesidad (figuras 13B-F). Asimismo, otras características de la obesidad, como el consumo de oxígeno, gasto energético, actividad física, así como ingesta de alimento y bebida volvieron completamente a los niveles de referencia tras la pérdida de peso durante la fase 'nadir' (figuras 13G-L y 14A-L).

En cambio, la composición de la microbiota intestinal, que había supuesto un estado disbiótico durante la fase de obesidad primaria, no volvió a su composición original después del peso tras la dieta y la normalización metabólica (figuras 7A-D y FIG. 15A). En cambio, la microbiota supuso una configuración intermedia entre los estados disbiótico y normal (figuras 7D y 15A). Se observó un cambio de configuración de microbioma similar después de la recuperación en un segundo ciclo de obesidad recidivante (figuras 7E, F y 15A). Estos descubrimientos se confirmaron dirigiéndose a una región alternativa del locus 16S para la secuenciación de amplicones (figuras 15B-D). Especialmente, además de la alteración significativa en la composición bacteriana que persiste después de la normalización metabólica (FIG. 2E), la alfa-diversidad bacteriana se redujo durante el estado de obesidad, pero no se recuperó al volver al peso normal y a la homeostasis metabólica (FIG. 2F). Para determinar las unidades taxonómicas operativas (OTU) que se mantuvieron alteradas después de la dieta, la abundancia de OTU de los ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso se normalizó a las referencias NC de la misma edad y las OTU se clasificaron según su comportamiento temporal. En particular, solo el 45% de todas las OTU volvieron a los niveles previos a la obesidad después de la dieta (FIG. 7G y Figuras 15E-F), mientras que los efectos provocados por la obesidad en el microbioma persistieron en múltiples taxones bacterianos (figuras 15G-L). Asimismo, se observaron alteraciones persistentes de la microbiota tras la obesidad en la composición y la diversidad alfa en ratones en los que la pérdida de peso se había ayudado con el tratamiento con celastrol (figuras 15J-M).

Para determinar las consecuencias funcionales de esta recuperación incompleta de la microbiota tras la dieta, los presentes inventores realizaron una secuenciación metagenómica de escopeta y normalizaron el comportamiento temporal de la abundancia de genes a las referencias NC. Identificaron 773 genes bacterianos cuya abundancia fue alterada por la dieta rica en grasas y no volvió a los niveles de referencia después de la dieta (figuras 16A-C). Asimismo, las funcionalidades microbianas no se recuperaron completamente en ratones previamente a dieta, tanto al nivel de módulos de genes (FIG. 16D) como de vías funcionales (FIG. 7H). Similar a las OTU, la inversión de la obesidad condujo solo a una recuperación parcial de las funciones microbianas (figuras 16E-H), con múltiples aberraciones de microbioma provocadas por la obesidad que persisten durante la pérdida de peso (FIG. 7I). La abundancia de genes de múltiples vías metabólicas, incluidas la biosíntesis de isoflavonoides y esteroides, se redujeron durante la alimentación rica en grasas y no se recuperaron con la dieta (figuras 16I-J). En conjunto, estos datos indican que la inversión de la obesidad mediante la dieta da como resultado una configuración de microbioma que permanece alterada en comparación con los ratones de referencia sin obesidad previa, incluso en un estado en donde se alcanza la normalización metabólica.

Ejemplo 8

Las alteraciones de microbiomas posteriores a la dieta contribuyen a agravar la recuperación de peso (además del ejemplo 3)

Los presentes inventores a continuación trataron de investigar si la característica persistente microbioma posterior a la obesidad estaba causalmente involucrada con las complicaciones metabólicas relacionadas con el aumento de peso recidivante. Con este fin, trataron ratones con antibióticos de amplio espectro durante el período de pérdida de peso posterior a la obesidad (FIG. 3A). Como era de esperar, el tratamiento con antibióticos durante la dieta abolió la característica del microbioma posterior a la obesidad y equilibró la composición de la microbiota y la diversidad alfa entre los ratones previamente obesos y las referencias NC, mientras que la microbiota de las referencias no tratadas con antibióticos mantuvo una configuración intermedia (FIG. 3B y Figs. 17A-B). Sorprendentemente, el tratamiento con antibióticos también suprimió el agravamiento de los trastornos metabólicos después de volver a exponerse a la insuficiencia cardíaca, incluido el aumento de peso, el contenido de grasa corporal y la intolerancia a la glucosa, en comparación con los ratones en el ciclo de pérdida-recuperación de peso sin tratamiento con antibióticos (figuras 3C, D y 17C-E).

A continuación, se determinó el tiempo requerido para la anulación espontánea de las alteraciones persistentes del microbioma tras la dieta. Con este fin, la composición de microbiota se controló cada tres semanas tras el retorno de ratones previamente obesos a la normalidad fenotípica (FIG. 8A). Especialmente, la anulación espontánea de la composición de microbiota tras el ciclo de vuelta a la configuración NC se logró solo 21 semanas después de completar una dieta con éxito, es decir, un período de tiempo más de cinco veces más largo que el aumento de peso

inicial o el período de dieta (FIG. 8B y Figuras 17F-H). El retorno a la normalidad de composición en la microbiota tras la obesidad se relacionó con la adquisición gradual o pérdida de taxones bacterianos (figuras 17I-K). A destacar que, siguiendo el equilibrio espontáneo de la microbiota, la reexposición a la HFD produjo un aumento de peso indistinguible en los grupos de ratones en el ciclo en comparación con los ratones alimentados con la HFD primaria (FIG. 8A y FIG. 17L).

Además, se realizaron experimentos de transferencia fecal, en los que la microbiota de ratones previamente obesos (cycHFD) y de referencias fenotípicamente idénticas (NC) se transfirieron a ratones sin gérmenes, que posteriormente se alimentaron con una dieta NC o HFD (FIG. 18A). Las diferencias de composición entre la microbiota de los ratones y anteriormente en el ciclo de pérdida-recuperación de peso y las referencias persistieron en receptores sin gérmenes (figuras 18B-D). En particular, en condiciones de NC, los ratones sin gérmenes con microbioma trasplantado sin haber sido sometido a experimentos y después del ciclo presentaron tolerancia similar al peso y la glucosa (figuras 3I, J y 18E, F), lo que sugiere que el microbioma tras la obesidad de por sí no presentaba propiedades inductoras de obesidad. Por el contrario, cuando se alimentaban con una HFD, los receptores de microbiota de ciclo después del ciclo de pérdida-recuperación de peso presentaban un aumento de peso significativamente mayor e intolerancia a la glucosa en una semana como máximo después del trasplante fecal, en comparación con los receptores de microbioma de ratones consumidores de NC referencia (figuras 3I, J y 18E, F). Por lo tanto, los trastornos metabólicos mejorados en los ratones sin gérmenes alimentados con HFD trasplantados con microbioma en el ciclo se desarrollaron incluso en ausencia de episodios previos de obesidad en ratones receptores, lo que indica que la configuración del microbioma tras la dieta junto con una prueba de provocación inductora de obesidad secundaria es suficiente para inducir un aumento de fenotipo metabólico. Todos estos datos sugieren que la microbiota tras la dieta contribuye a la predisposición para desarrollar complicaciones metabólicas agravadas tras la reexposición a condiciones inductoras de obesidad.

Ejemplo 9

La composición de microbiota predice la recuperación de peso después de la dieta (además del ejemplo 4)

Dada la conexión causal anterior entre la configuración del microbioma y la recuperación de peso después de la dieta, los presentes inventores luego preguntaron si la extensión del aumento de peso recidivante podría predecirse por ordenador para cada uno de los ratones en función de su composición de microbiota en el período "nadir" la tras la dieta. Por lo tanto, caracterizaron la composición de microbiota de 25 ratones que habían sido sometidos a una dieta posterior a la obesidad hasta la normalidad metabólica y 25 referencias de NC de peso similar (FIG. 9A). Primero idearon un algoritmo de aprendizaje automatizado, basado únicamente en la composición de la microbiota, destinado a predecir antecedentes de obesidad o falta de ellos (FIG. 4A, véase Métodos). Especialmente, el clasificador aleatorio derivado del bosque predijo los antecedentes de obesidad casi perfectamente (AUC=0,96, FIG. 4B).

Los presentes inventores intentaron a continuación predecir el grado exacto de recuperación de peso de cada ratón tras la exposición secundaria a HFD, basándose en su configuración de microbioma tras la dieta. La predicción basada únicamente en los antecedentes de obesidad (es decir, sin ningún modelo de aprendizaje automatizado empleado) arrojó una precisión de predicción baja ($R=0,21$, FIG. 18G). Por el contrario, una predicción basada en el ADNr 16S que utiliza un esquema de validación cruzada dejando uno fuera funcionó significativamente mejor ($R=0,58$, figura 18H). Sorprendentemente, un algoritmo de dos etapas que primero predice los antecedentes de obesidad y luego predice la recuperación de peso basado en el historial predicho, consiguió una predicción muy precisa del grado de recuperación de peso en cada uno de los ratones ($R=0,72$, FIG. 4D).

Para determinar qué características de la microbiota contribuyen a la capacidad del algoritmo para predecir el grado de aumento de peso, todas las OTU detectadas en los microbiomas fecales se clasificaron según la importancia de la característica para la predicción (FIG. 4E). En particular, un total de 189 OTU contribuyeron a las predicciones del algoritmo y la magnitud de sus contribuciones mostró un continuo sin OTU destacable como contribuyente principal (FIG. 4F). Esto sugiere que la composición de las bacterias comensales en su conjunto, en lugar de un pequeño subconjunto de especies, conduce las alteraciones del microbioma tras la dieta que contribuyen a la predisposición a la obesidad recidivante. Todos estos resultado sugieren que la configuración de la microbiota puede emplearse para predecir los antecedentes de obesidad producida por HFD en ratones así como el grado de recuperación de peso personalizado de las mismas condiciones que producen obesidad.

Ejemplo 10

Los metabolitos modulados por el microbioma contribuyen a la recuperación de peso después de la dieta (además del Ejemplo 5)

A continuación, los presentes inventores determinaron si la modulación del microbioma durante el período posterior al ciclo de peso podría mejorar el grado de aumento de peso secundario y sus complicaciones metabólicas. Con este objetivo, realizaron un trasplante diario de microbioma fecal (FMT) durante 4 semanas, utilizando microbiomas

de donantes sin tratamiento previo o tras la dieta transferidos a ratones colonizados en ciclos de pérdida-recuperación de peso durante el punto de tiempo 'nadir' después de la dieta (FIG. 9A). Tras el trasplante, las diferencias de composición entre la microbiota de los ratones anteriormente en el ciclo de pérdida-recuperación de peso y referencias persistieron en los correspondientes receptores de FMT (figuras 18I-K). En especial, los receptores de un microbioma 'sano' sin ciclo durante el período 'nadir' de posobesidad mostraron un aumento de peso secundario mejorado (FIG. 9B y figuras 18L-M), intolerancia reducida a la glucosa (FIG. 9C y FIG. 18N), disminución de la grasa corporal (figuras 9D, E) y aumento de la masa magra (FIG. 18O) en comparación con los ratones sometidos a un FMT de control con un microbioma "posciclo". Estos resultados indican que la restauración de la función normal de la microbiota después de la dieta puede evitar el agravamiento de los trastornos metabólicos tras recuperar el peso.

Dada la eficacia de la FMT, los presentes inventores buscaron obtener más información sobre cómo el reabastecimiento de microbiota mejora la propensión a la obesidad recidivante después de la pérdida de peso. Con este fin, compararon longitudinalmente el perfil de la metabolómica fecal entre ratones sometidos a ciclos de pérdida-recuperación de peso inducidos por HFD y ratones alimentados con NC de referencia. Normalizaron los niveles de metabolitos en los ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso a los de las referencias de NC de la misma edad en cada punto de tiempo y a continuación clasificaron cada metabolito según los patrones temporales. Como era de esperar, la HFD provocó alteraciones importantes en el metaboloma fecal, que se revirtieron parcialmente con la pérdida de peso posterior (figuras 9F, G y 19A-D). Sin embargo, en casi la mitad de todos los metabolitos alterados por la HFD, incluidos varios ácidos biliares, los cambios producidos por la obesidad persistieron después del retorno a la normalidad fenotípica (figuras 9F, G y 19E-H).

Entre los metabolitos más significativamente agotados por la HFD cuyos niveles no se recuperaron tras la recuperación de la salud metabólica estaban los flavonoides dietéticos, apigenina y naringenina (figuras 9F-I). Ambos compuestos permanecieron suprimidos hasta 15 semanas después de la normalización del peso (figuras 9H-I). Los flavonoides son compuestos dietéticos comúnmente ingeridos que son metabolizados por la microbiota intestinal. La contribución del microbioma a los niveles de flavonoides intestinales fue evidente a partir de los niveles elevados de apigenina y naringenina en ratones tratados con antibióticos o sin gérmenes (FIG. 9J). Por lo tanto, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que una combinación de disponibilidad de flavonoides en la dieta y capacidad degradante de flavonoides mediada por microbiomas puede contribuir al conjunto total de flavonoides intestinales. Con este fin, siguieron la cinética de los flavonoides, de la enzima flavonoide biosintética chalcona sintasa y de la enzima flavonoide degradadora flavonona 4-reductasa (FIG. 19I y Tabla 1 complementaria), durante el transcurso de un ciclo de obesidad/pérdida de peso (FIG. 20A).

Durante la obesidad primaria, la baja disponibilidad de flavonoides en la HFD (FIG. 20B) unida a un cambio de microbioma hacia una configuración de degradación de flavonoides contribuyó a las bajas concentraciones de flavonoides intestinales (figuras 9H, I), como es evidente por el aumento de flavanona 4-reductasa, y no de chalcona sintasa (figuras 20C, D). Durante la inducción de la pérdida de peso por vuelta a la dieta NC, la disponibilidad de flavonoides en la dieta volvió a su nivel normalmente alto (FIG. 20B), pero las concentraciones de flavonoides intestinales permanecieron persistentemente bajas, incluidas las de eriodictiol derivado de naringenina (figuras 9H, I y 20E.) En esta fase 'nadir', el microbioma degradante de flavonoides contribuyó a las bajas concentraciones de flavonoides, como lo sugiere la flavanona 4-reductasa continuamente elevada (FIG. 20C) y por el efecto del tratamiento con antibióticos durante la fase de reducción de peso, que disminuyeron las concentraciones de flavonona 4-reductasa (figuras 20F) y normalizaron las concentraciones de flavonoides (FIG. 9K). Tras la inducción secundaria aguda de la obesidad (figura 20G), la combinación de baja disponibilidad de flavonoides en la dieta (figura 20B), junto con la presencia de larga duración de un microbioma degradante de flavonoides y concentraciones bajas de flavonoides asociadas, contribuyeron probablemente a reducir las concentraciones de flavonoides en ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso en comparación con las referencias que experimentan un aumento de peso primario (figuras 20H, I).

Se ha publicado que la apigenina y la naringenina afectan la ingesta de alimentos, la diferenciación de adipocitos y el metabolismo de los lípidos. Por lo tanto, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la restauración inducida por FMT de un microbioma sin tratamiento previo que degrada los flavonoides en ratones que realizan el ciclo de pérdida-recuperación de peso, o la reposición directa de flavonoides de estos ratones, puede mejorar el fenotipo de obesidad recidivante agravada. De hecho, la administración oral diaria de ambos flavonoides a ratones tras la dieta durante el 'nadir' después de la dieta y el período de recuperación de peso secundario (FIG. 10A) dio lugar a la normalización de las concentraciones de apigenina y naringenina intestinales para controlar las concentraciones (figuras 20J, K), sin ningún efecto observado en la composición del microbioma (FIG. 20L). Al igual que el FMT, el tratamiento combinado con flavonoides mejoró la tasa de recuperación secundaria de peso (figuras 10B, C y 20M, N), un efecto que también se consiguió administrando únicamente naringenina (figuras 20O, P). En conjunto, estos resultados sugieren que las bajas concentraciones de apigenina y naringenina en ratones tras la dieta contribuyen a una recuperación de peso empeorada, mientras que su reposición terapéutica mejora esta predisposición.

60

Ejemplo 11

Los flavonoides modulan la recuperación de peso después de la dieta y regulan la expresión de UCP-1

Para investigar los posibles mecanismos por los cuales la apigenina y la naringenina mejoran la obesidad recidivante tras la dieta, se compararon los parámetros metabólicos y de comportamiento en los ratones en los ciclos de pérdida-recuperación de peso administrados con flavonoides con los ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso no tratados. Curiosamente, el gasto de energía ajustado al peso se redujo notablemente en los ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso (figuras 10D-F y 21A-F), pero se normalizó tras la administración de flavonoides (figuras 10D-F y 21A-F), lo que sugiere que la apigenina y la naringenina podrían afectar el gasto energético del anfitrión. A destacar que en estudios previos se observó un efecto similar de los flavonoides en el control del peso, mientras que el vínculo entre la administración de complementos de flavonoides y el aumento del gasto energético se alcanzó solo después de la normalización del gasto energético al peso corporal. Otros parámetros metabólicos no se vieron afectados por el tratamiento con flavonoides (figuras 21G-H y 22A-F). Asimismo, los ratones tratados con antibióticos en el período 'nadir' presentaron un gasto energético mejorado tras la nueva administración de HFD (FIG. 10G, figuras 22G-L y 23A-C), en línea con concentraciones más altas de flavonoides (FIG. 9K) y la mejora de la recuperación del peso empeorado (FIG. 3C), pero no alteraron otros parámetros metabólicos durante el aumento de peso recidivante (figuras 23D-L).

Por último, los presentes inventores buscaron posibles mecanismos por los cuales los flavonoides pueden participar en la regulación del gasto energético del anfitrión. Dado que el tejido adiposo pardo (BAT) es un regulador importante de la termogénesis en mamíferos, y dado que otros miembros de la familia de los flavonoides han sido relacionados previamente con la inducción del factor termógeno principal que desacopla la proteína-1 (UCP-1), se analizó la expresión de *Ucp1* en ratones alimentados con NC o HFD y administrados por vía oral con apigenina y naringenina. A partir de dos semanas después del inicio del tratamiento con flavonoides, los niveles de transcripción de *Ucp1* se elevaron significativamente en el BAT de los ratones alimentados con una HFD, pero no en los alimentados con una comida normal (FIG. 10H). Asimismo, la expresión de *Ucp1* se elevó en ratones en ciclos de pérdida-recuperación de peso tras los complementos con apigenina y naringenina durante el período de recuperación de peso inducido por HFD (FIG. 10I). *Ucp1* también fue inducido por flavonoides en explantes de BAT en función de la concentración (FIG. 10J), lo que sugiere un efecto directo de la apigenina y la naringenina sobre la modulación de la expresión génica en BAT. Dado que el tratamiento con antibióticos elevó las concentraciones de flavonoides intestinales (FIG. 9K) y el gasto de energía del anfitrión (FIG. 10G y Figuras 22H, I), los presentes inventores determinaron los niveles de UCP-1 en el BAT de ratones de ciclo de peso tratados con antibióticos. De hecho, tanto los niveles de transcripción como de proteína de UCP-1 se constató que eran elevados en el grupo que recibió antibióticos (figuras 10K, M), lo que proporciona una posible explicación mecanicista para observaciones recientes de inducción de *Ucp1* en ratones sin gérmenes.

En conjunto, estas asociaciones sugieren un modelo en el que HFD favorece el crecimiento de bacterias que metabolizan flavonoides, que a su vez disminuye la cantidad de flavonoides biodisponibles, regulando de ese modo negativamente el gasto de energía conducida por UCP-1 y favoreciendo el aumento de peso recidivante (figura 10N). La validación completa de este modelo merece futuros estudios que investiguen si el efecto flavonoide en la expresión de *Ucp1* de BAT conduce directamente un mayor gasto de energía y, por consiguiente, contribuye a mejorar la recuperación de peso.

40 Referencias

1. Stevens, J., Oakkar, E. E., Cui, Z., Cai, J. & Truesdale, K. P. US adults recommended for weight reduction by 1998 and 2013 obesity guidelines, NHANES 2007-2012. *Obesity* 23, 527-531, doi:10.1002/oby.20985 (2015).
2. Tobias, D. K. *et al.* Effect of low-fat diet interventions versus other diet interventions on long-term weight change in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3, 968-979, doi:10.1016/S2213-8587(15)00367-8 (2015).
3. Anastasiou, C. A., Karfopoulou, E. & Yannakoulia, M. Weight regaining: From statistics and behaviors to physiology and metabolism. *Metabolism* 64, 1395-1407, doi:10.1016/j.metabol.2015.08.006 (2015).
4. Pietilainen, K. H., Saarni, S. E., Kaprio, J. & Rissanen, A. Does dieting make you fat? A twin study. *Int. J. Obes. (Lond)* 36, 456-464, doi:10.1038/ijo.2011.160 (2012).
5. Neumark-Sztainer, D. *et al.* Obesity, disordered eating, and eating disorders in a longitudinal study of adolescents: how do dieters fare 5 years later? *J. Am. Diet. Assoc.* 106, 559-568, doi:10.1016/j.jada.2006.01.003 (2006).
6. Saarni, S. E., Rissanen, A., Sarna, S., Koskenvuo, M. & Kaprio, J. Weight cycling of athletes and subsequent weight gain in middleage. *Int. J. Obes. (Lond)* 30, 1639-1644, doi:10.1038/sj.ijo.0803325 (2006).

7. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031, doi:10.1038/nature05414 (2006).
8. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023, doi:10.1038/4441022a (2006).
- 5 9. Korem, T. *et al.* Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science* 349, 1101-1106, doi:10.1126/science.aac4812 (2015).
10. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559-563, doi:10.1038/nature12820 (2014).
- 10 11. Ma, X. *et al.* Celastrol Protects against Obesity and Metabolic Dysfunction through Activation of a HSF1-PGC1alpha Transcriptional Axis. *Cell metabolism* 22, 695-708, doi:10.1016/j.cmet.2015.08.005 (2015).
12. Liu, J., Lee, J., Salazar Hernández, M. A., Mazitschek, R. & Ozcan, U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell* 161, 999-1011, doi:10.1016/j.cell.2015.05.011 (2015).
13. Elinav, E. *et al.* Pegylated leptin antagonist is a potent orexigenic agent: preparation and mechanism of activity. *Endocrinology* 150, 3083-3091, doi:10.1210/en.2008-1706 (2009).
- 15 14. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research* 44, D457-462, doi:10.1093/nar/gkv1070 (2016).
15. Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe* 3, 213-223, doi:10.1016/j.chom.2008.02.015 (2008).
- 20 16. Pothuraju, R., Sharma, R. K., Chagalamarri, J., Kavadi, P. K. & Jangra, S. Influence of milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* NCDC 17 alone and in combination with herbal ingredients on diet induced adiposity and related gene expression in C57BL/6J mice. *Food Funct.* 6, 3576-3584, doi:10.1039/c5fo00781j (2015).
17. Bongaerts, G. P. & Severijnen, R. S. A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nat. Biotechnol.* 34, 55-63, doi:10.1038/nbt.3436 (2016).
- 25 18. Zeevi, D. *et al.* Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell* 163, 1079-1094, doi:10.1016/j.cell.2015.11.001 (2015).
19. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451-455, doi:10.1038/nature12726 (2013).
- 30 20. Smith, P. M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 569-573, doi:10.1126/science.1241165 (2013).
21. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* 163, 1428-1443, doi:10.1016/j.cell.2015.10.048 (2015).
22. Lee, C. H. *et al.* Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315, 142-149, doi:10.1001/jama.2015.18098 (2016).
- 35 23. Myoung, H. J., Kim, G. & Nam, K. W. Apigenin isolated from the seeds of *Perilla frutescens* britton var *crispa* (Benth.) inhibits food intake in C57BL/6J mice. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1741-1746, doi:10.1007/s12272-010-1105-5 (2010).
24. Guo, X., Liu, J., Cai, S., Wang, O. & Ji, B. Synergistic interactions of apigenin, naringin, quercetin and emodin on inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation and pancreas lipase activity. *Obes. Res. Clin. Pract.*, doi:10.1016/j.orcp.2015.08.004 (2015).
- 40 25. Assini, J. M. *et al.* Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21. *Endocrinology* 156, 2087-2102, doi:10.1210/en.2014-2003 (2015).
- 45 26. Zar Kalai, F. *et al.* Antiobesity Effects of an Edible Halophyte *Nitraria retusa* Forssk in 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation and in C57B6/J Mice Fed a High Fat Diet-Induced Obesity. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013, 368658, doi:10.1155/2013/368658 (2013).

27. Carmody, R. N. *et al.* Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell host & microbe* 17, 72-84, doi:10.1016/j.chom.2014.11.010 (2015).
28. Sonnenburg, E. D. *et al.* Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* 529, 212-215, doi:10.1038/nature16504 (2016).
- 5 29. Ridaura, V. K. *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341, 1241214, doi:10.1126/science.1241214 (2013).
30. Escande, C. *et al.* Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* 62, 1084-1093, doi:10.2337/db12-1139 (2013).
- 10 31. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241, doi:10.1016/j.cell.2004.07.002 (2004).
32. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7, 335-336, doi:10.1038/nmeth.f.303 (2010).
- 15 33. Elinav, E. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745-757, doi:10.1016/j.cell.2011.04.022 (2011).
34. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65, doi:10.1038/nature08821 (2010).
- 20 35. Aaron, J. *et al.* Polarization microscopy with stellated gold nanoparticles for robust monitoring of molecular assemblies and single biomolecules. *Optics express* 16, 2153-2167 (2008).
36. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28, 27-30 (2000).
37. Kanehisa, M. *et al.* Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research* 42, D199-205, doi:10.1093/nar/gkt1076 (2014).

25 **Listado de secuencias**

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd. ELINAV, Eran SEGAL, Eran
<120> Diagnóstico, predicción y tratamiento de la obesidad recidivante basados en el microbioma

<130> 68700

30 <150> US 62/295, 094
<151> 14-02-2016

<150> US 62/423,299
<151> 17-11-2016

35 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<220>
<221> característica_misc

50 <222> (1)..(8)
<223> n e s a , c , g o t

<400> 1

ES 2 771 223 T3

nnnnnnnnag agttgatcc tggctcag 28

<210> 2

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

10

<400> 2

tgctgcctcc cgtaggagt 19

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar la probabilidad de recuperar peso en un sujeto que ha alcanzado un peso objetivo poniendo en práctica un programa de pérdida de peso, comprendiendo el método determinar una cantidad o presencia de al menos un microbio y/o producto del mismo en el microbioma intestinal del sujeto, en donde la cantidad de al menos dicho microbio se altera durante un período de aumento de peso previo del sujeto para alcanzar una cantidad representativa de un sujeto obeso y además en donde la cantidad de al menos dicho microbio se mantiene en dicha cantidad después dicho programa de pérdida de peso, en donde la cantidad o presencia de al menos dicho microbio o producto del mismo es predictiva de recuperación de peso.
- 5
2. Un método para controlar la eficacia de un adyuvante dietético en un sujeto que comprende analizar en un microbioma del sujeto la presencia o la cantidad de un microbio en la familia *Weeksellaceae* y/o uno de sus productos, un microbio en la familia *Tissierellaceae* y/o uno de sus productos, un microbio del género *Lactobacillus* y/o uno de sus productos, un microbio del género *Bacteroides* y/o uno de sus productos, un microbio de la clase *Mollicutes* y/o uno de sus productos, un microbio de la clase *Gammaproteobacteria* y/o uno de sus productos, un microbio en el tipo *Actinobacteria* y/o uno de sus productos, un microbio en el tipo *Tenericutes* y/o uno de sus productos, un microbio en la especie *Bacteroides acidifaciens* y/o uno de sus productos, y un microbio en la especie *Bacteroides uniformis* y/o uno de sus productos;
- 10
- 15
- en donde la cantidad o la presencia de cada uno de dichos microbios o producto de los mismos es indicativo de la eficacia de un adyuvante para la dieta, habiéndose tratado dicho sujeto con dicho adyuvante para la dieta.
3. El método de la reivindicación 1, en donde al menos dicho microbio está presente de manera diferencial en el microbioma intestinal del sujeto en comparación con el microbioma intestinal de una referencia no obesa que no se ha sometido a un programa de pérdida de peso.
- 20
4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto de las mismas es un metabolito.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto que ha alcanzado un peso objetivo ha terminado dicho programa de pérdida de peso.
- 25
6. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho análisis se efectúa en una muestra fecal del sujeto.
7. El método de la reivindicación 1, en donde al menos dicho microbio está en la familia *Weeksellaceae* o *Tissierellaceae*, en el género *Lactobacillus* o *Bacteroides*, en la clase *Mollicutes* o *Gammaproteobacteria*, en el tipo *Actinobacteria* o *Tenericutes* o en la especie *Bacteroides acidifaciens* o *Bacteroides uniformis*.

FIG. 1A

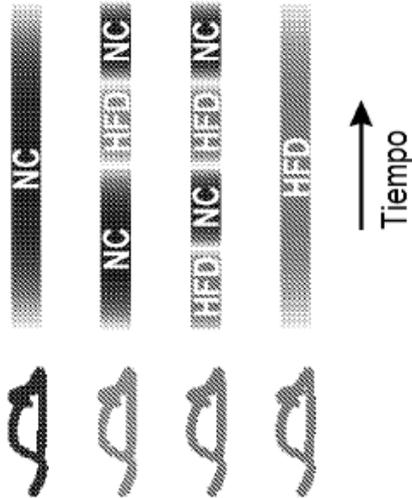


FIG. 1B

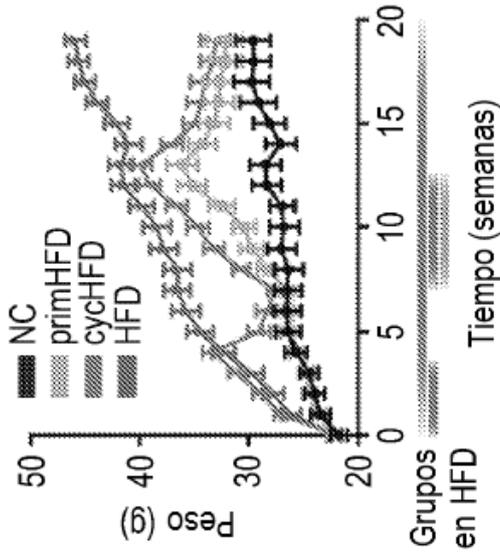


FIG. 1C

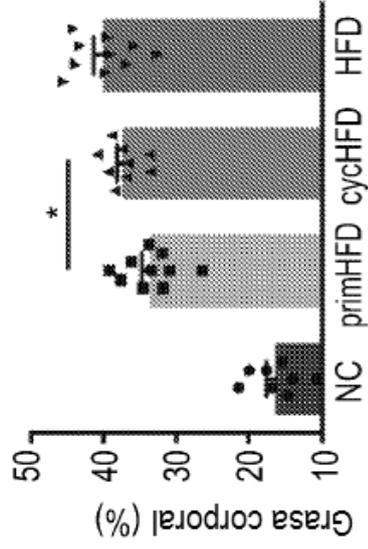


FIG. 1D

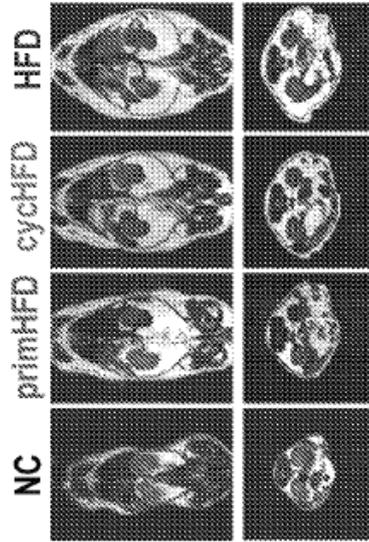


FIG. 1E

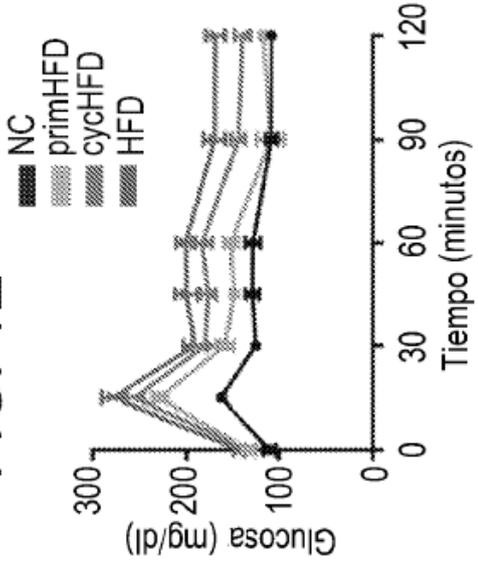


FIG. 1F

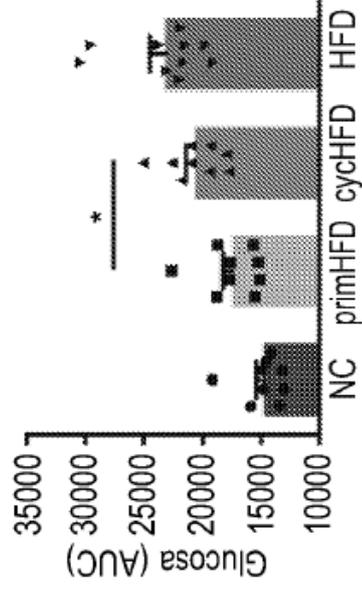


FIG. 1G

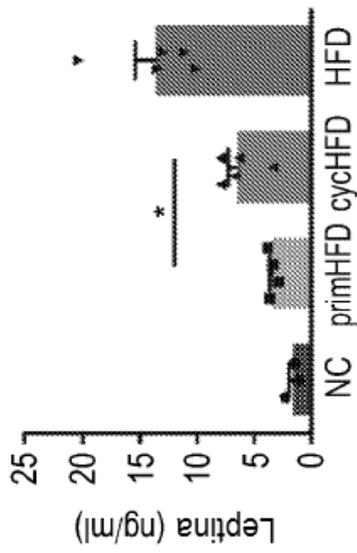


FIG. 1H

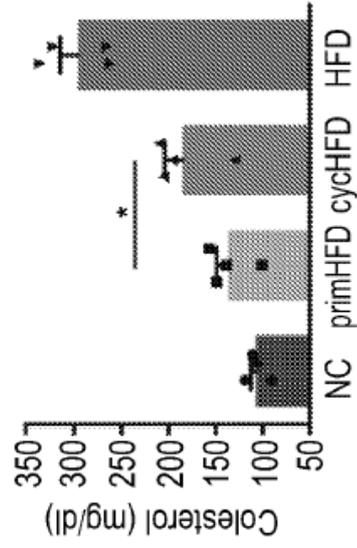


FIG. 1I

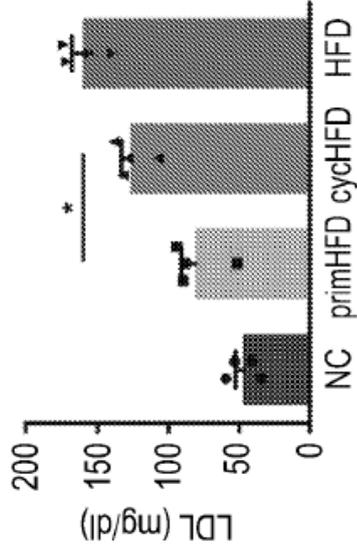


FIG. 1J

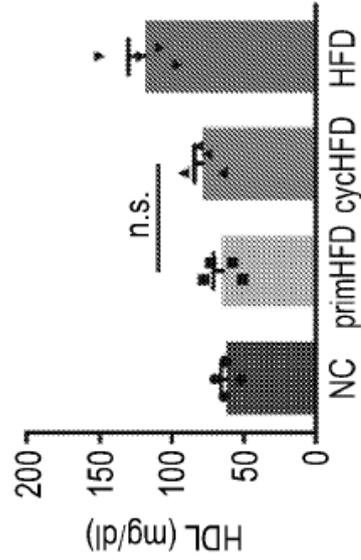


FIG. 1K

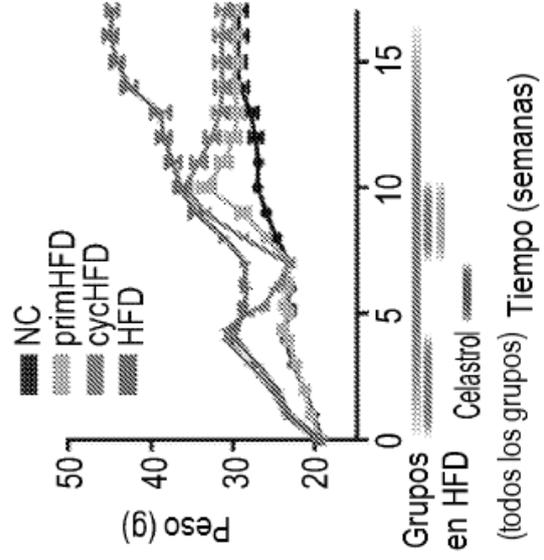
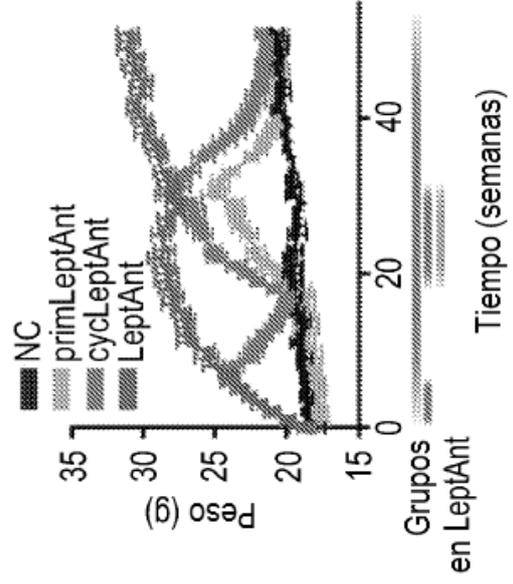


FIG. 1L



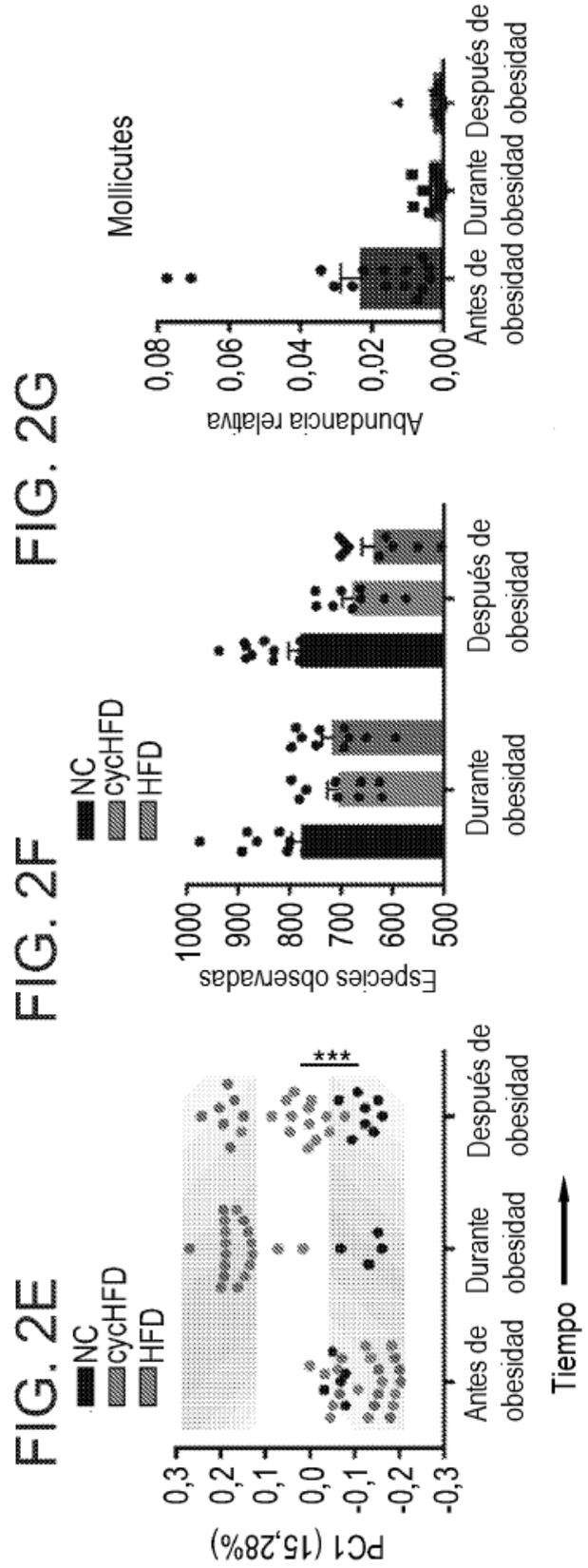
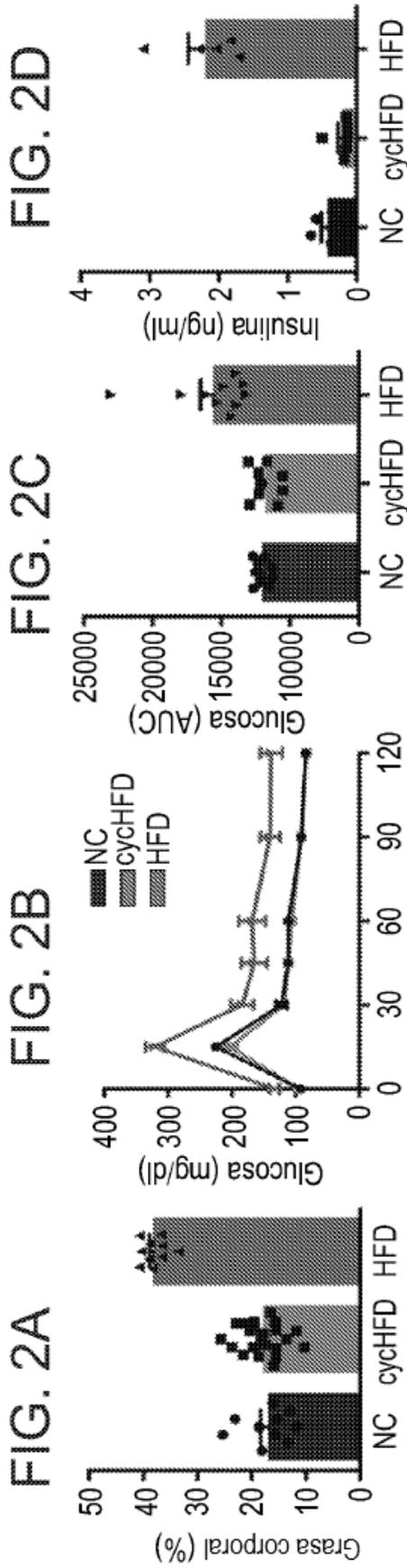


FIG. 2H

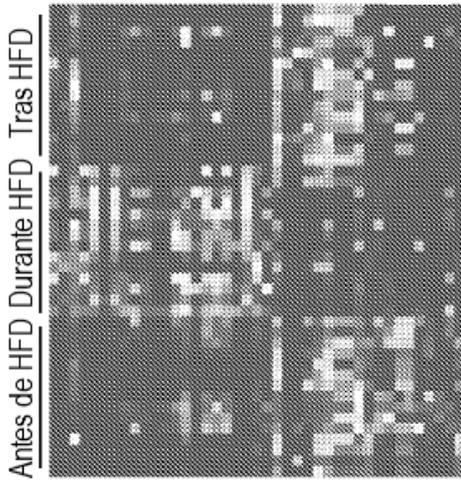


FIG. 2I

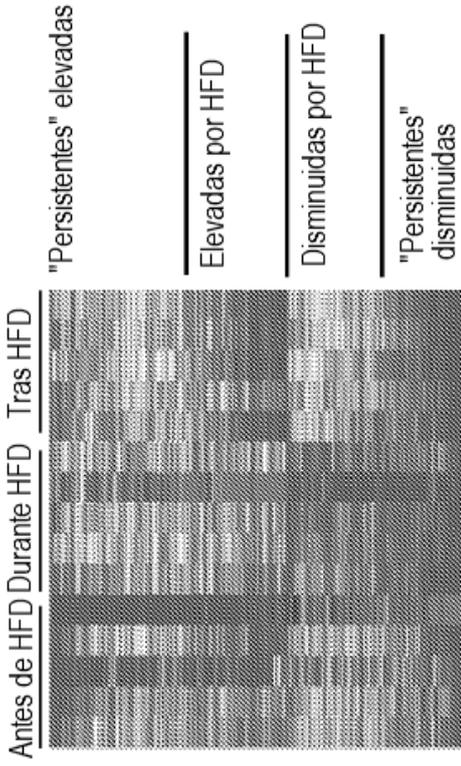


FIG. 2J

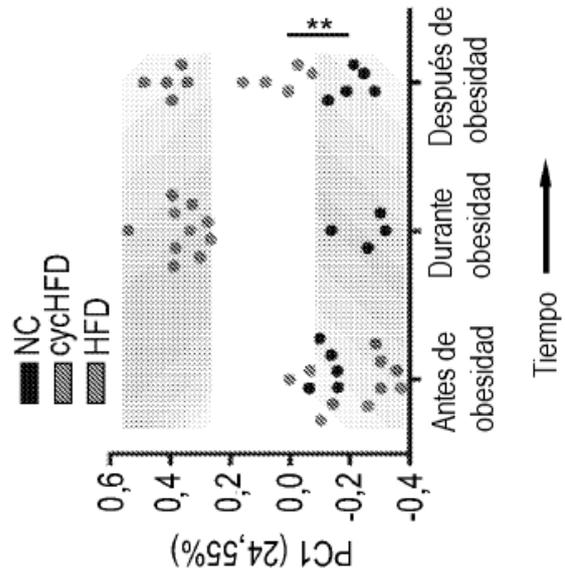


FIG. 2K

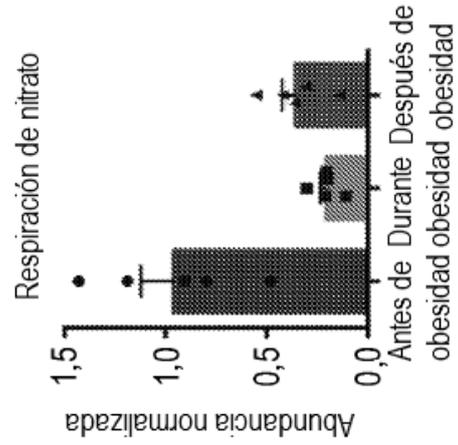


FIG. 2L

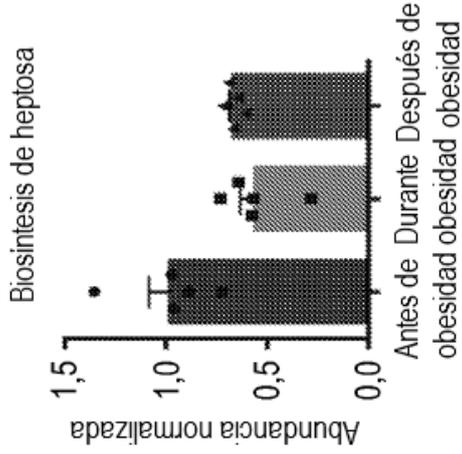


FIG. 3A

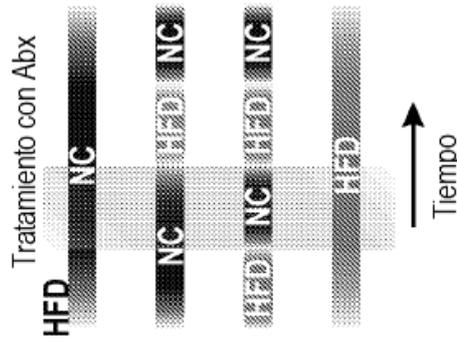


FIG. 3B

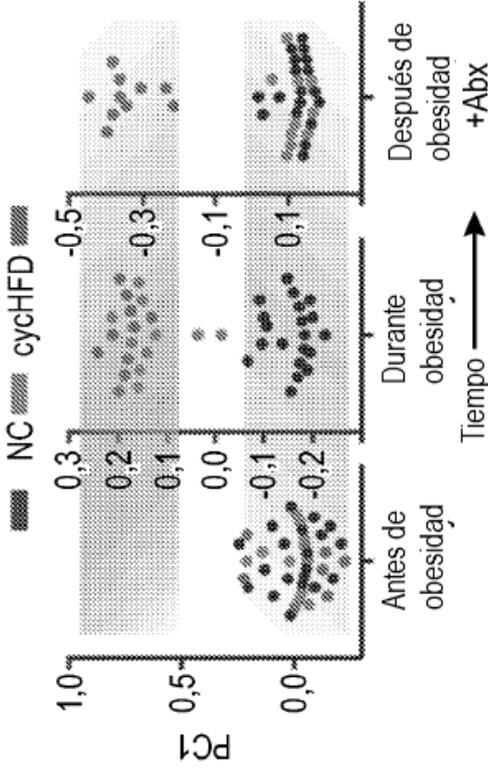


FIG. 3C

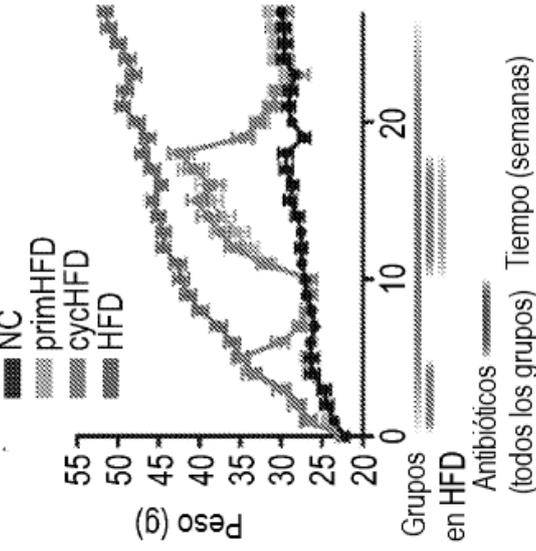


FIG. 3D

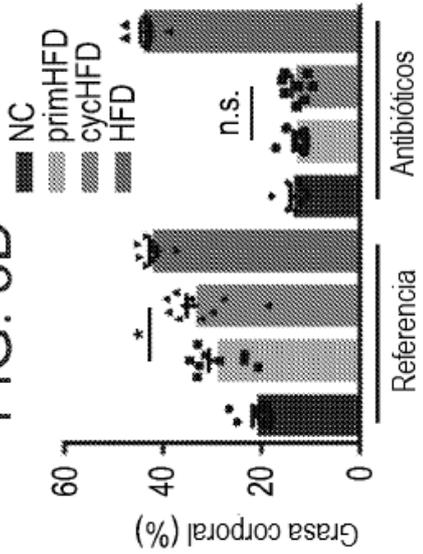


FIG. 3E

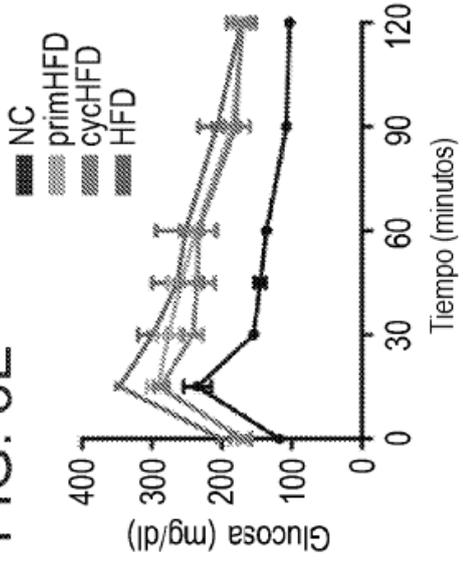


FIG. 3F

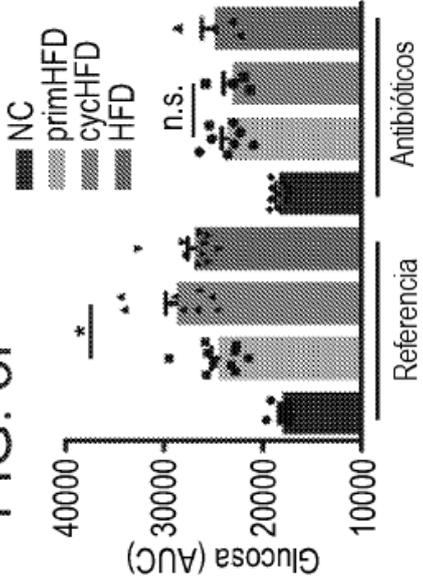


FIG. 3G

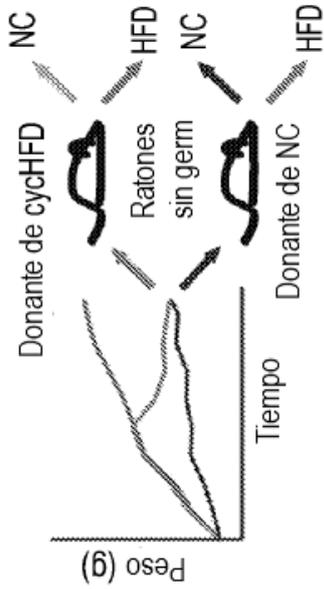


FIG. 3H

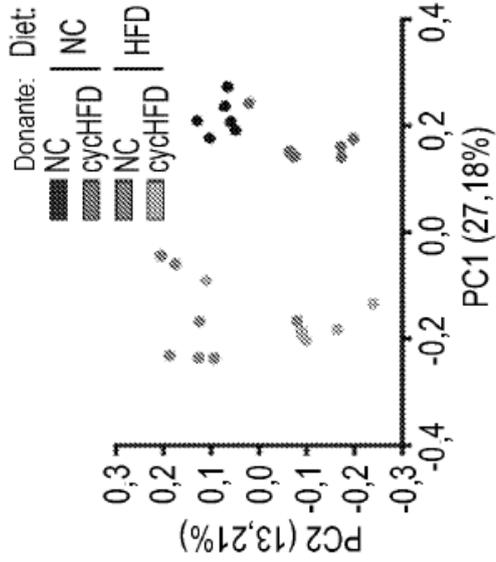


FIG. 3I

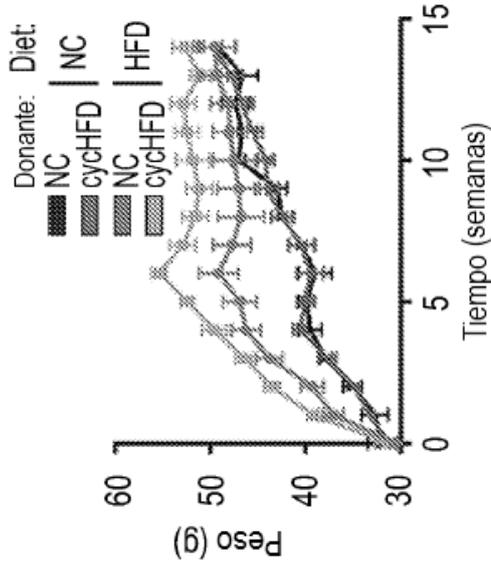


FIG. 3J

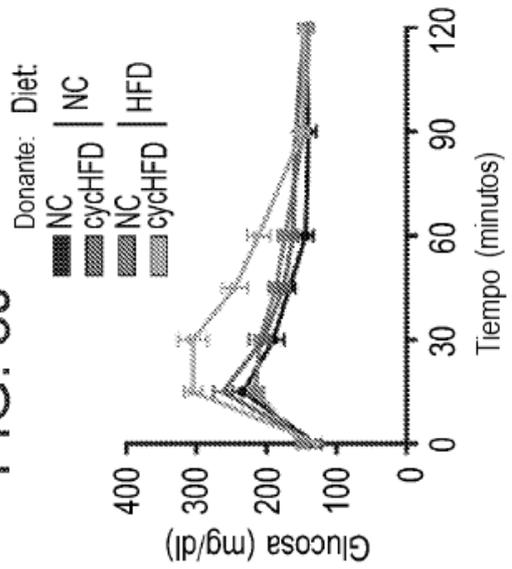


FIG. 3K

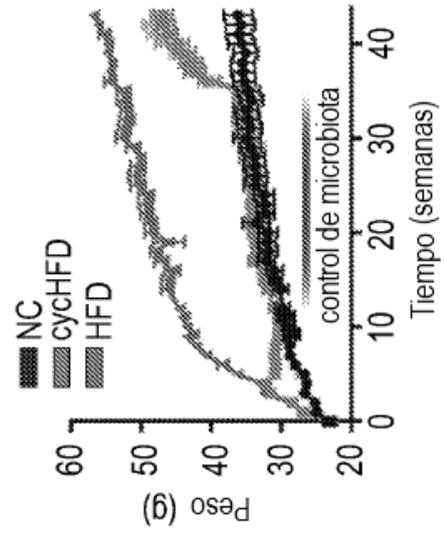


FIG. 3L

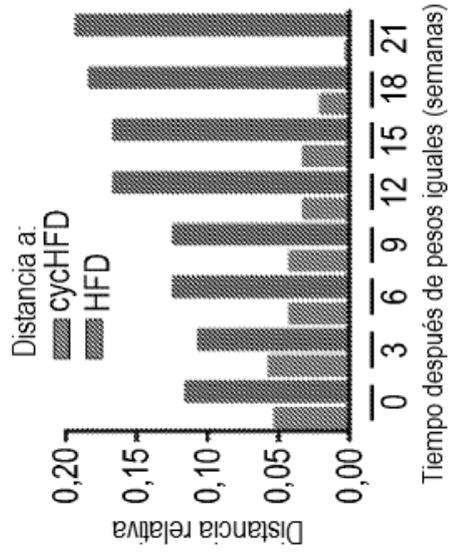
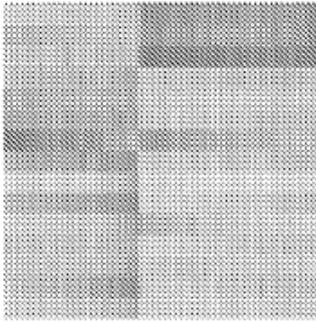


FIG. 4A



Caracterización de microbiota a base de 16S



¿El microbioma es de ratones "ex-obesos"?

FIG. 4B

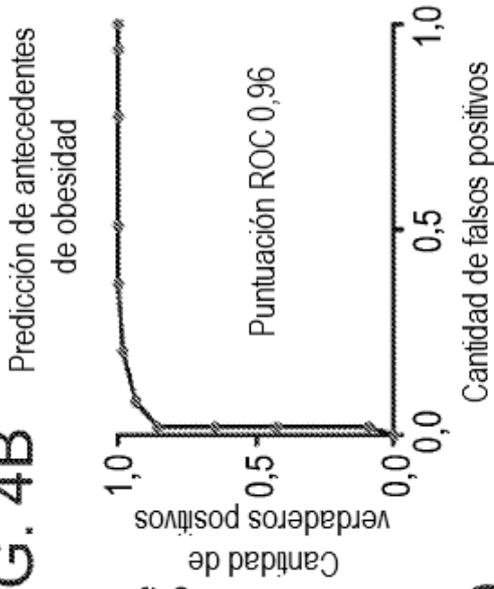


FIG. 4C

¿Cuánto aumento de peso tras alimentación con HFD?

Predicción basada en 16S de aumento de peso

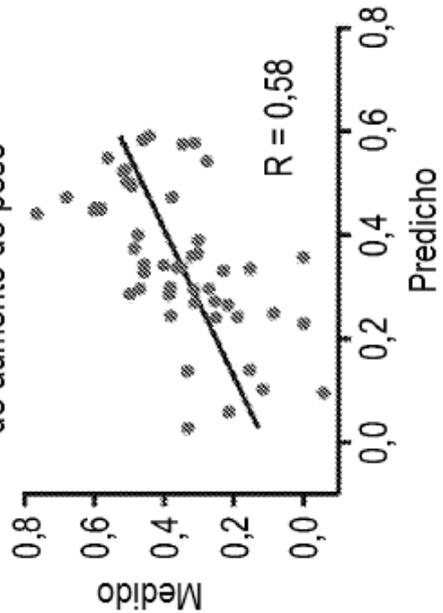


FIG. 4D

Predicción de dos etapas de aumento de peso

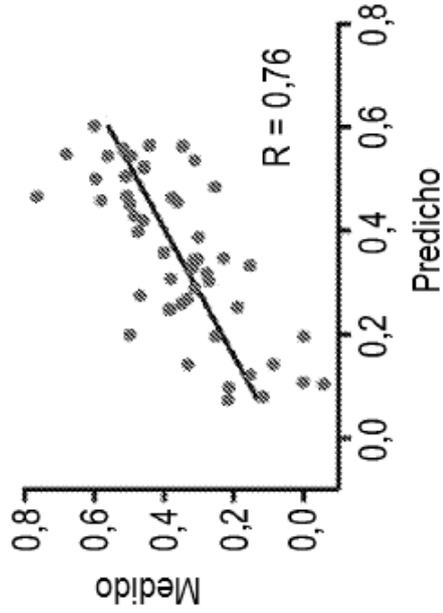


FIG. 4E

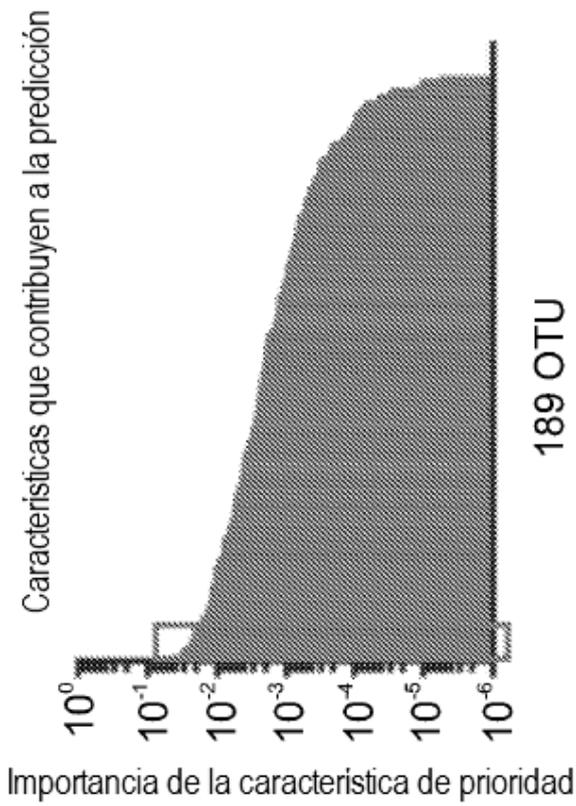


FIG. 4F

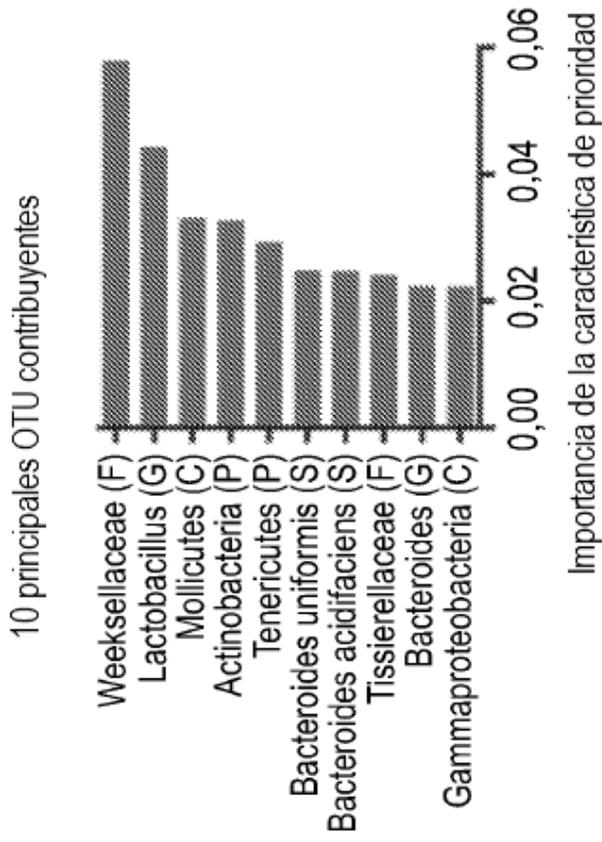


FIG. 5A

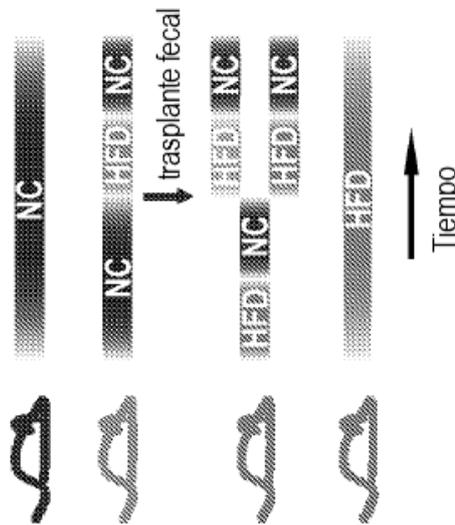


FIG. 5B

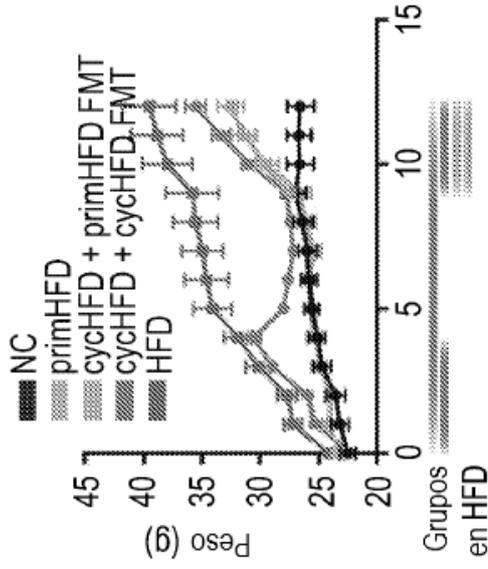


FIG. 5C

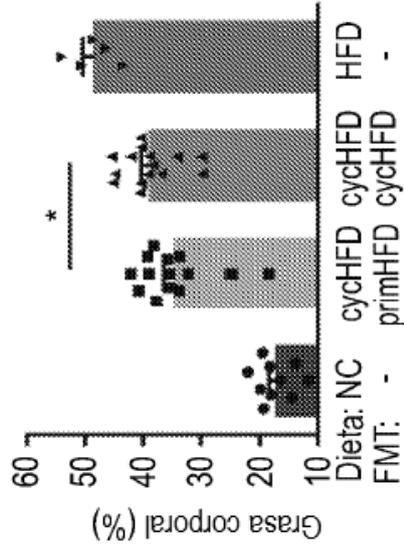


FIG. 5D

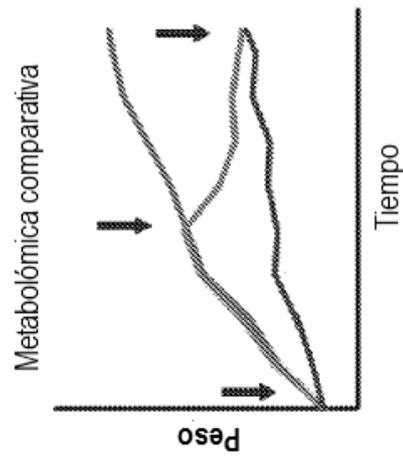


FIG. 5E

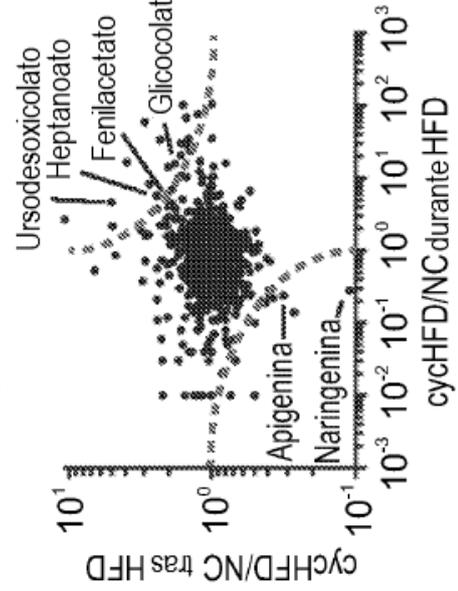


FIG. 5F

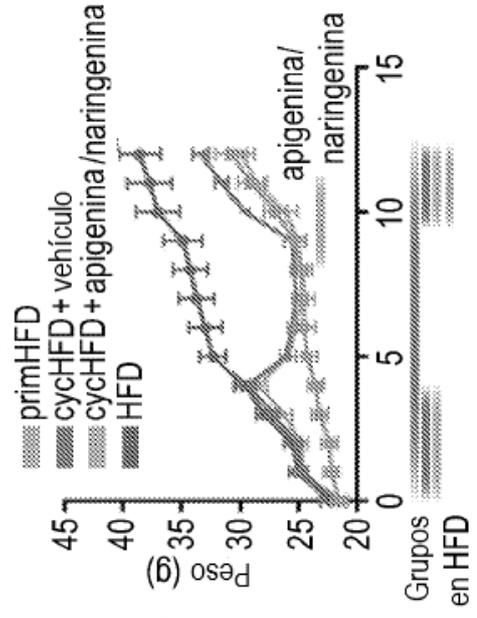


FIG. 6A

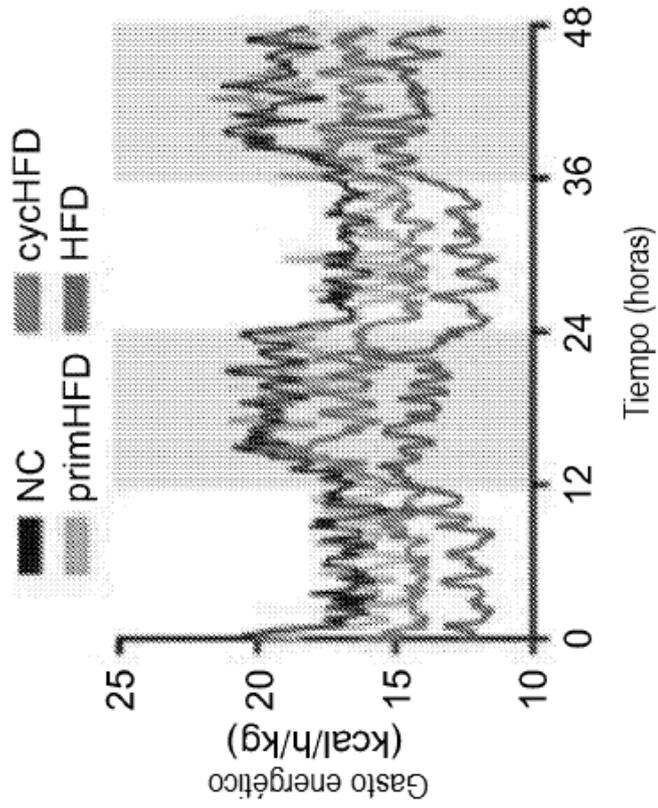
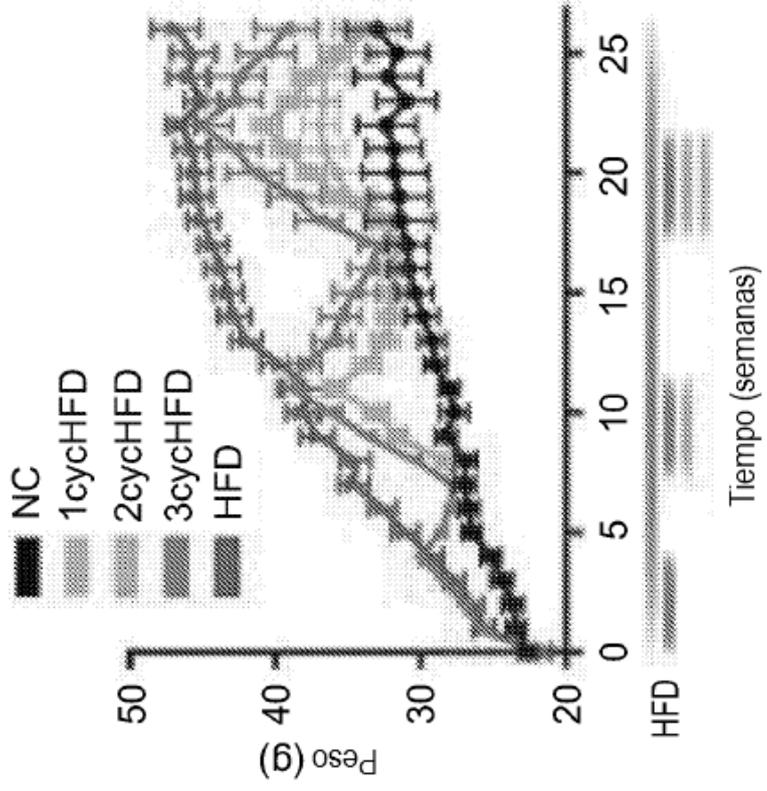


FIG. 6B



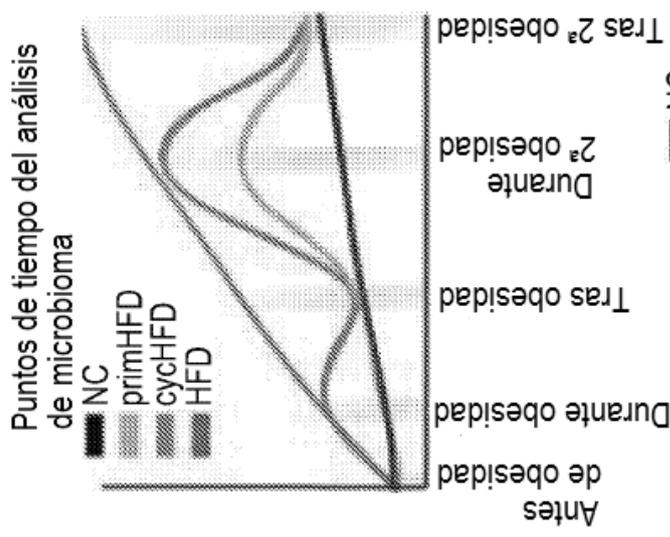


FIG. 7A

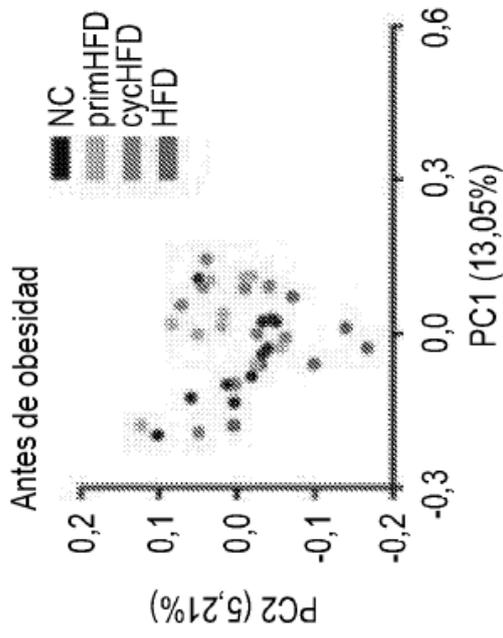


FIG. 7B

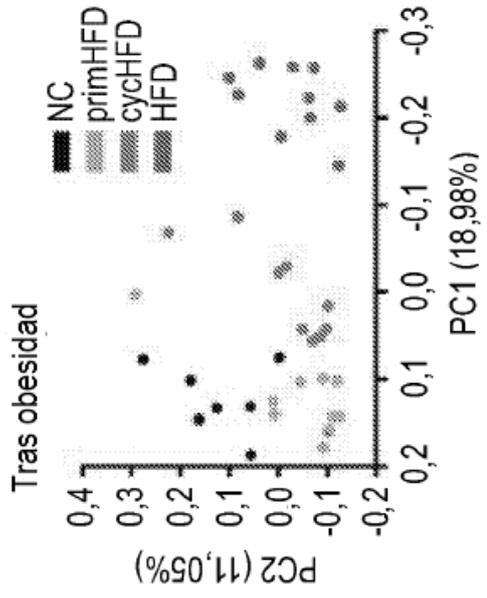


FIG. 7D

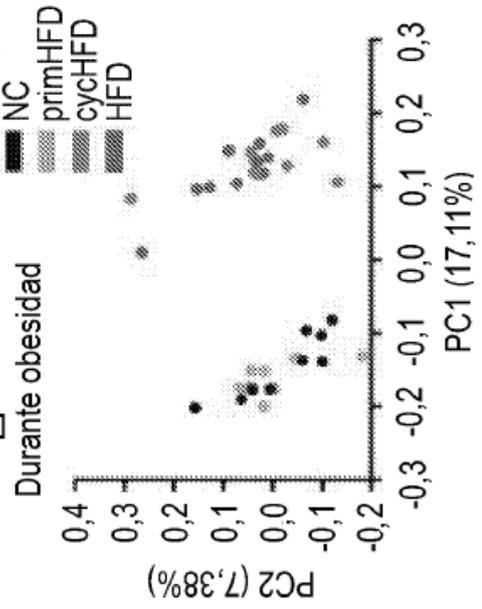


FIG. 7C

FIG. 7E

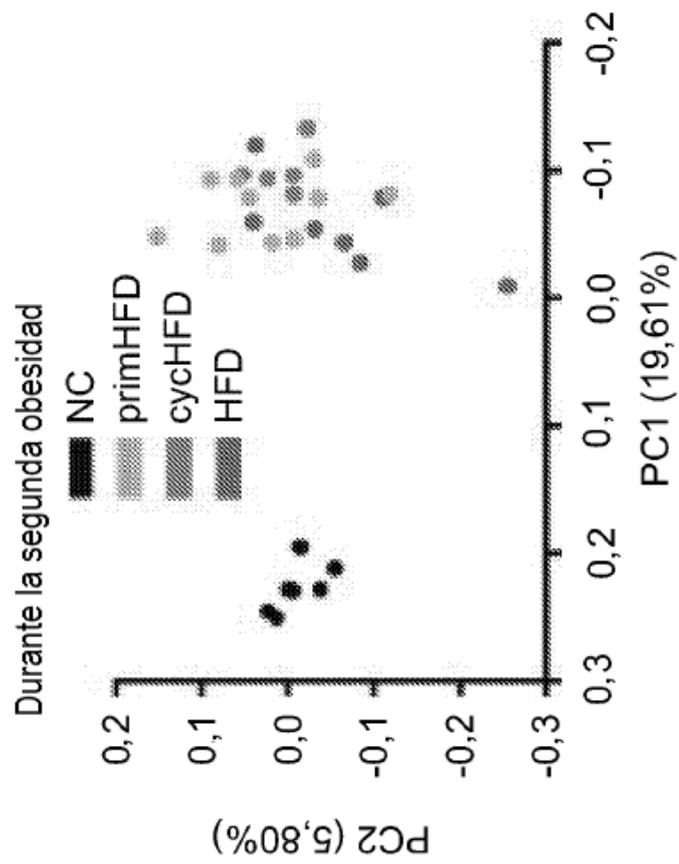


FIG. 7F

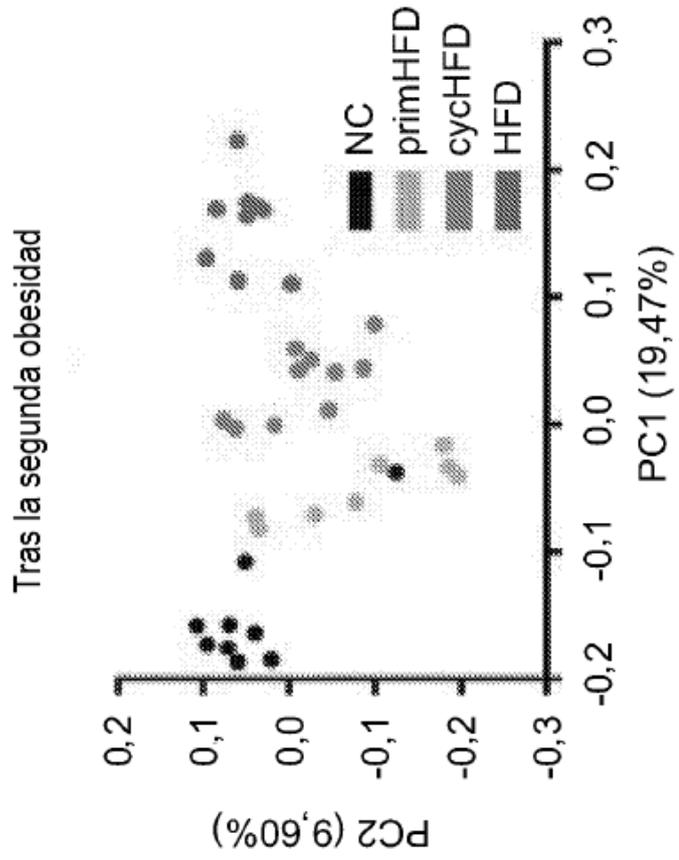


FIG. 7G

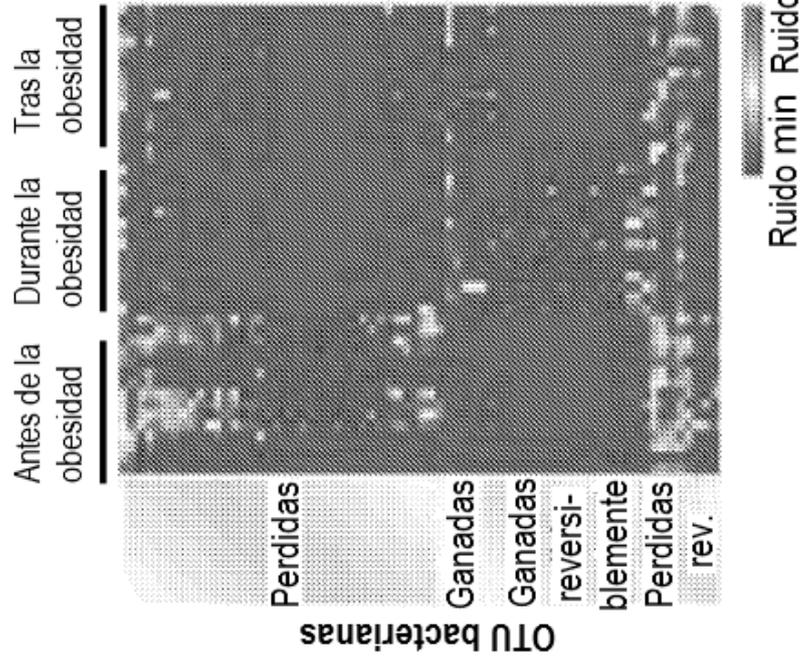


FIG. 7H

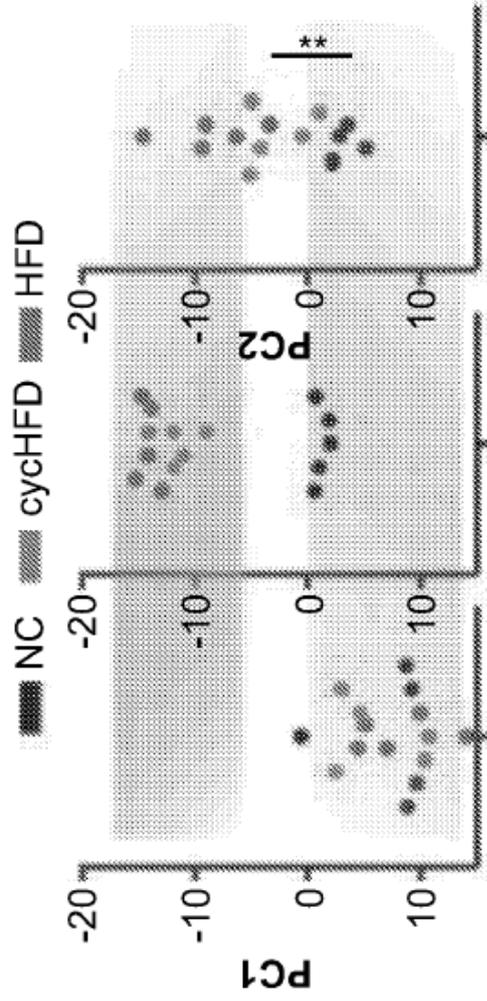


FIG. 71

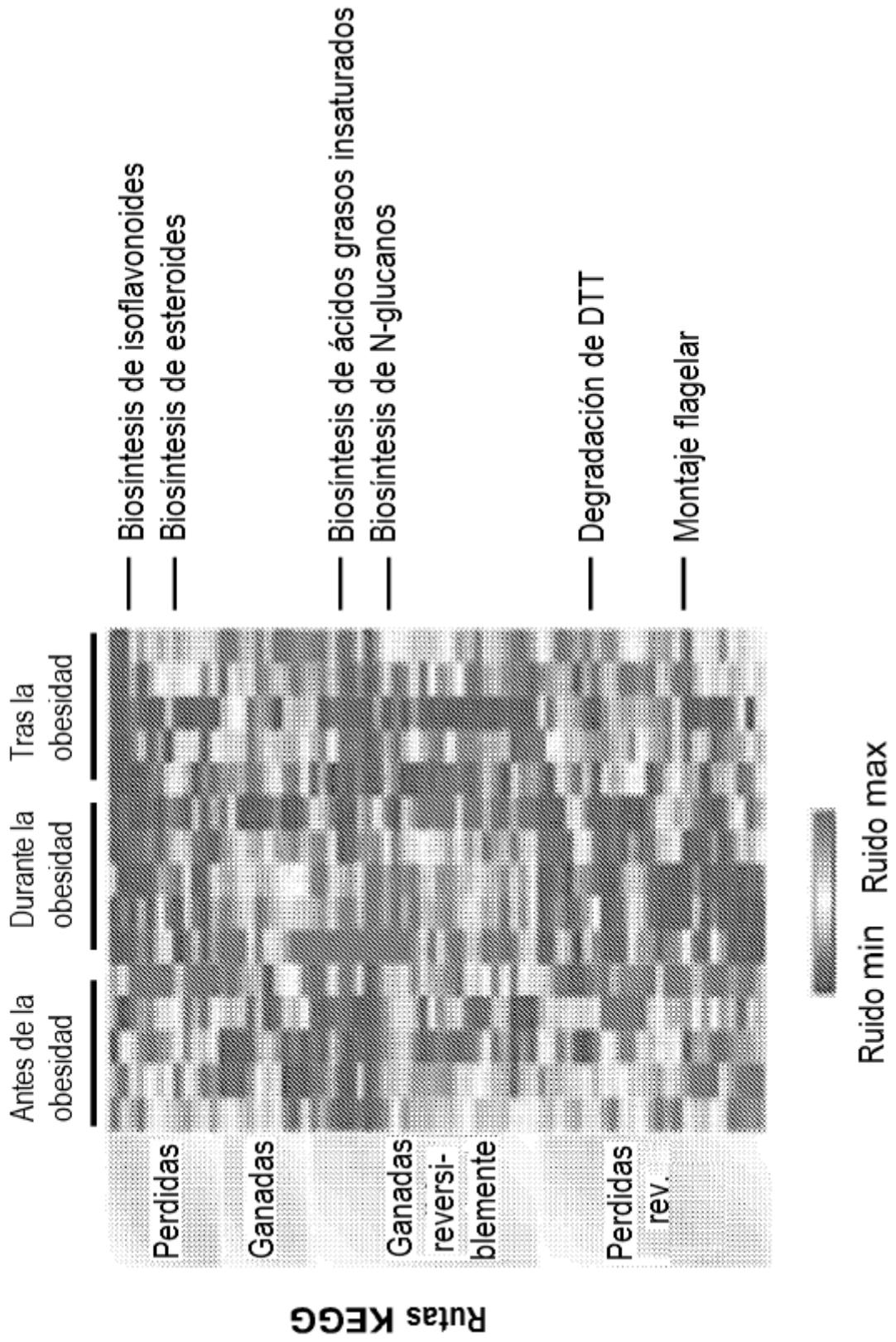


FIG. 8A

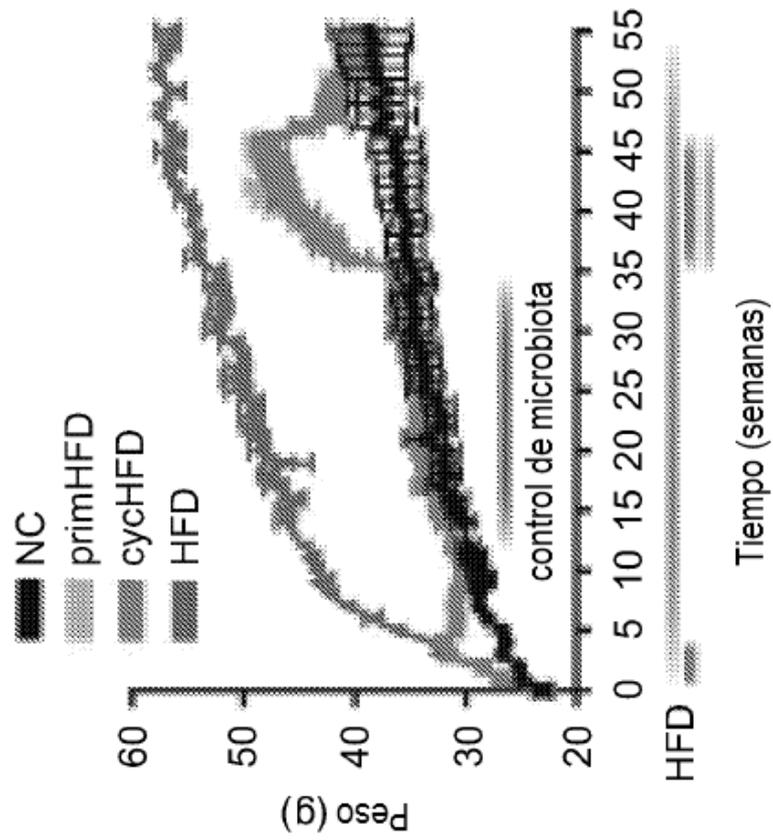


FIG. 8B

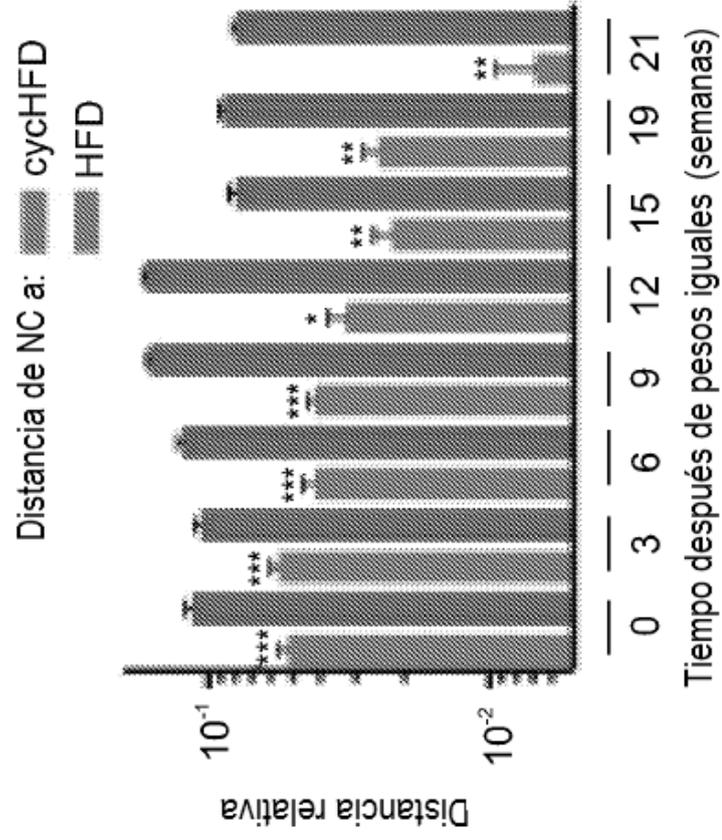


FIG. 9A

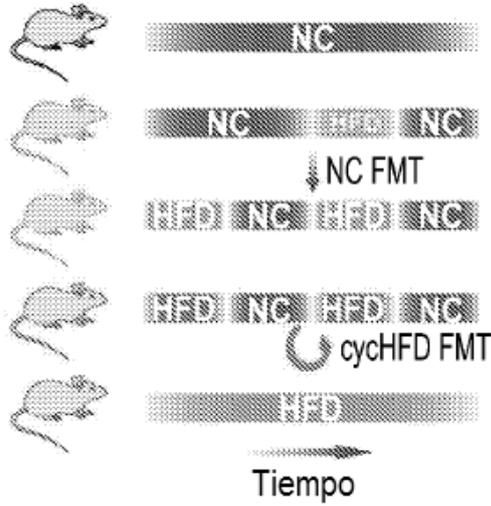


FIG. 9B

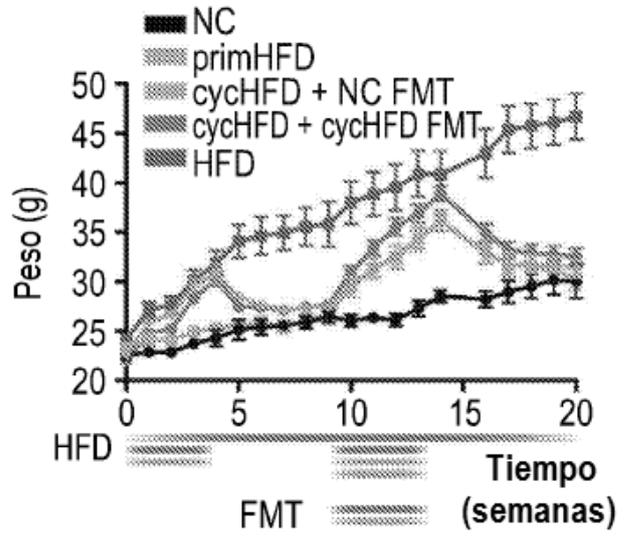


FIG. 9C

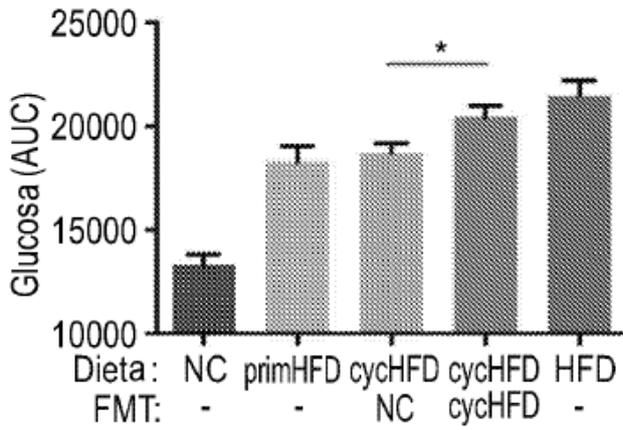


FIG. 9D

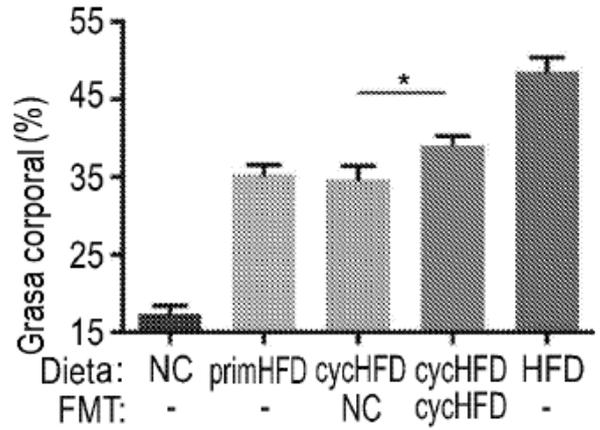


FIG. 9E

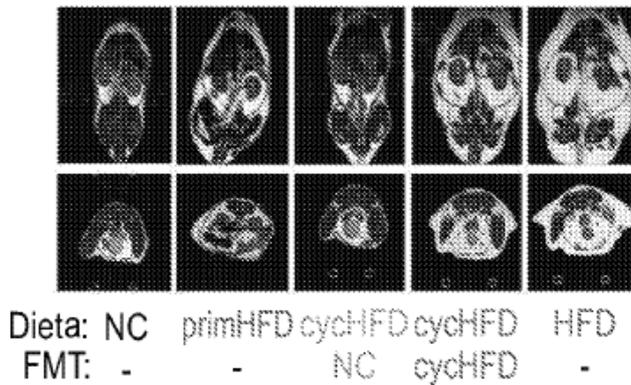


FIG. 9F

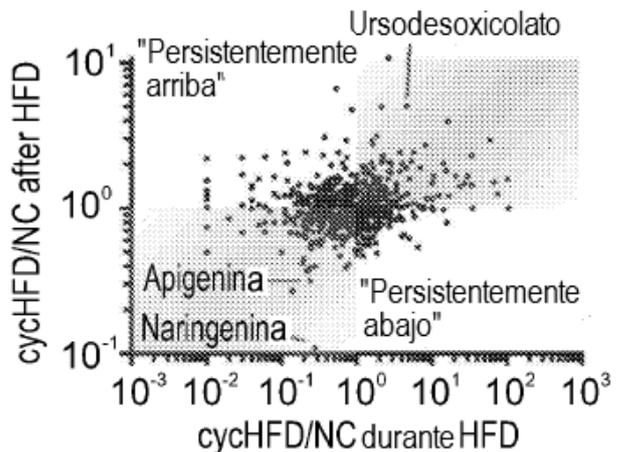


FIG. 9G

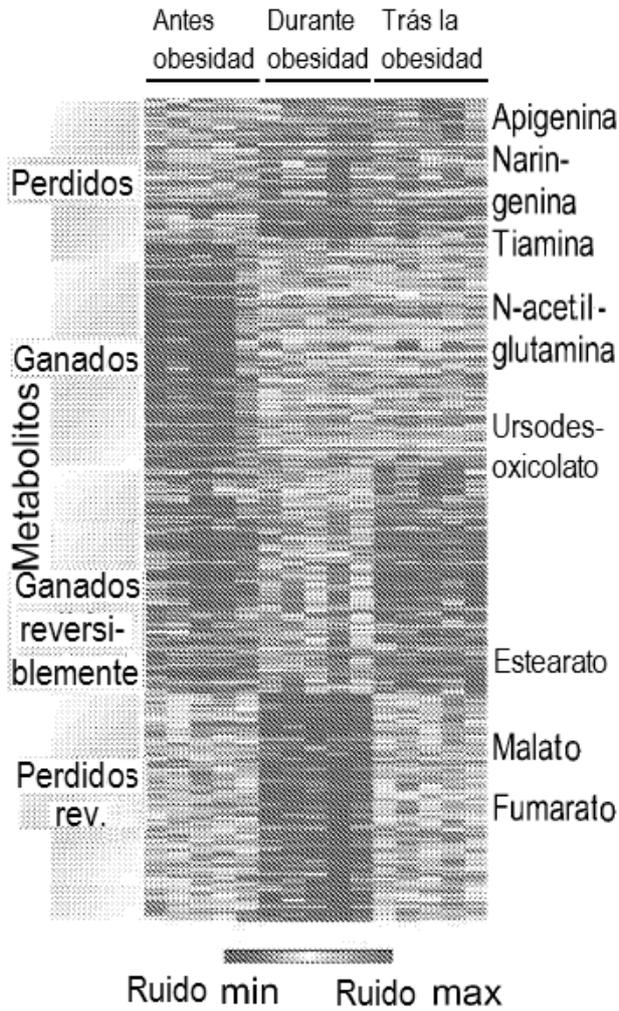


FIG. 9H

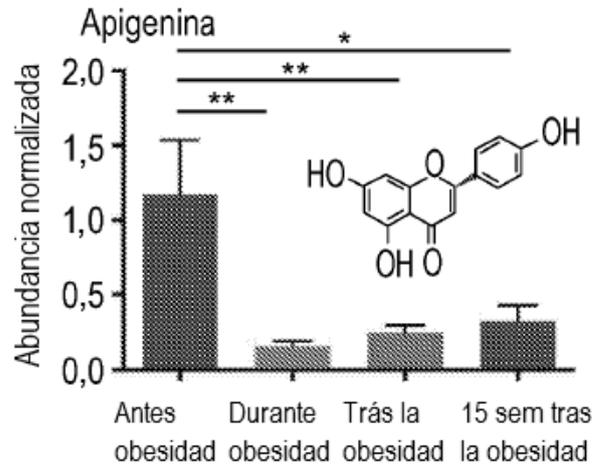


FIG. 9I

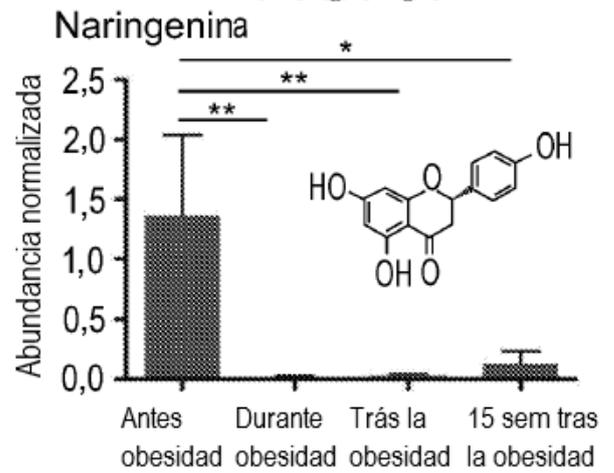


FIG. 9J

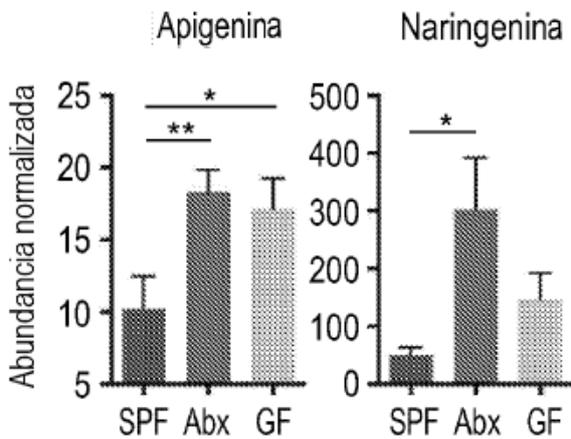


FIG. 9K

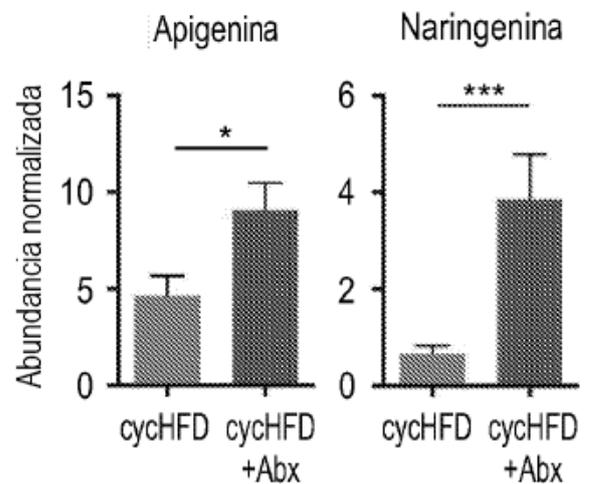


FIG. 10A

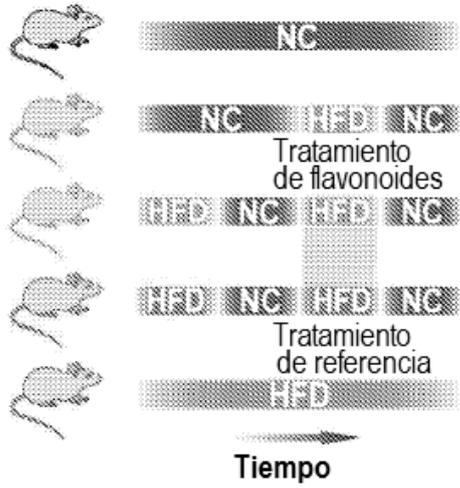


FIG. 10B

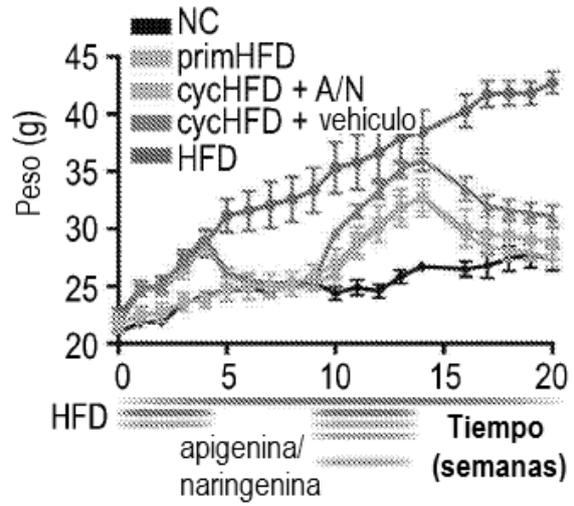


FIG. 10C

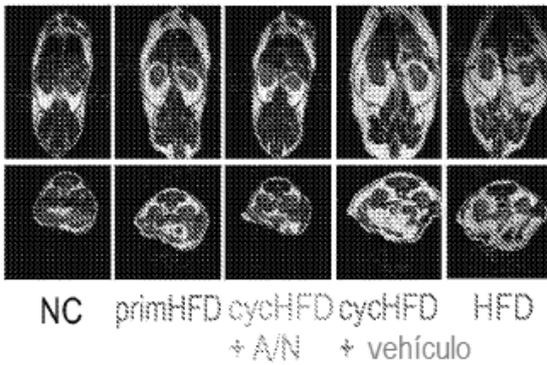


FIG. 10D

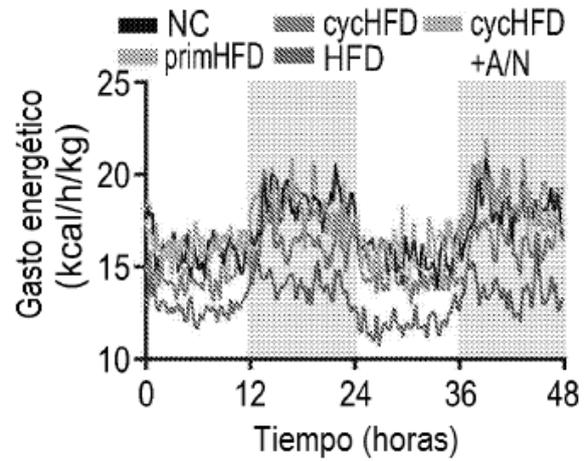


FIG. 10E

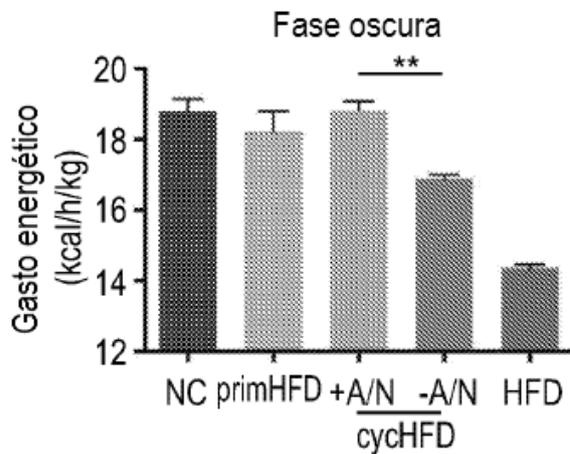
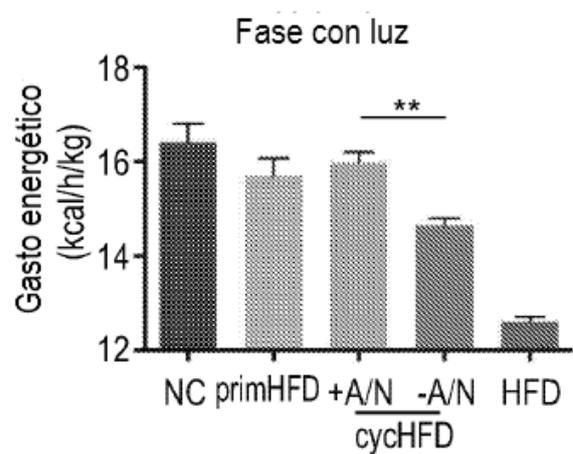


FIG. 10F



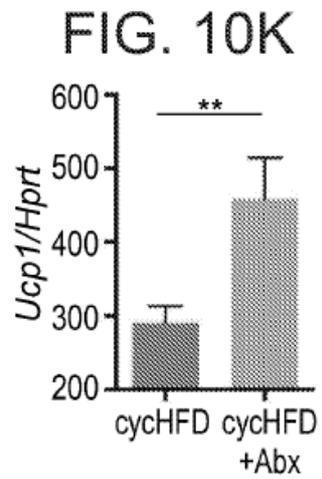
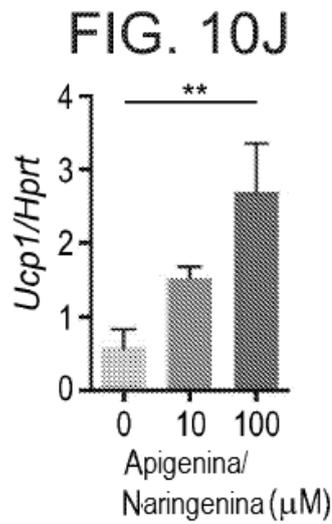
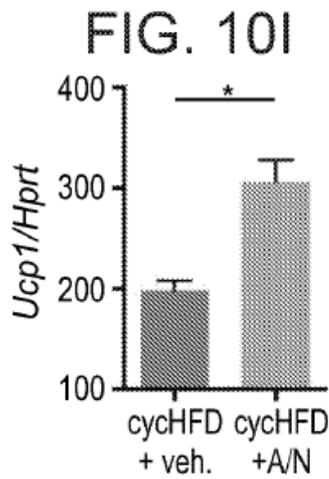
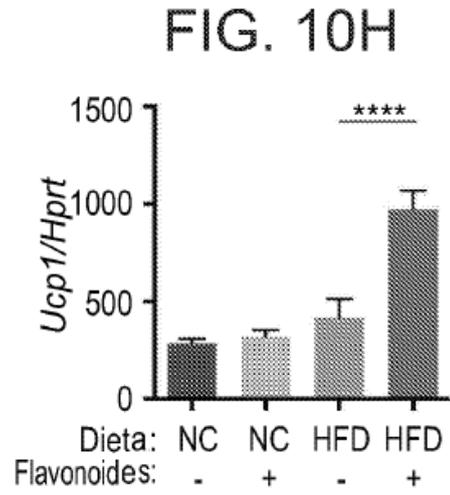
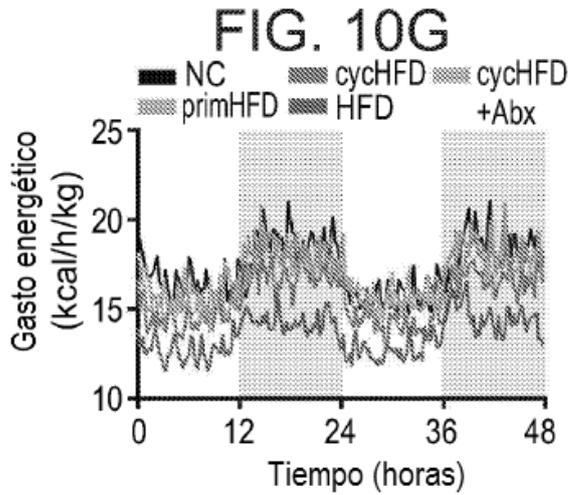
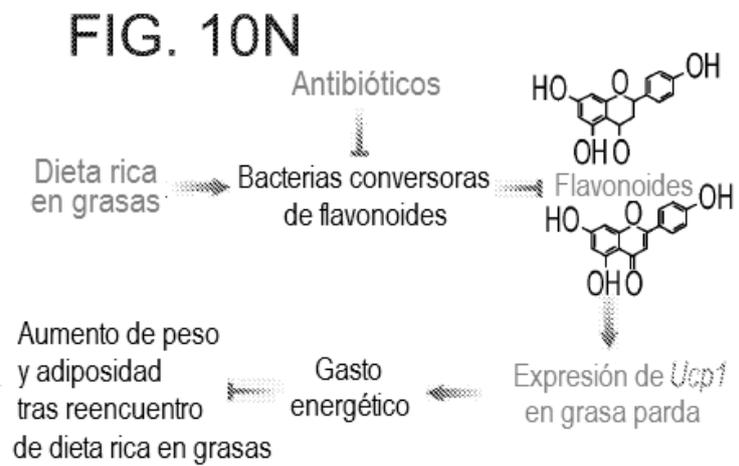
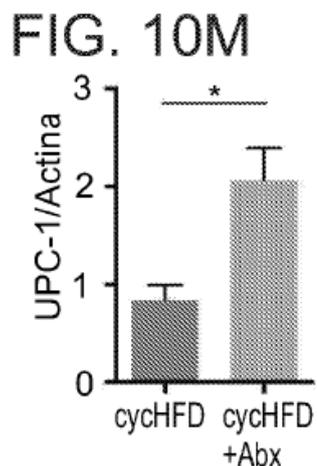
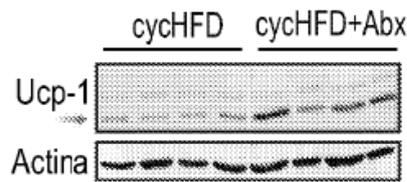
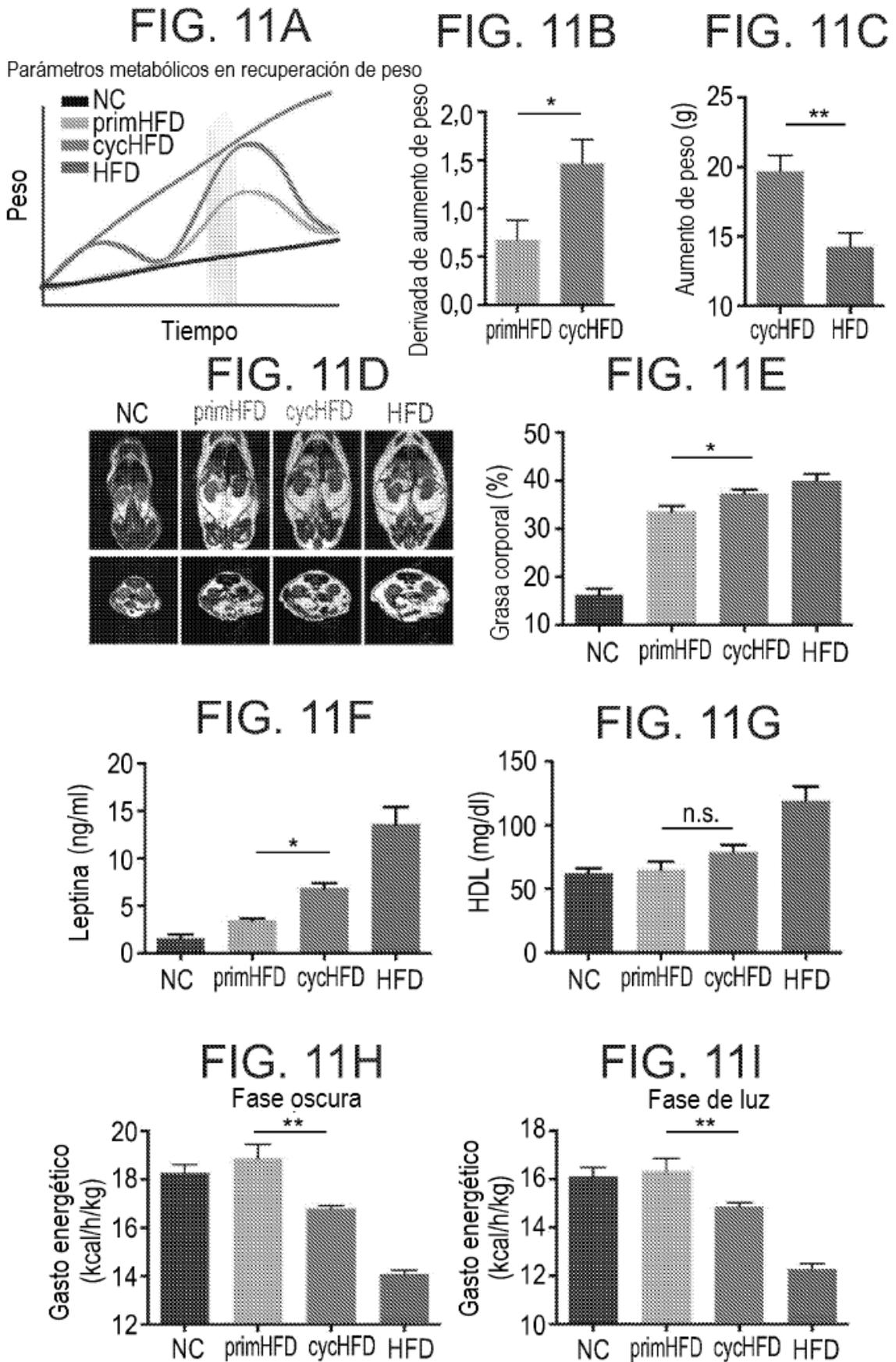


FIG. 10L





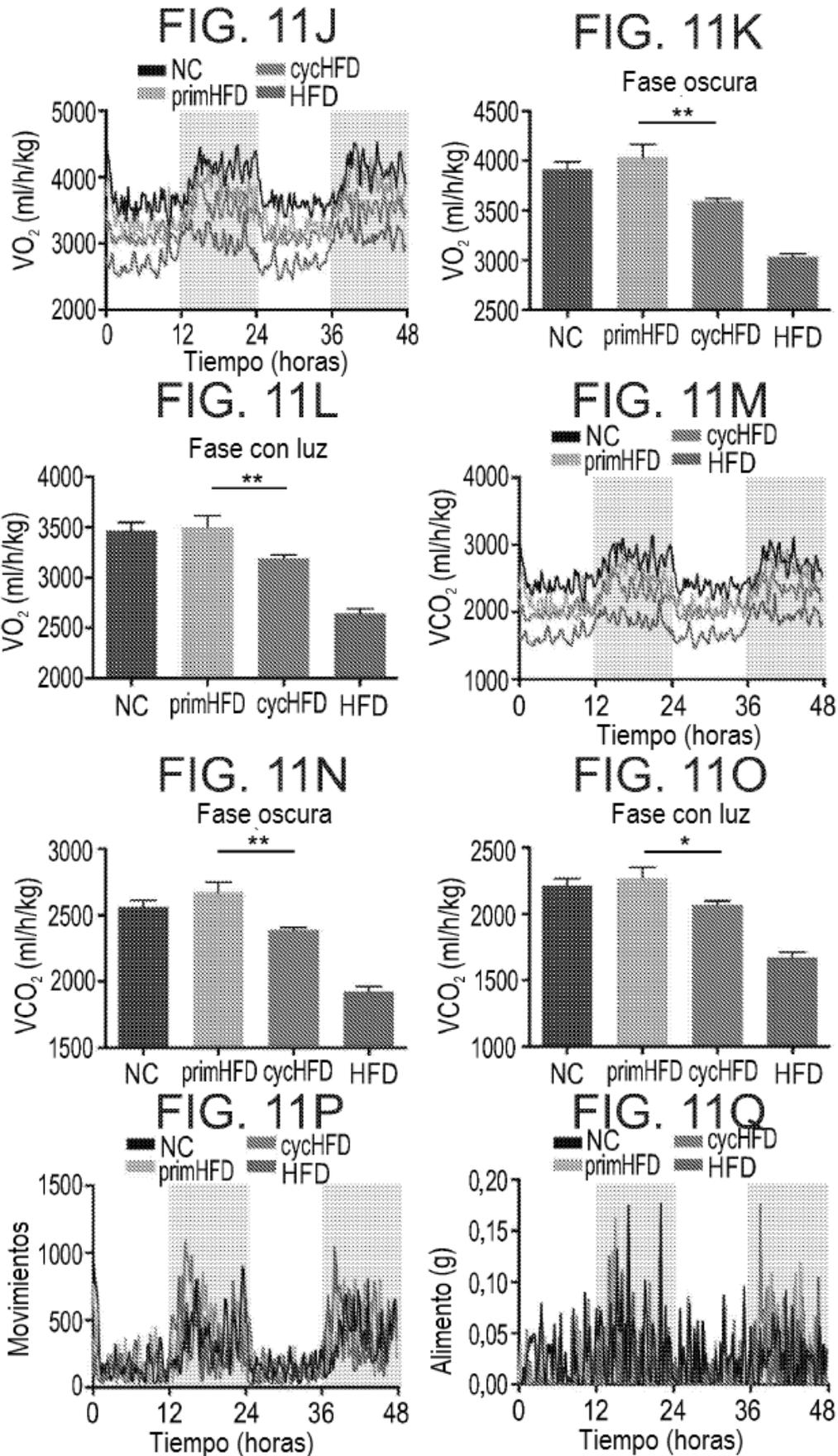


FIG. 12A

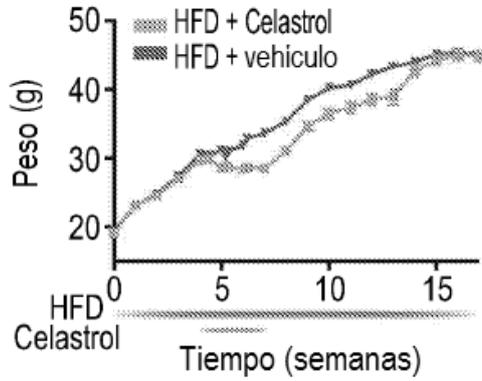


FIG. 12B

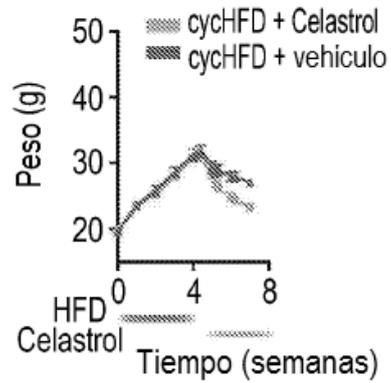


FIG. 12C

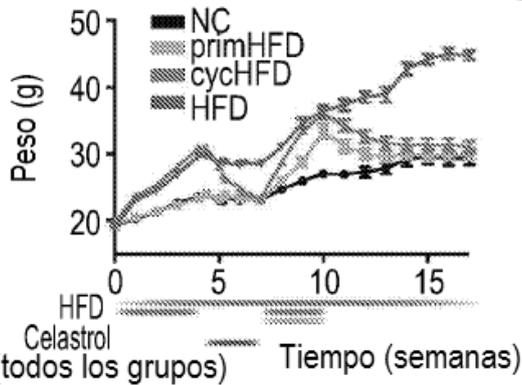


FIG. 12D

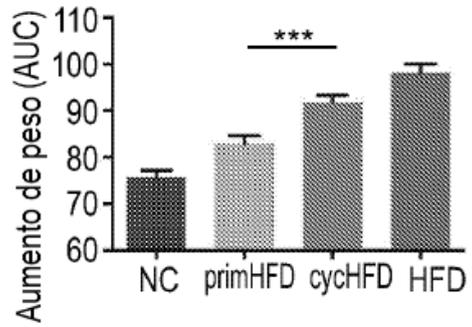


FIG. 12E

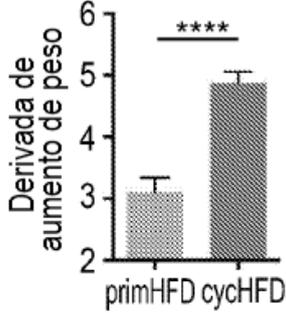


FIG. 12F

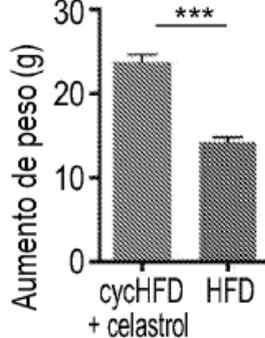


FIG. 12G

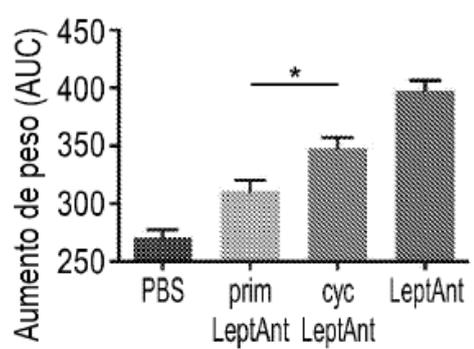


FIG. 12H

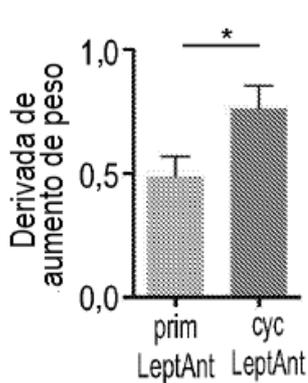


FIG. 12I

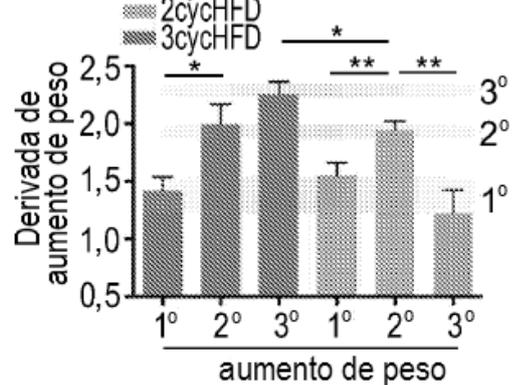


FIG. 12J

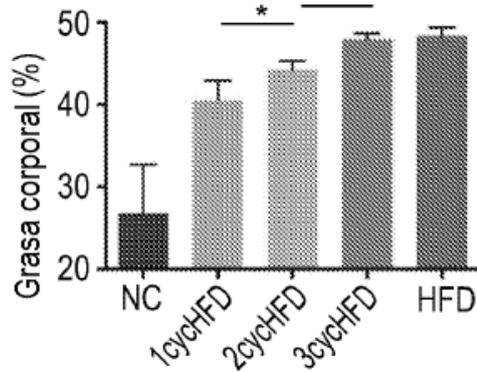


FIG. 12K

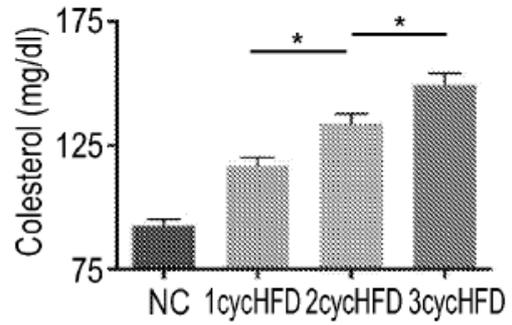


FIG. 12L

Parámetros metabólicos durante la obesidad inicial

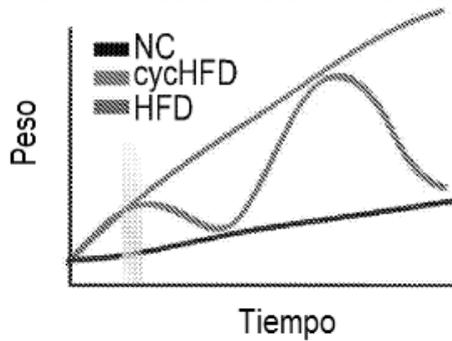


FIG. 12M

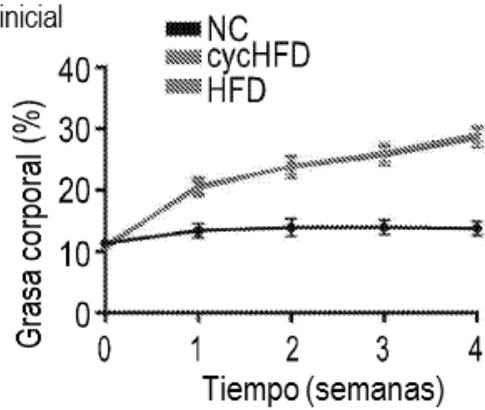


FIG. 12N

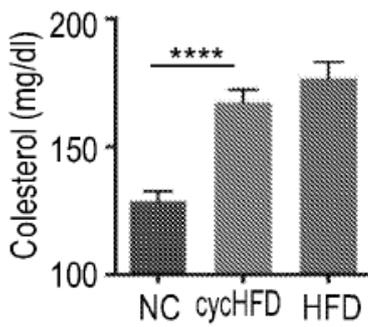


FIG. 12O

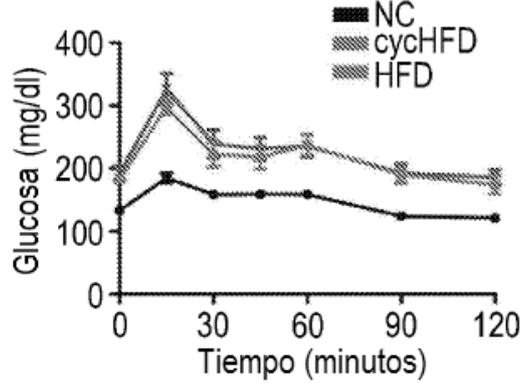


FIG. 12P

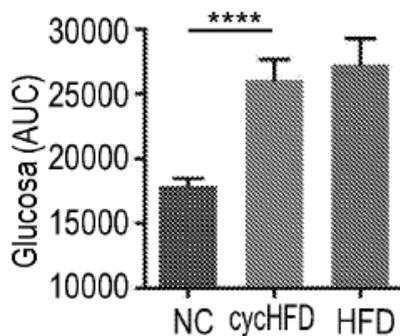
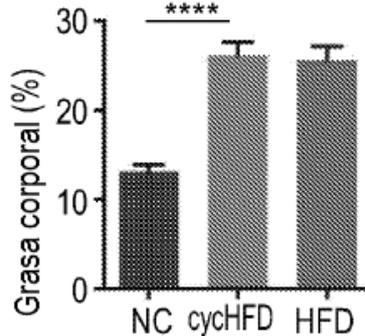


FIG. 12Q



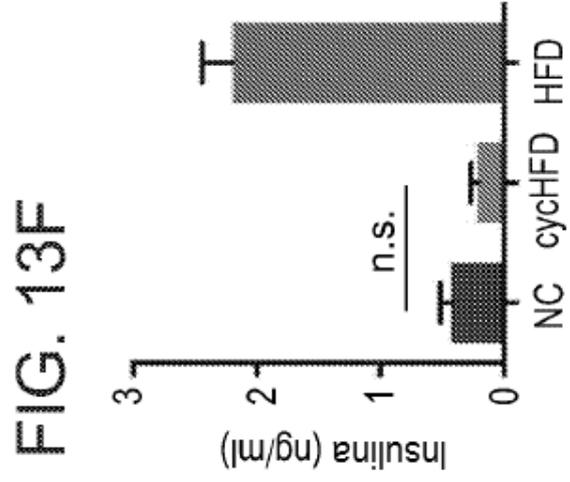
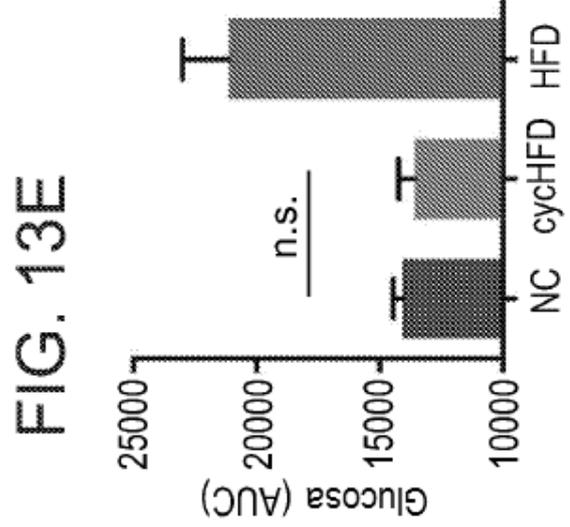
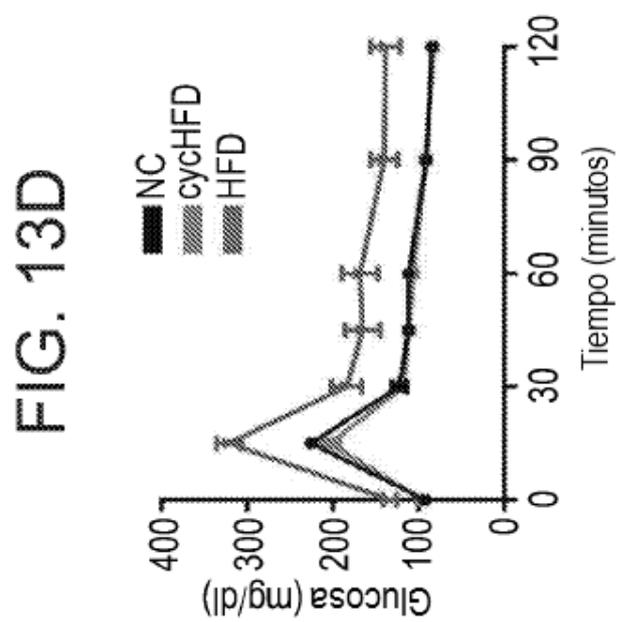
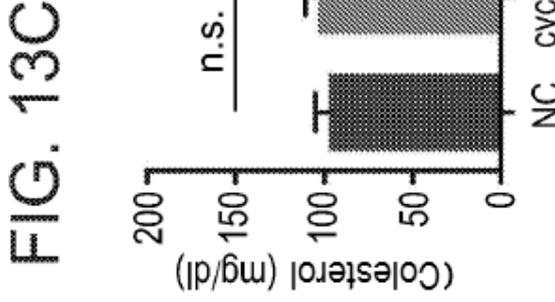
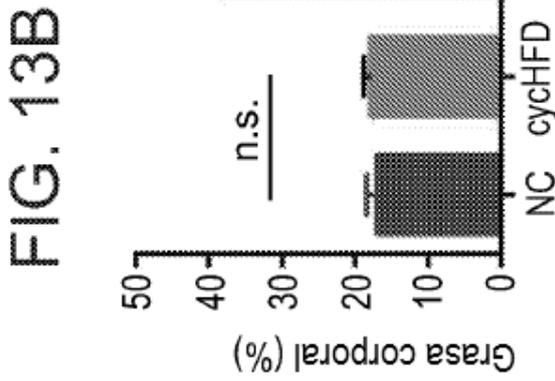
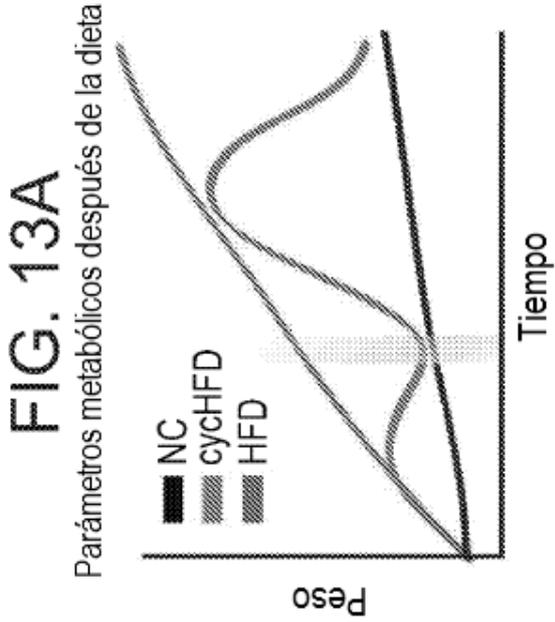


FIG. 13I

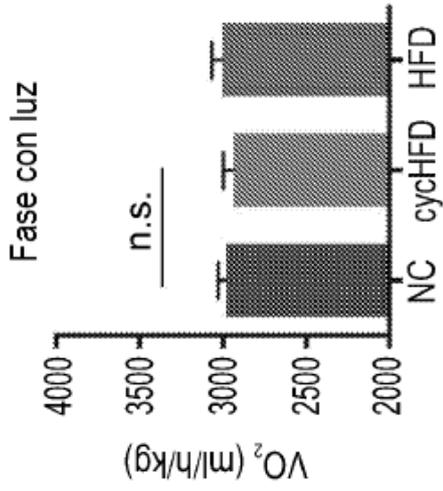


FIG. 13L

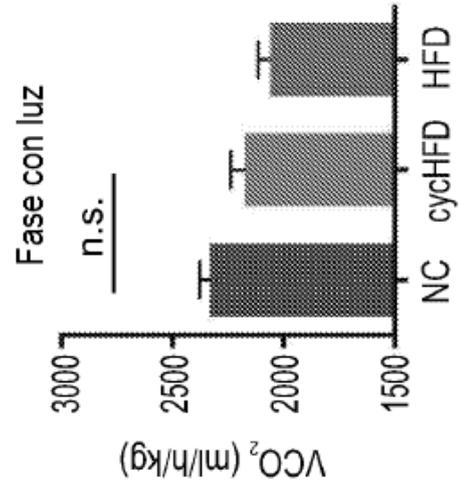


FIG. 13H

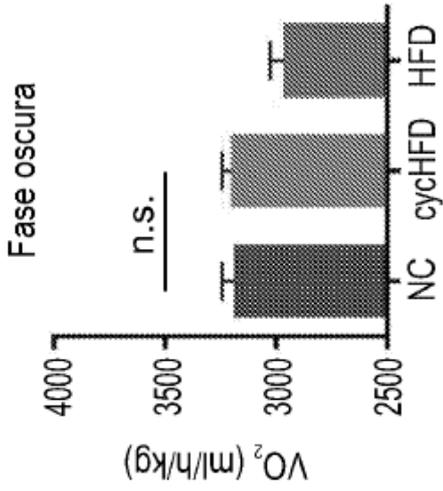


FIG. 13K

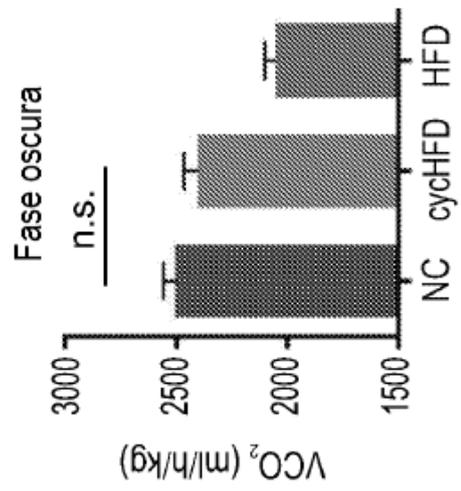


FIG. 13G

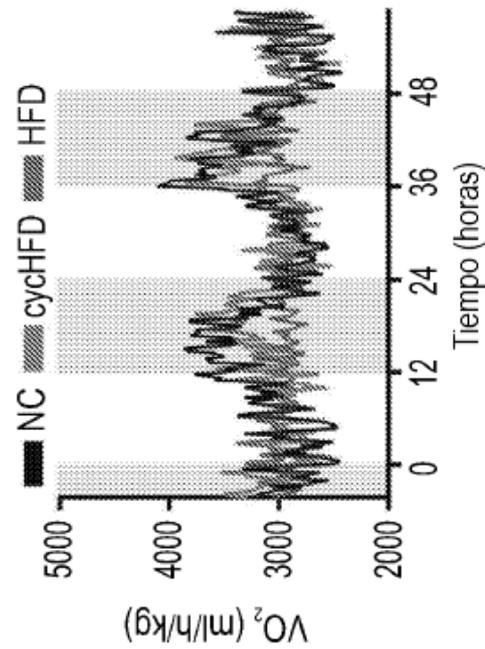


FIG. 13J

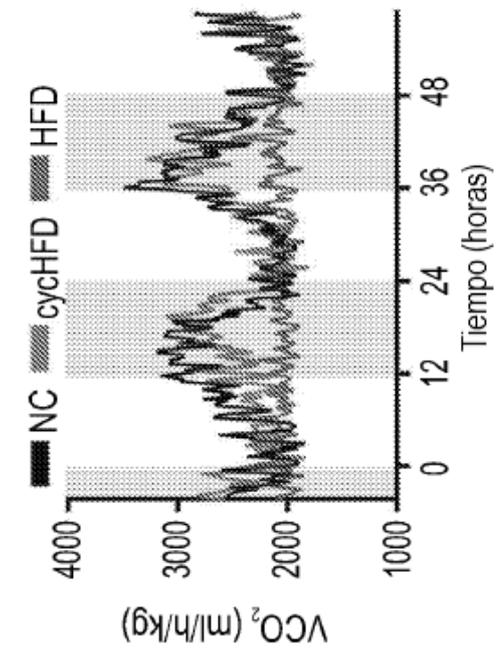


FIG. 14A

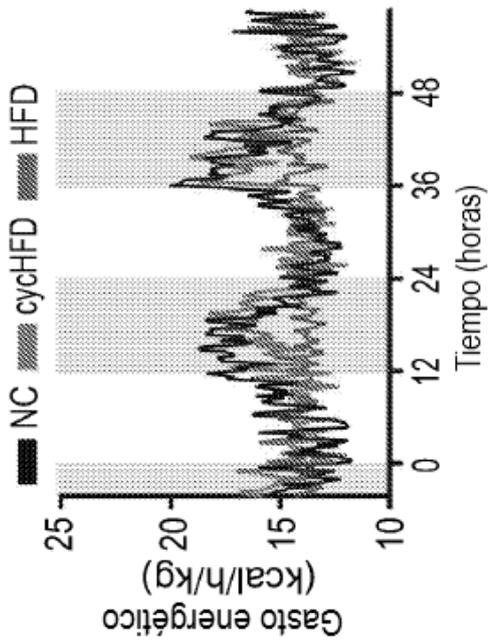


FIG. 14B

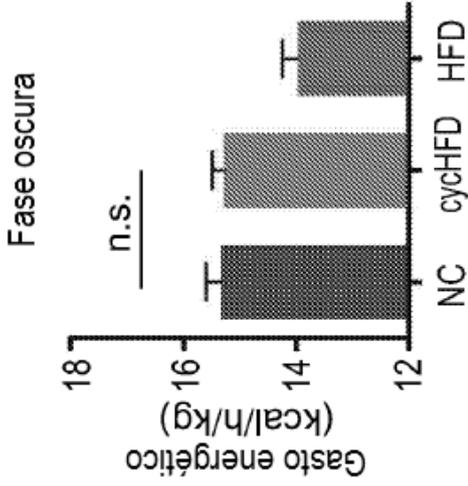


FIG. 14C

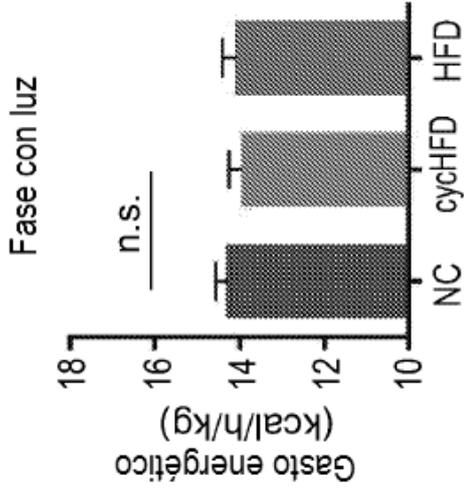


FIG. 14D

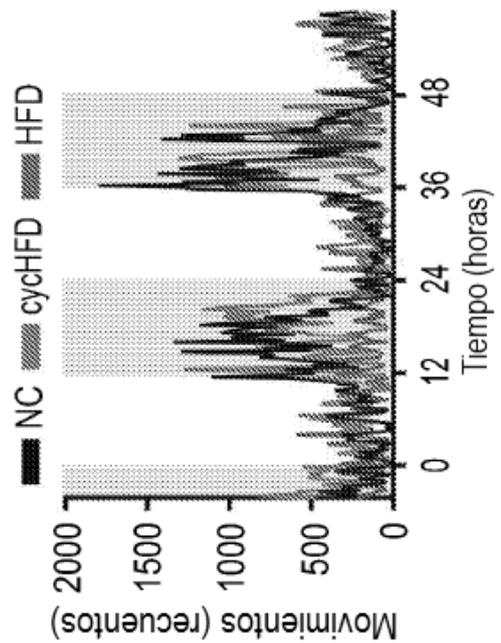


FIG. 14E

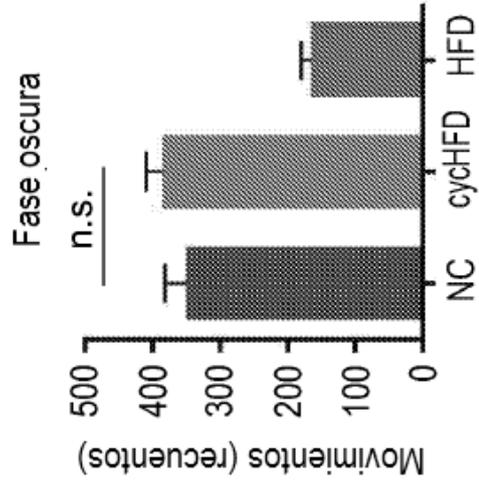


FIG. 14F

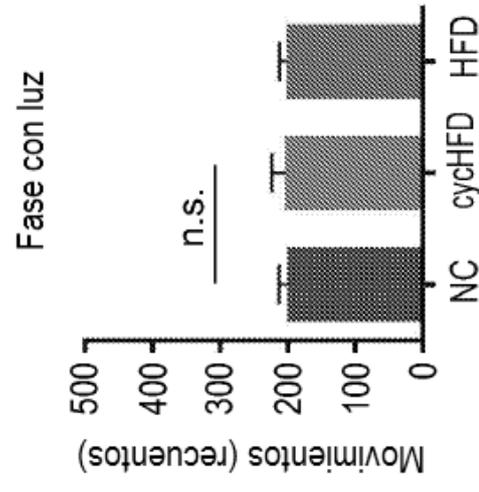


FIG. 14G

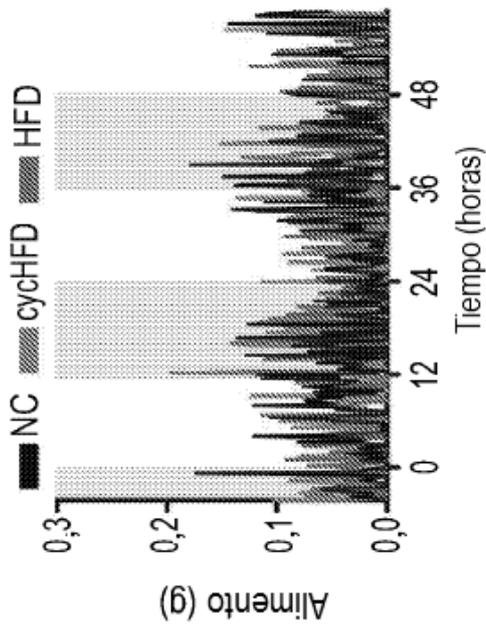


FIG. 14H

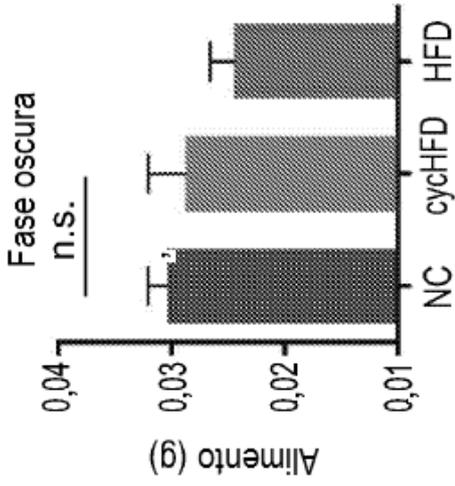


FIG. 14I

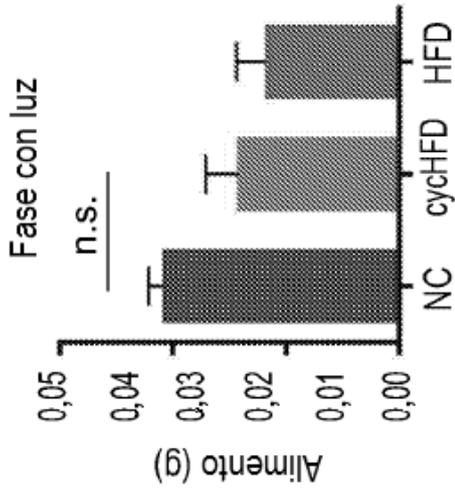


FIG. 14J

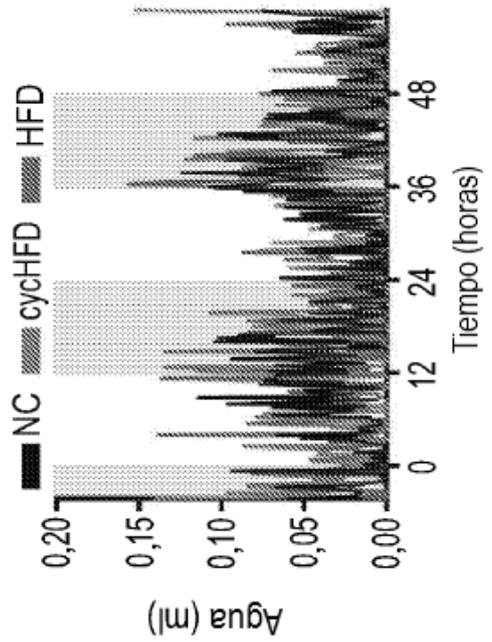


FIG. 14K

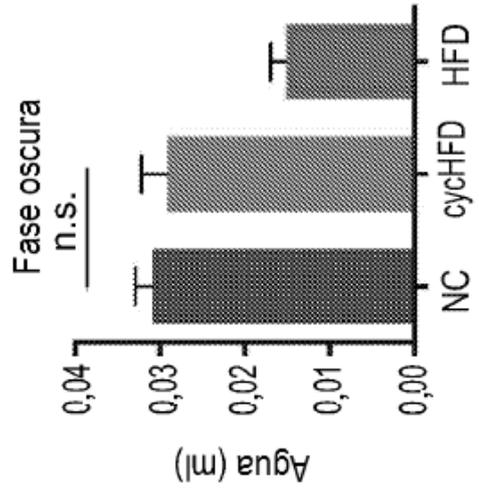


FIG. 14L

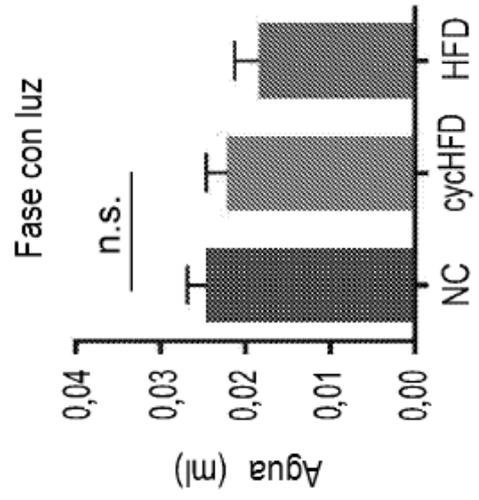


FIG. 15A

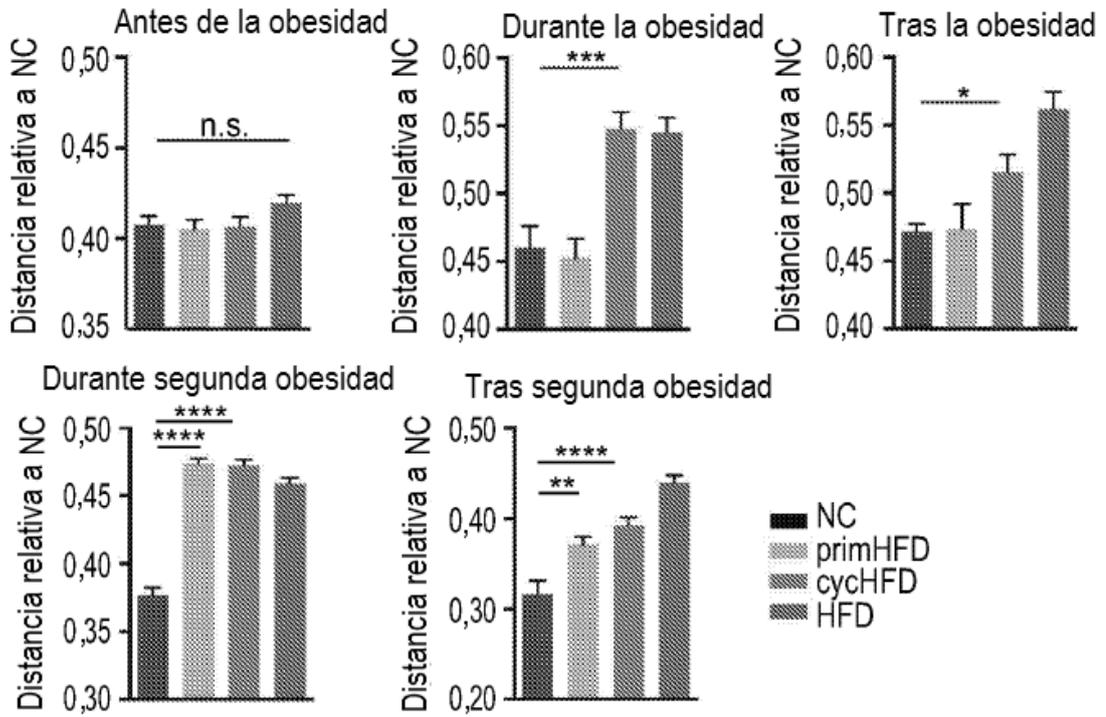


FIG. 15B

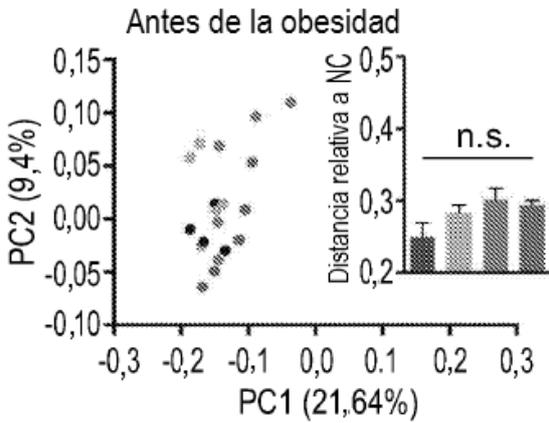


FIG. 15C

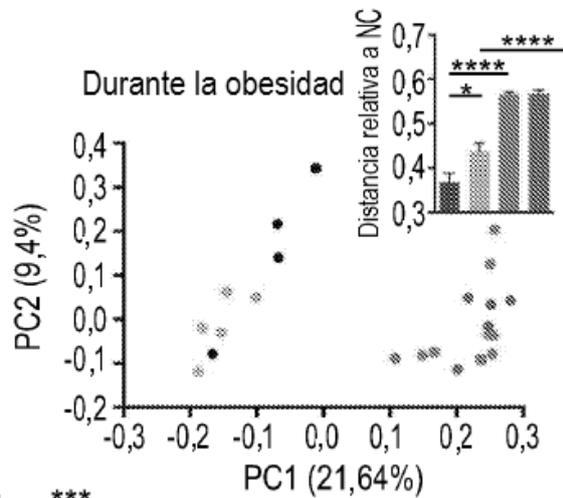
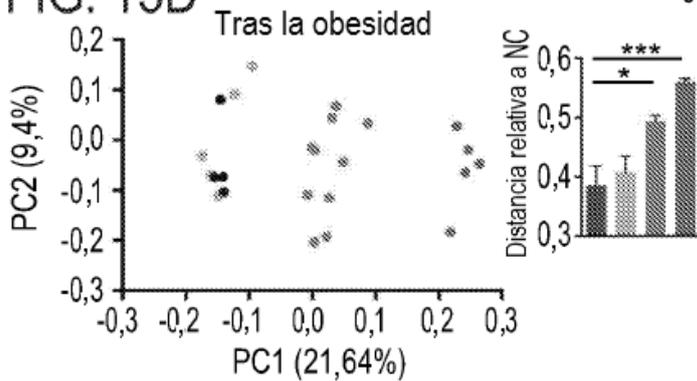


FIG. 15D



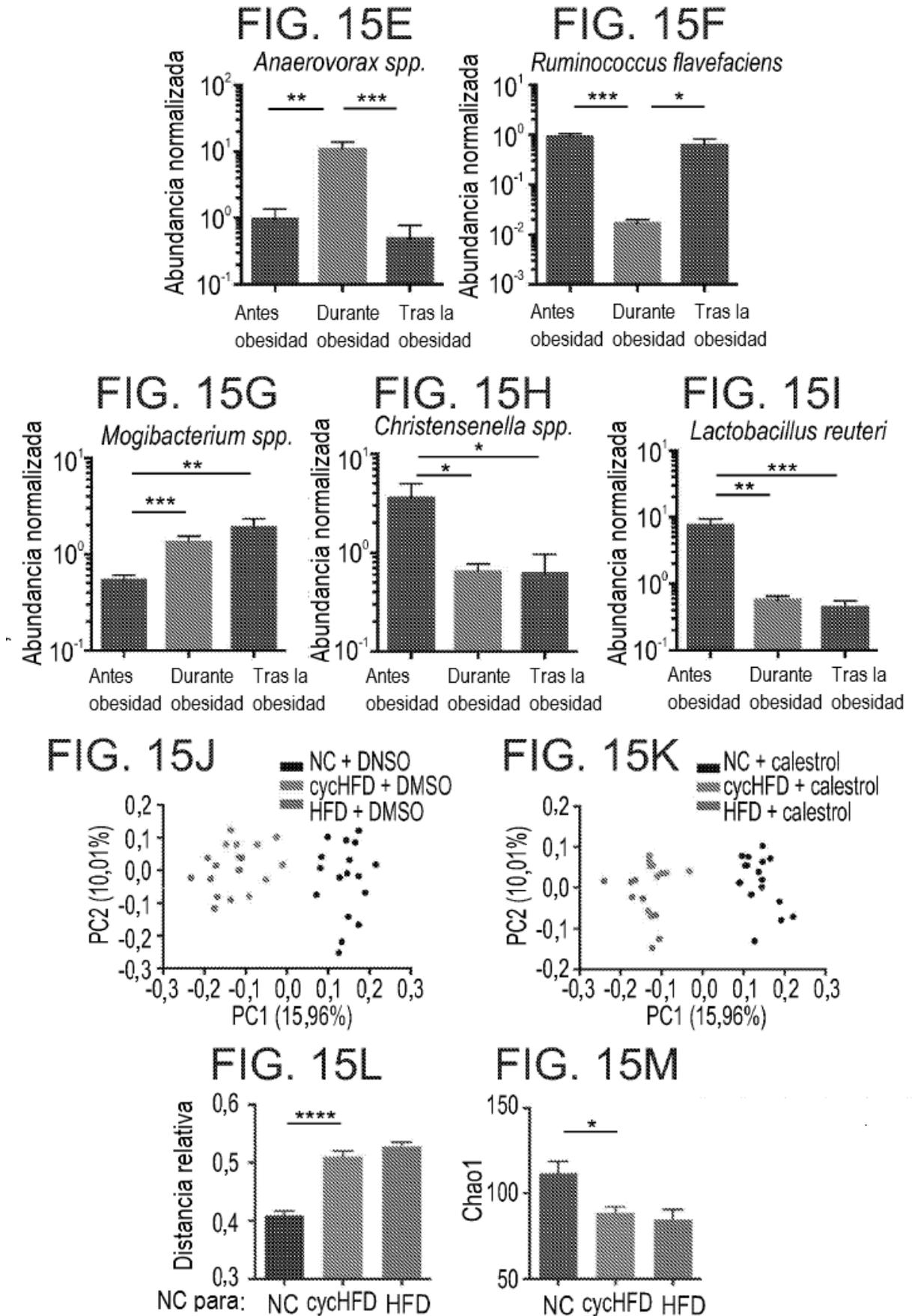


FIG. 16A

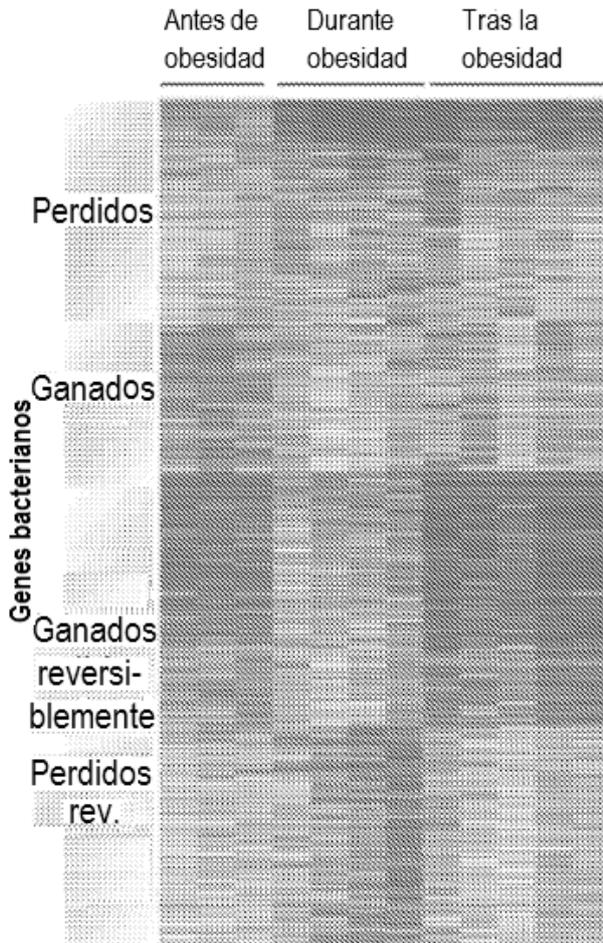


FIG. 16B

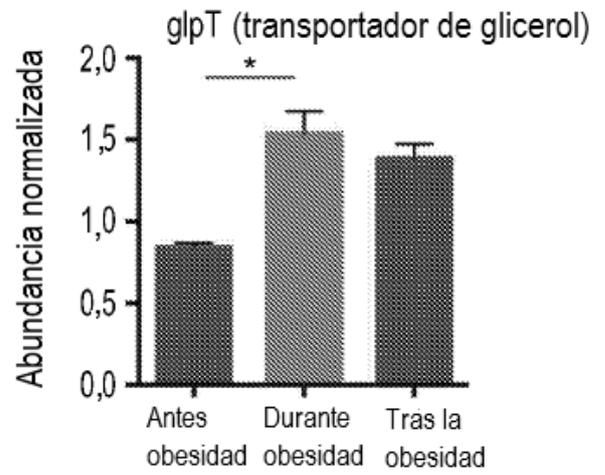


FIG. 16C

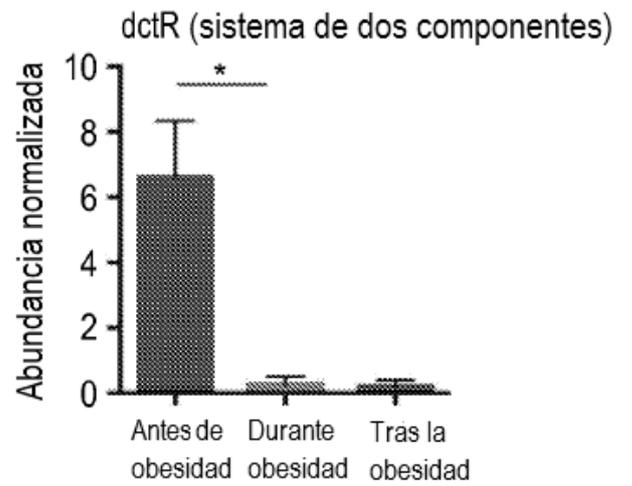
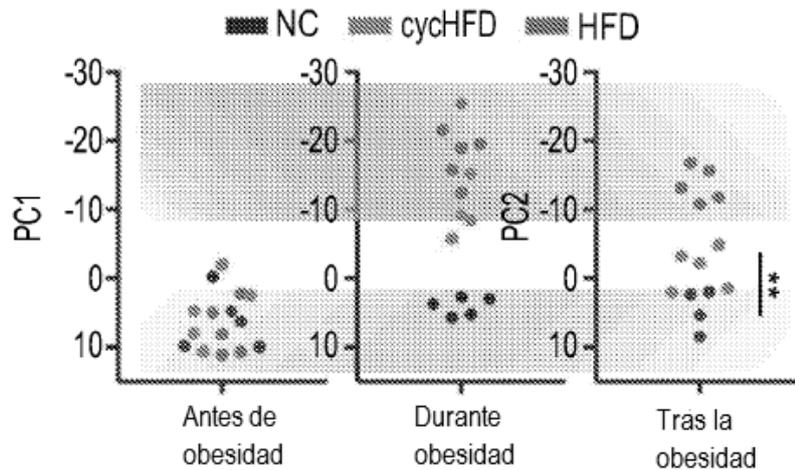


FIG. 16D



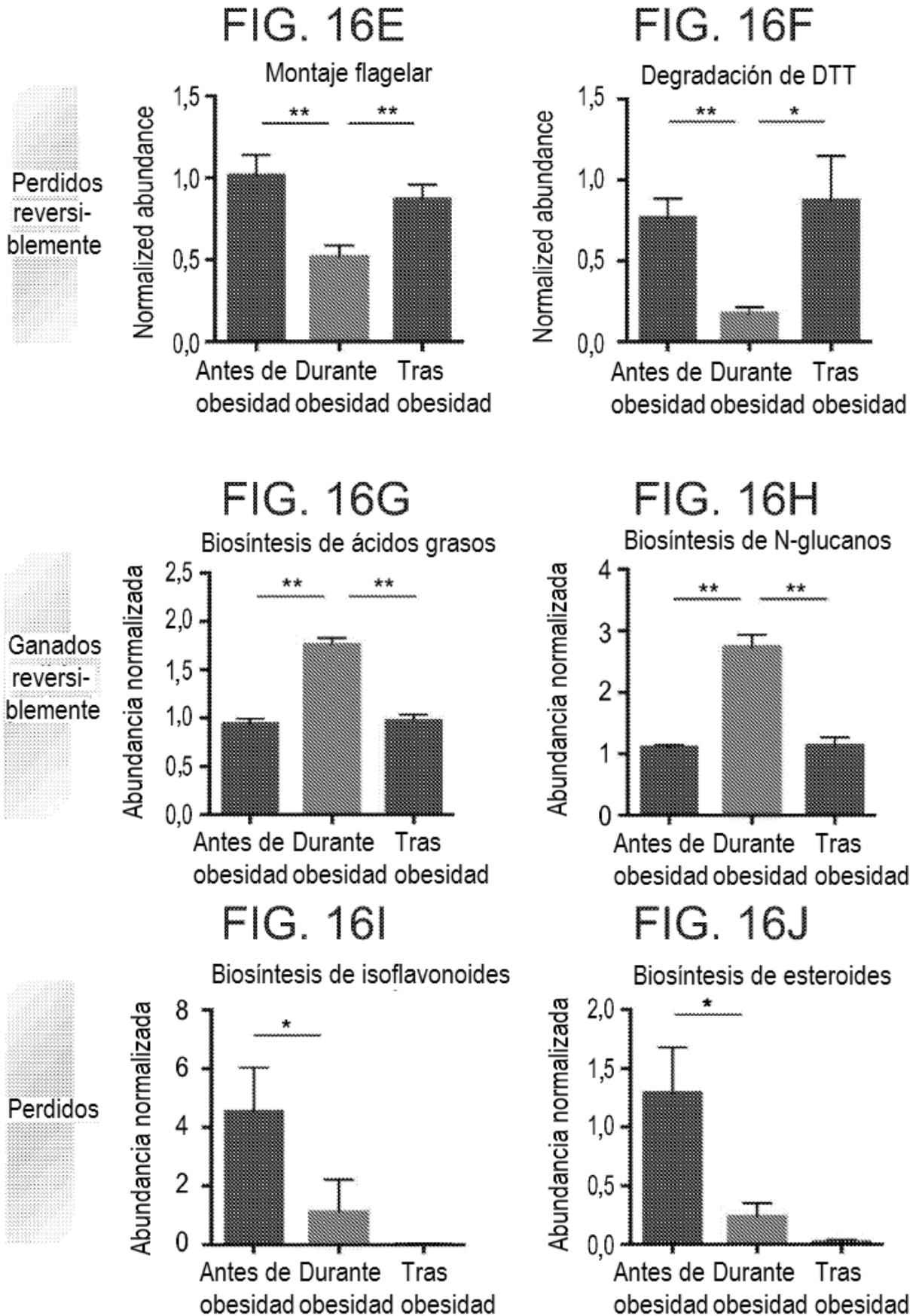


FIG. 17A

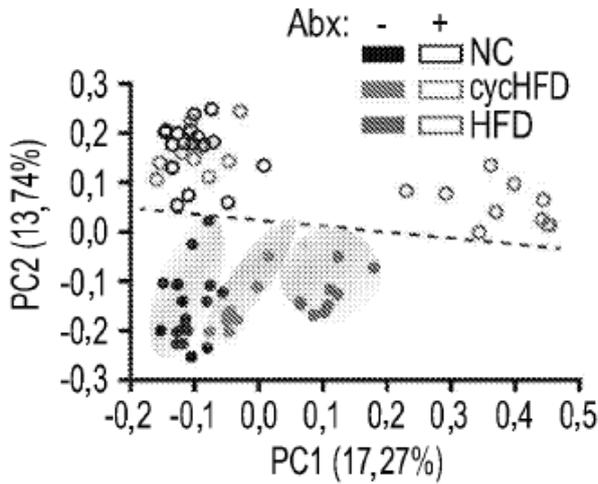


FIG. 17B

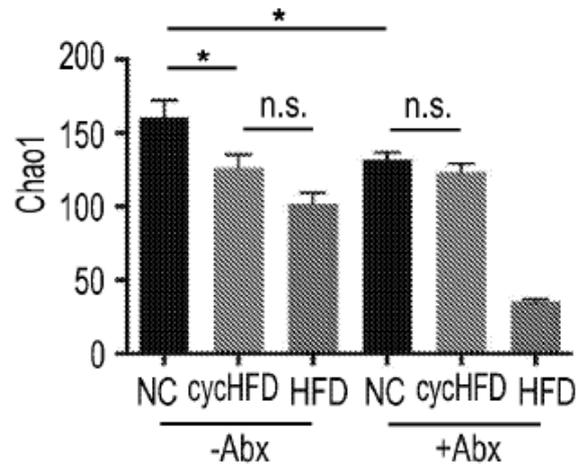


FIG. 17C

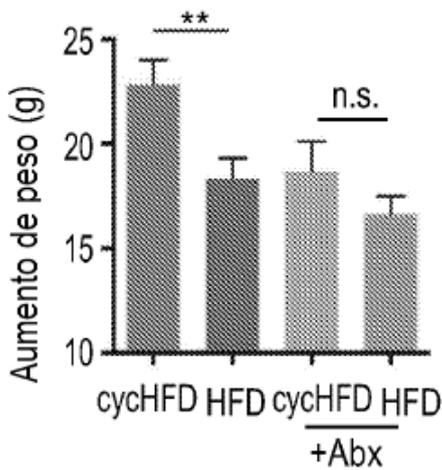


FIG. 17D

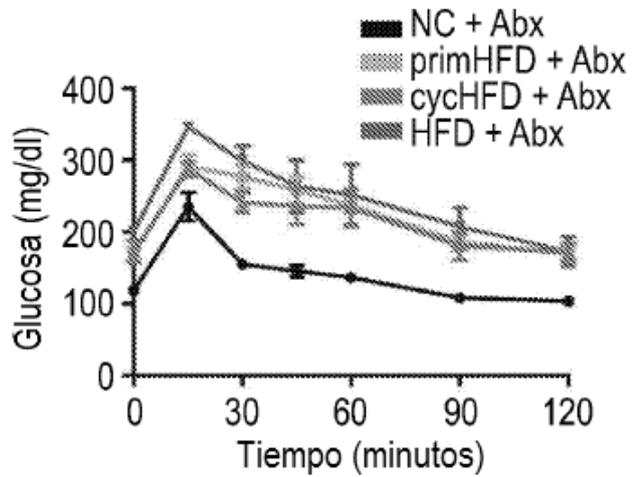


FIG. 17E

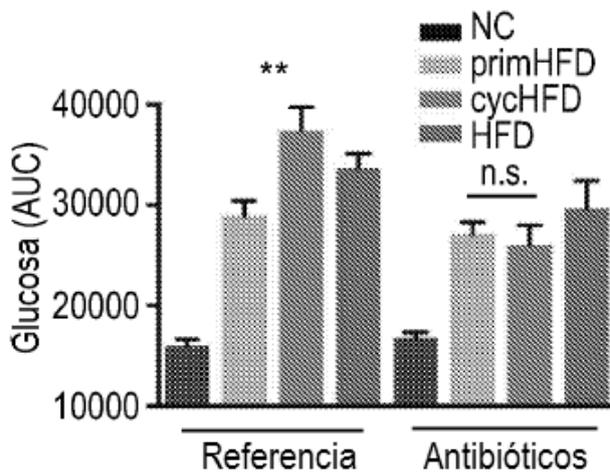


FIG. 17F

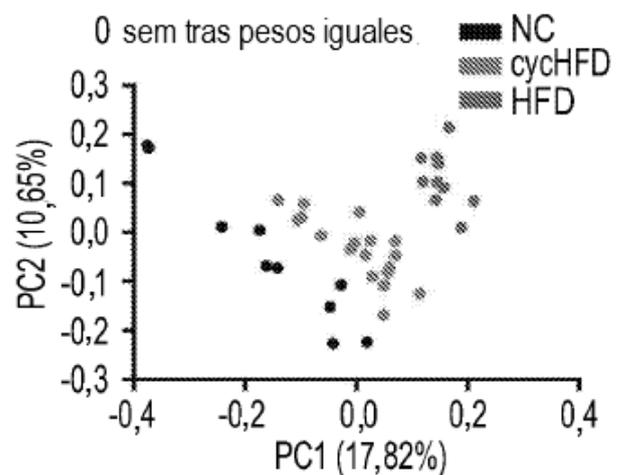


FIG. 17G

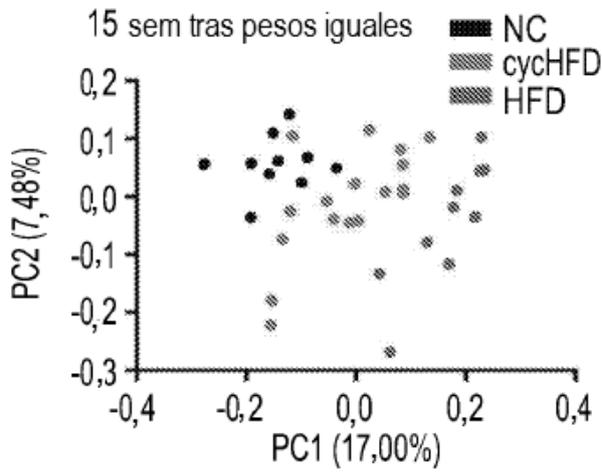


FIG. 17H

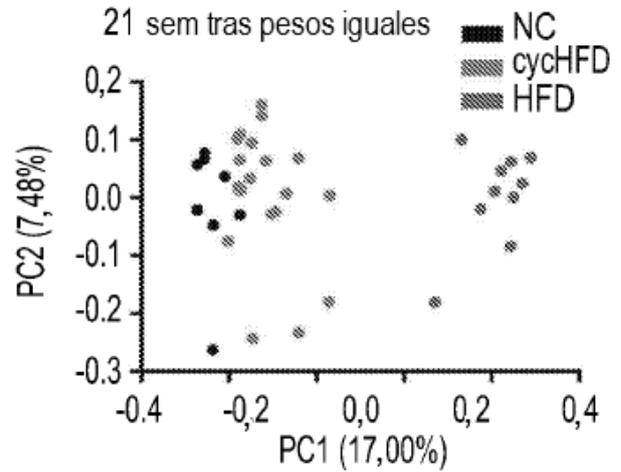


FIG. 17I

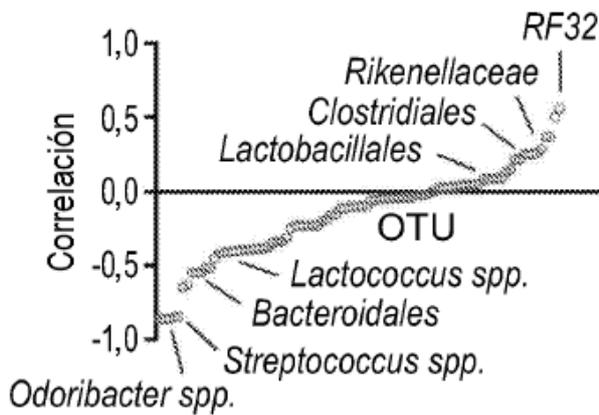


FIG. 17J

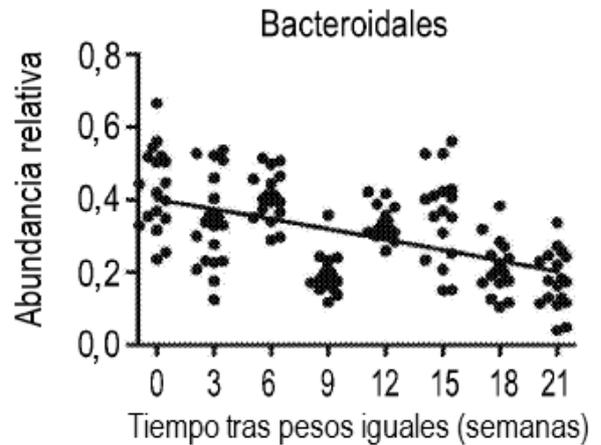


FIG. 17K

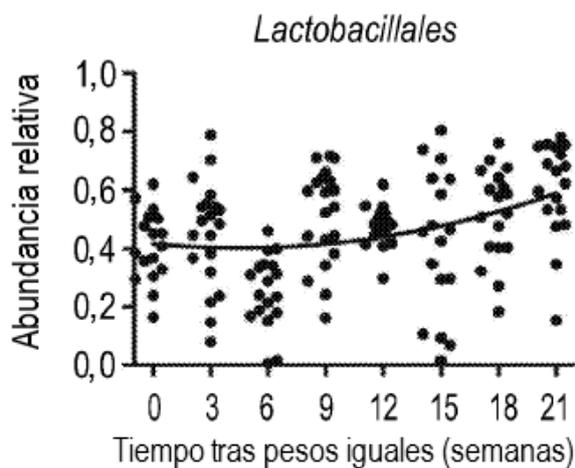
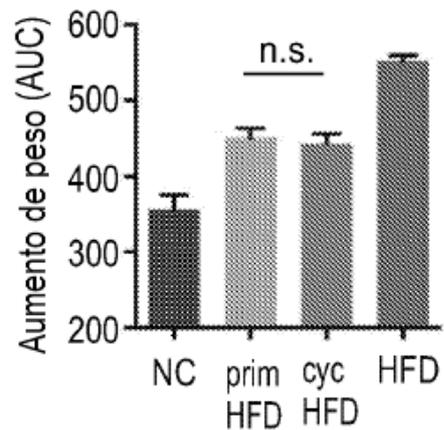


FIG. 17L



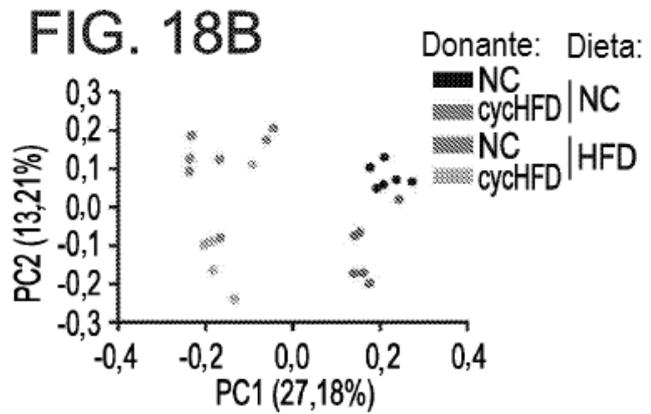
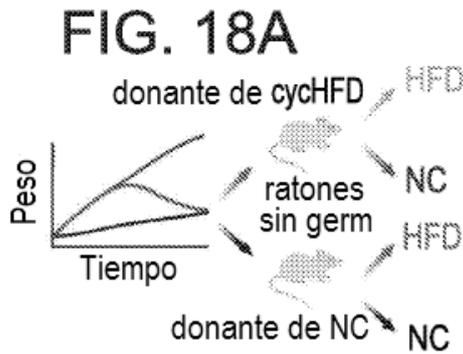


FIG. 18C Receptores en NC

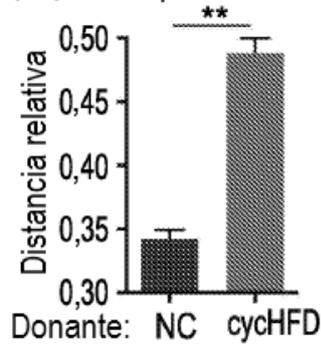
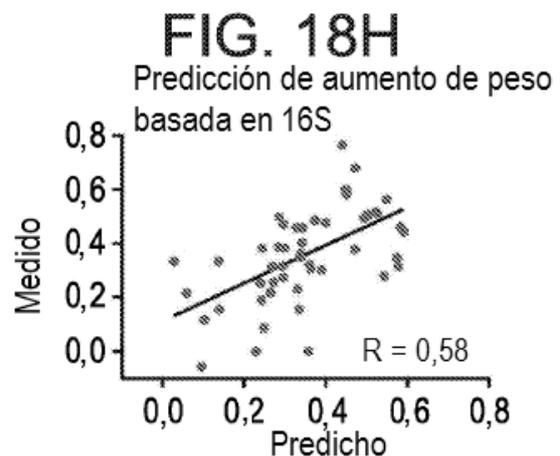
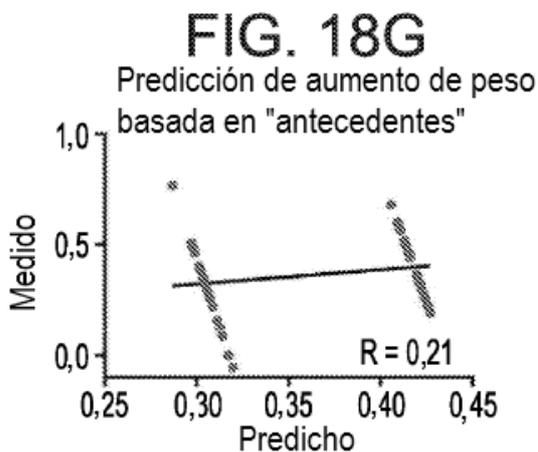
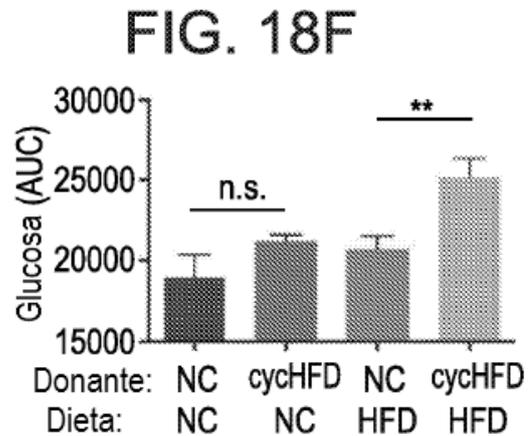
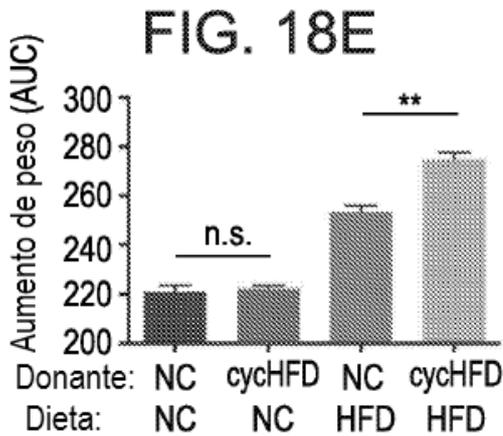
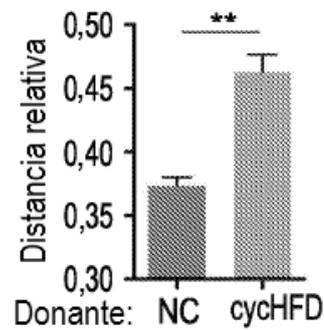


FIG. 18D Receptores en NC



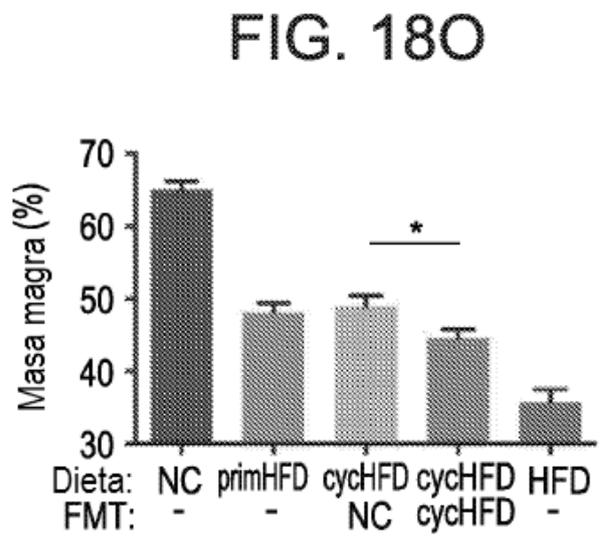
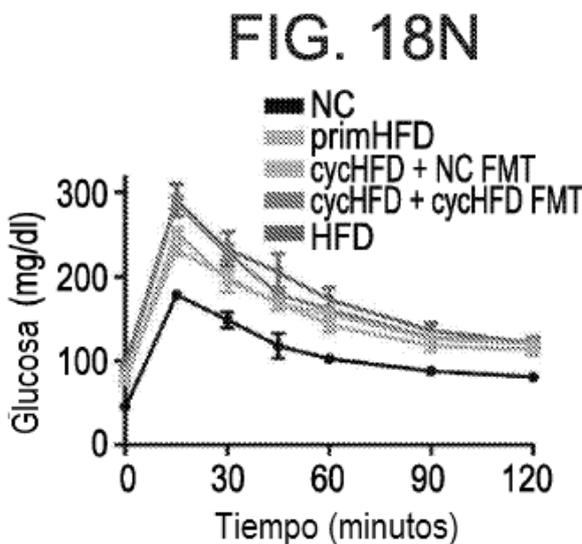
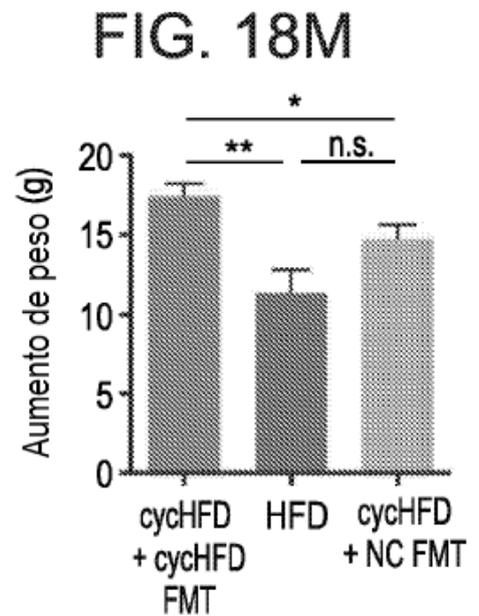
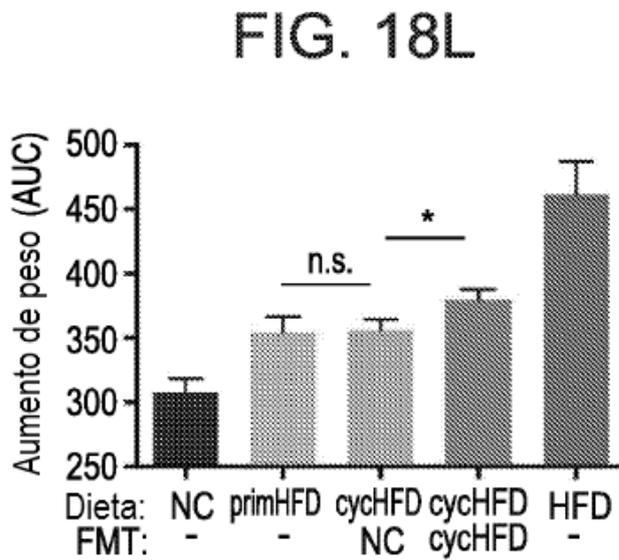
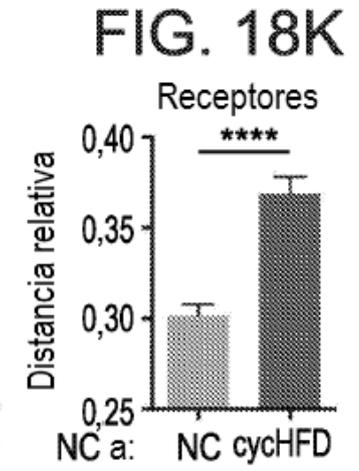
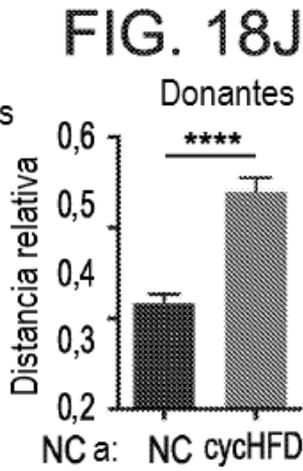
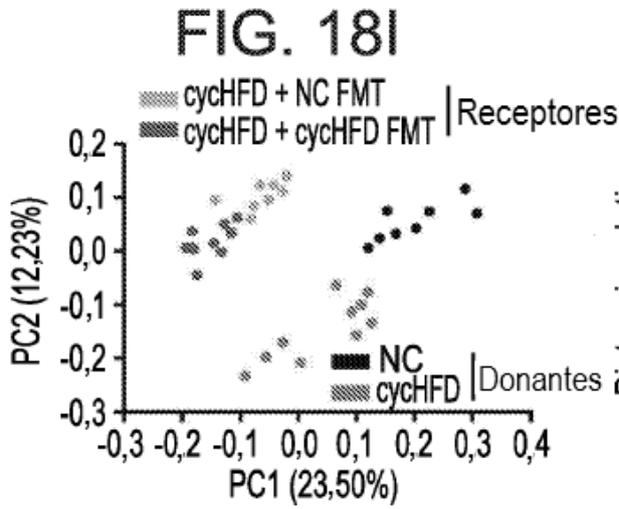


FIG. 19A

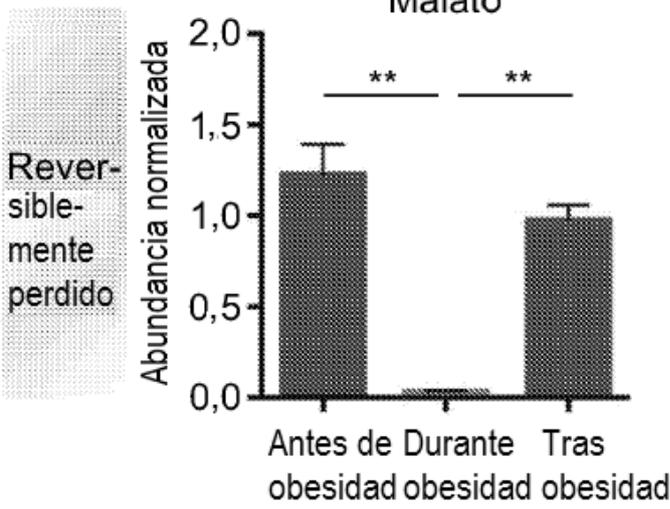


FIG. 19B

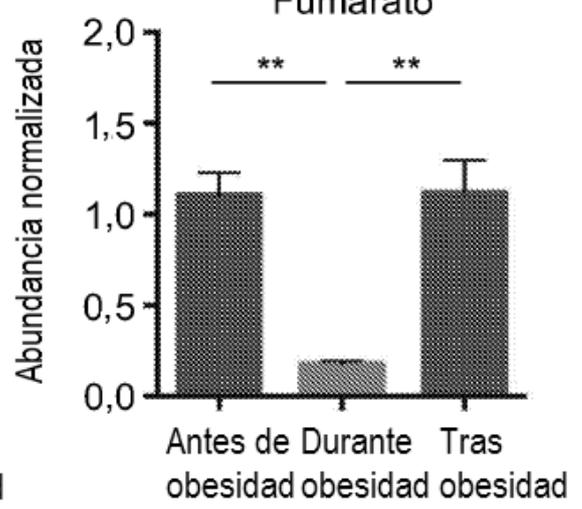


FIG. 19C

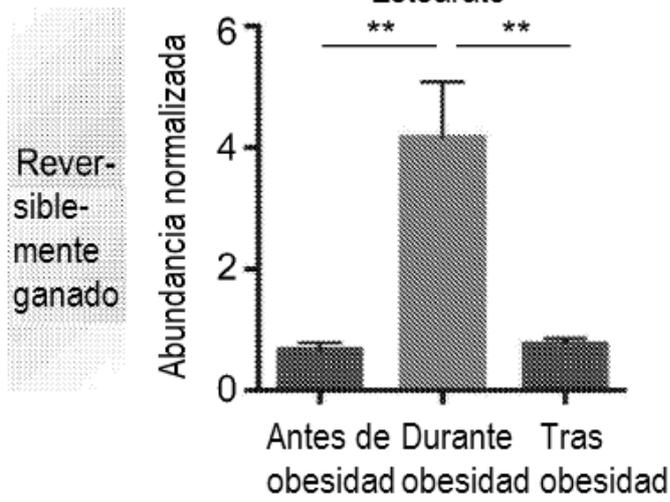


FIG. 19D

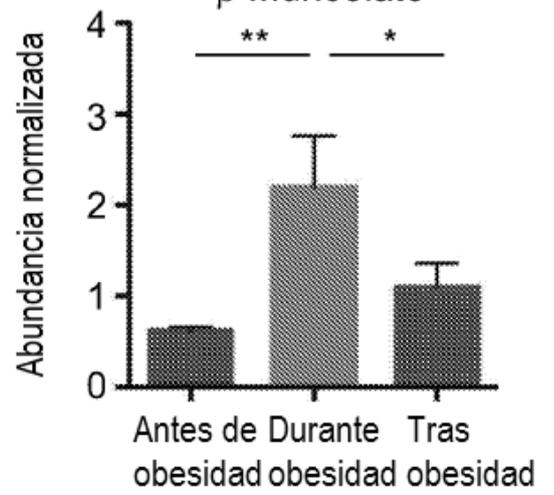


FIG. 19E

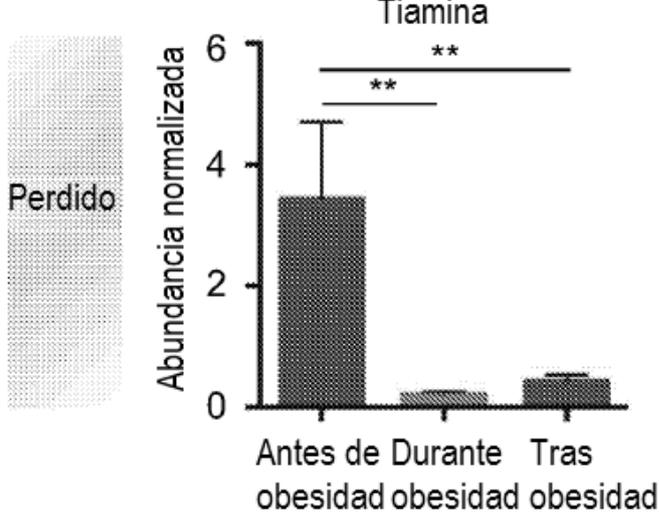


FIG. 19F

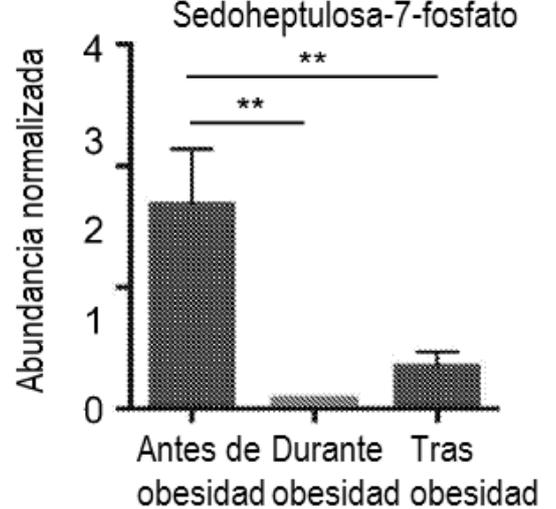


FIG. 19G

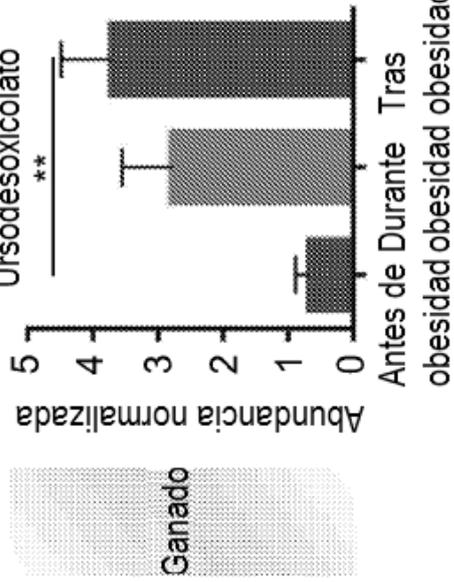


FIG. 19H

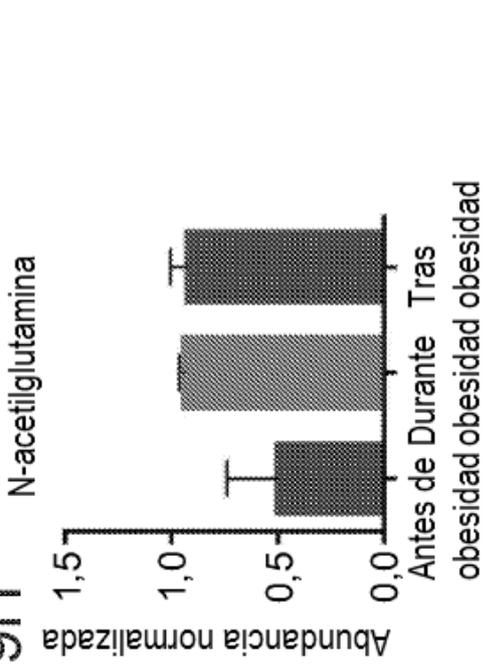


FIG. 19I

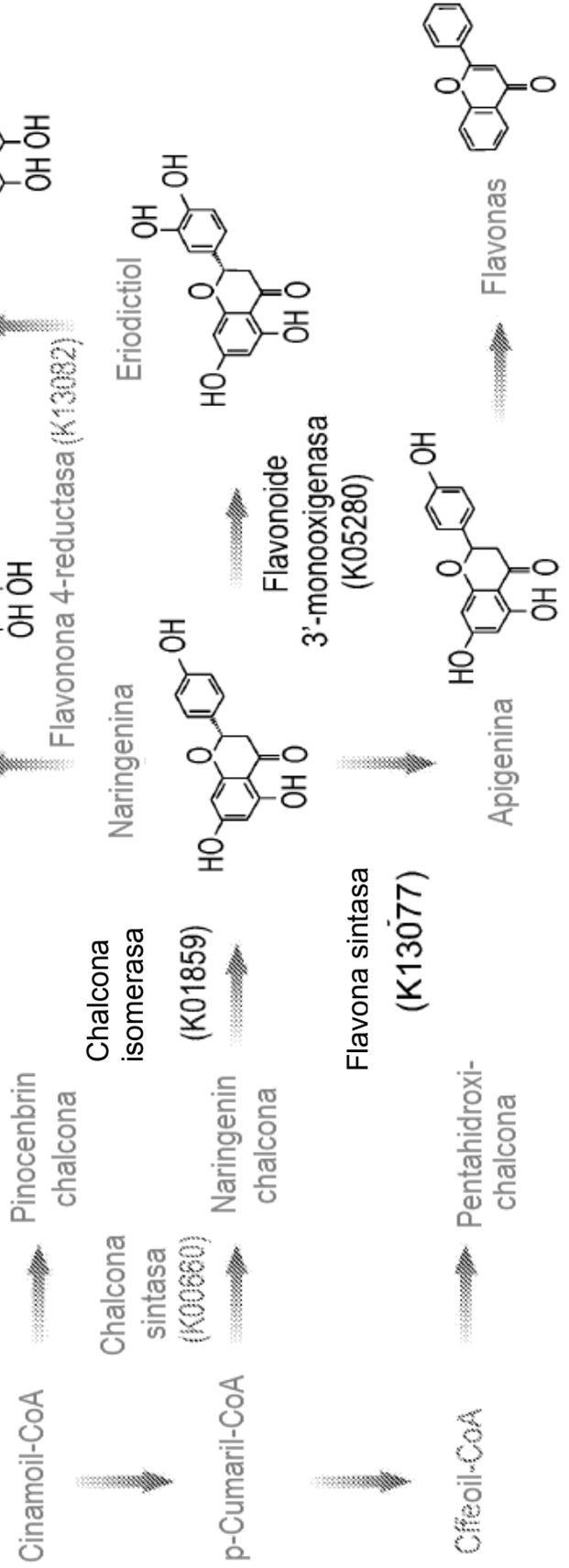


FIG. 20A Análisis de puntos de tiempo

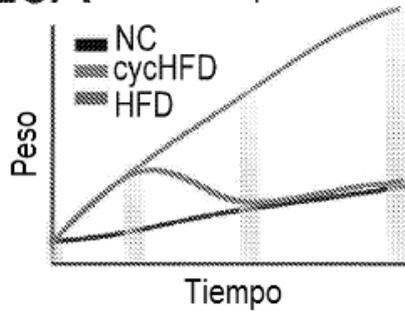


FIG. 20B

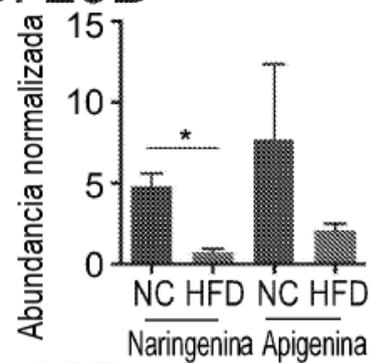


FIG. 20C Flavanona 4-reductasa

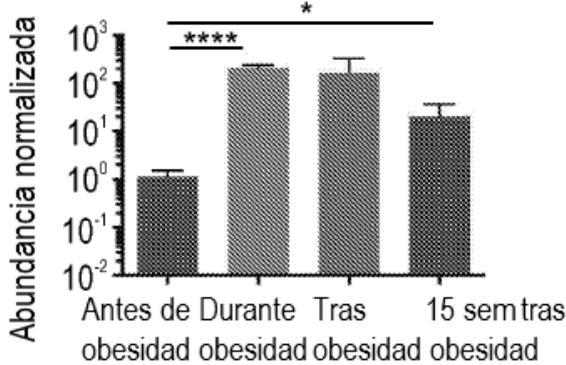


FIG. 20D

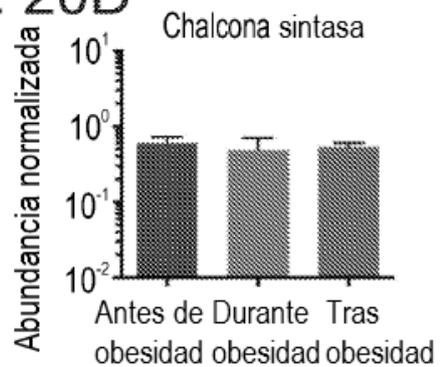


FIG. 20E

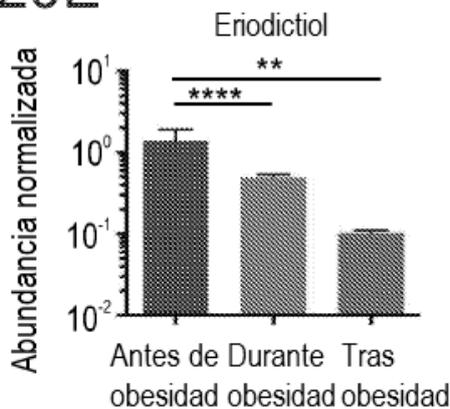


FIG. 20F

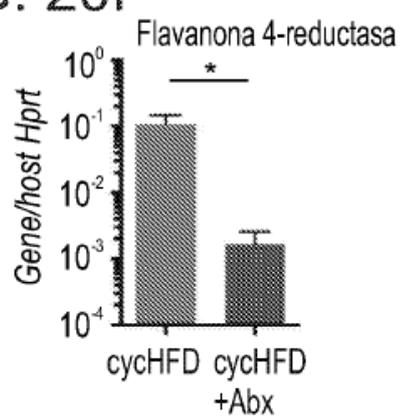


FIG. 20G

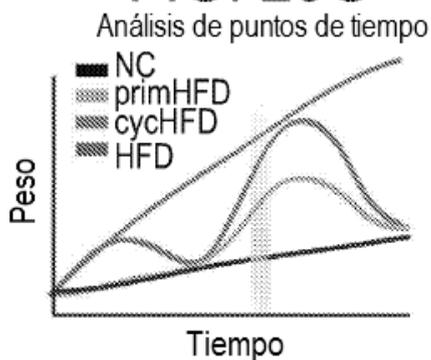


FIG. 20H

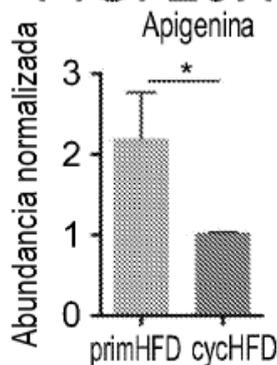
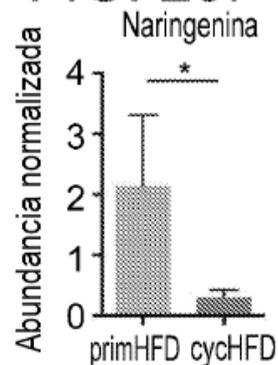
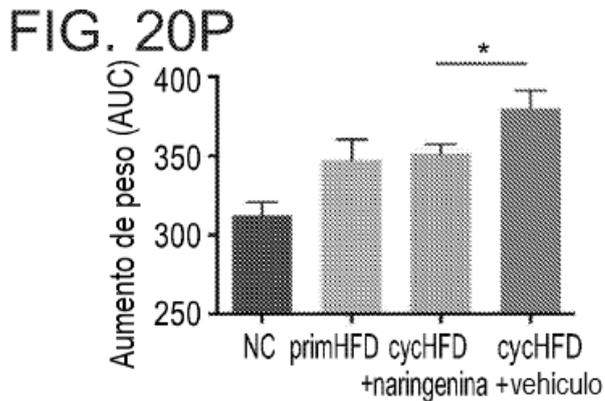
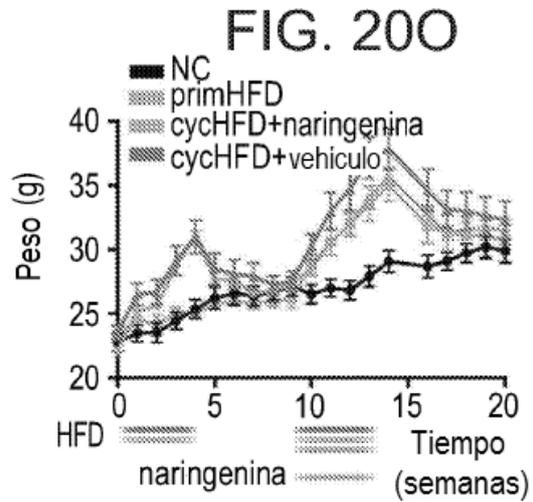
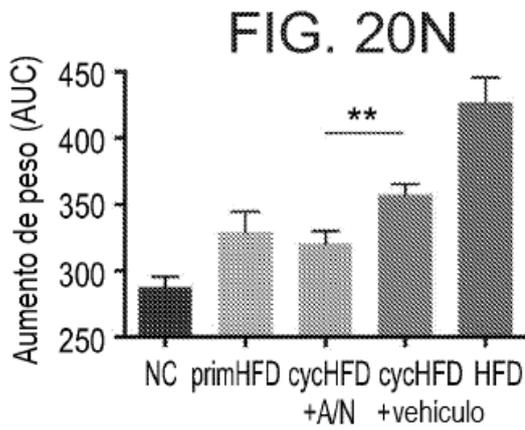
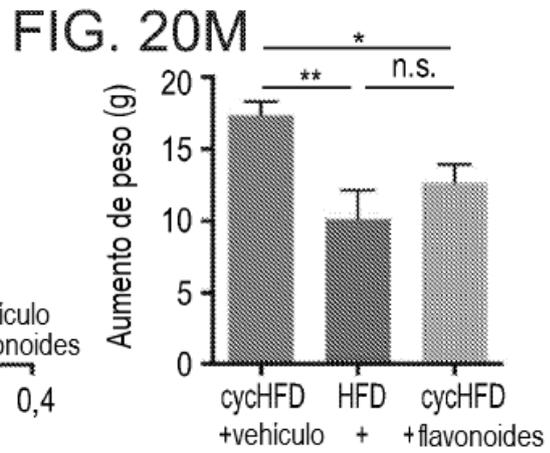
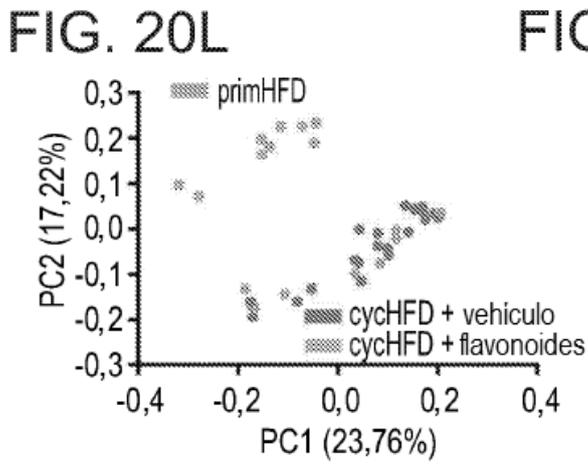
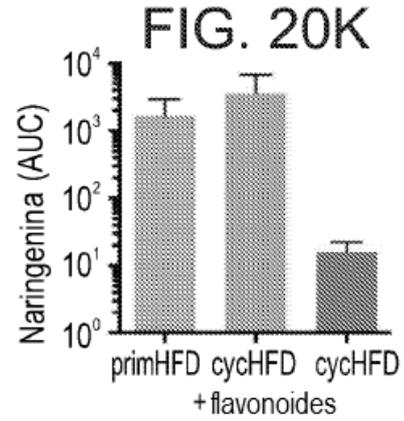
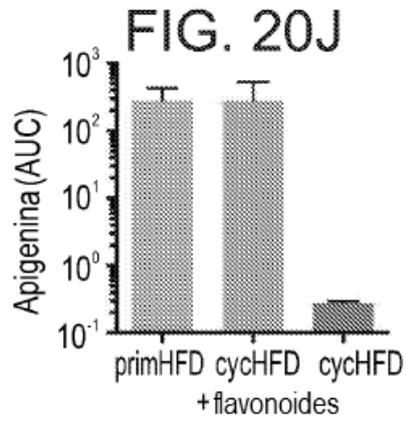
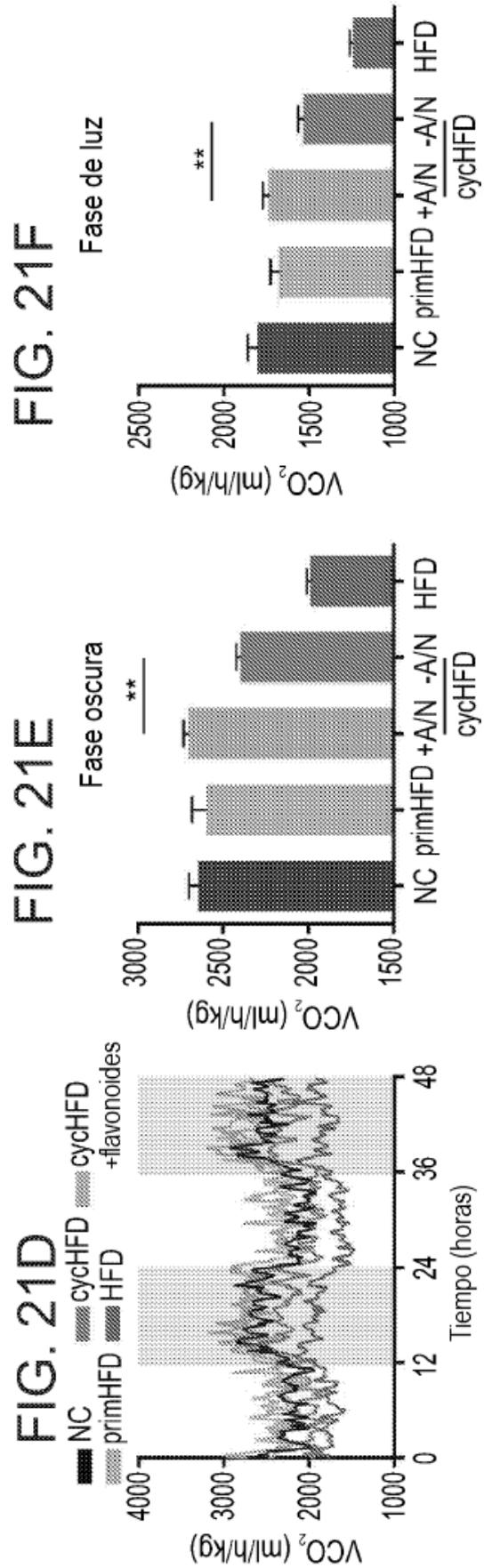
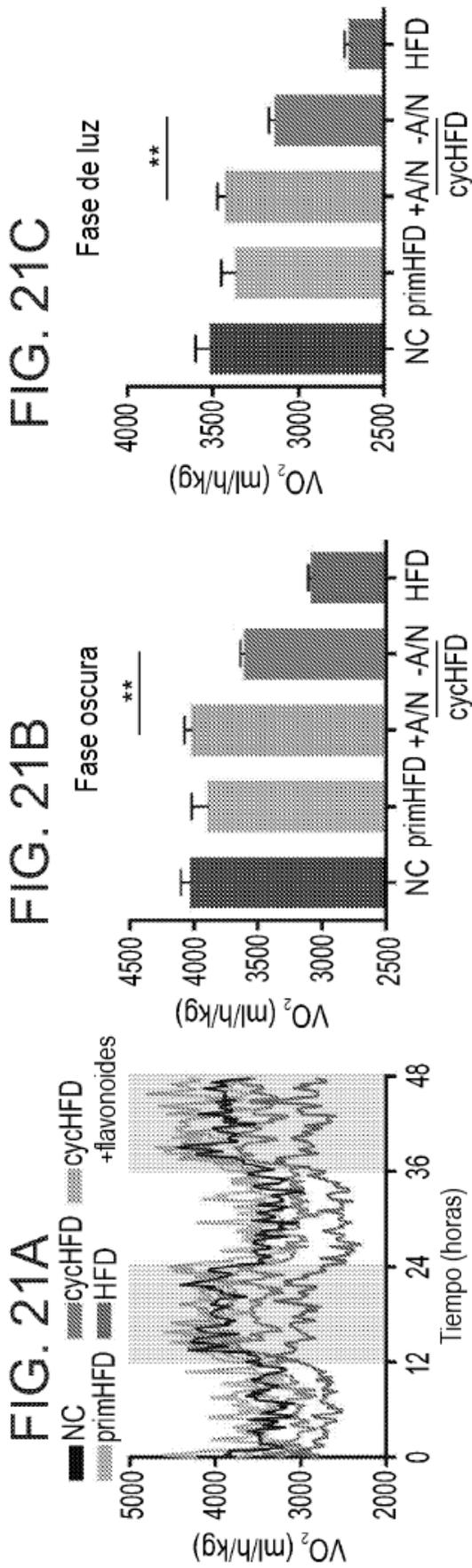
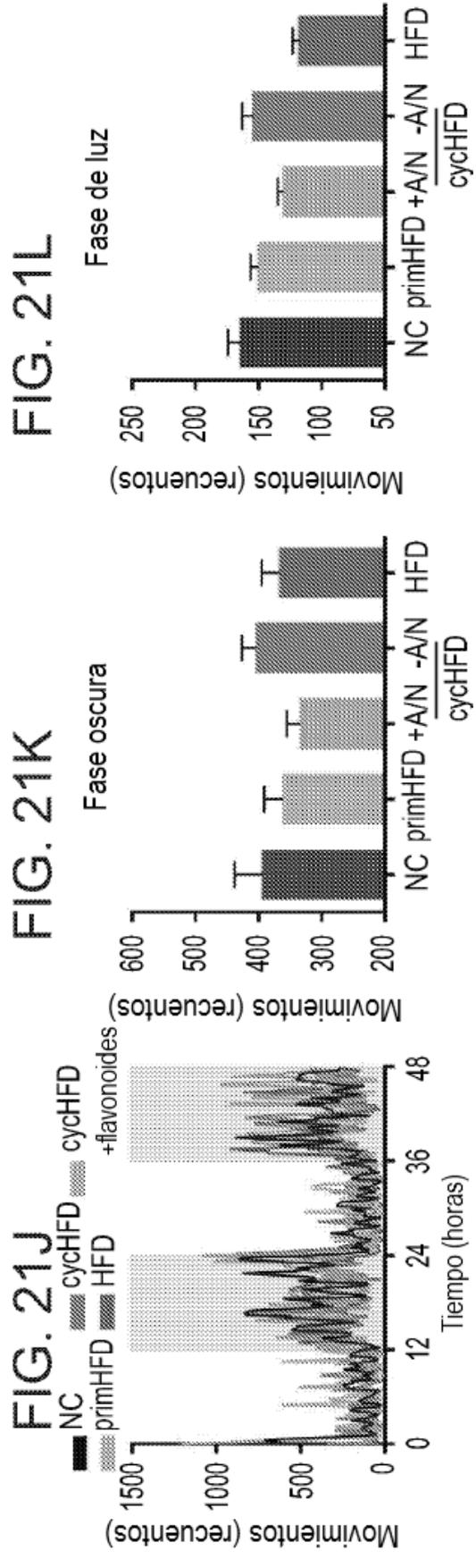
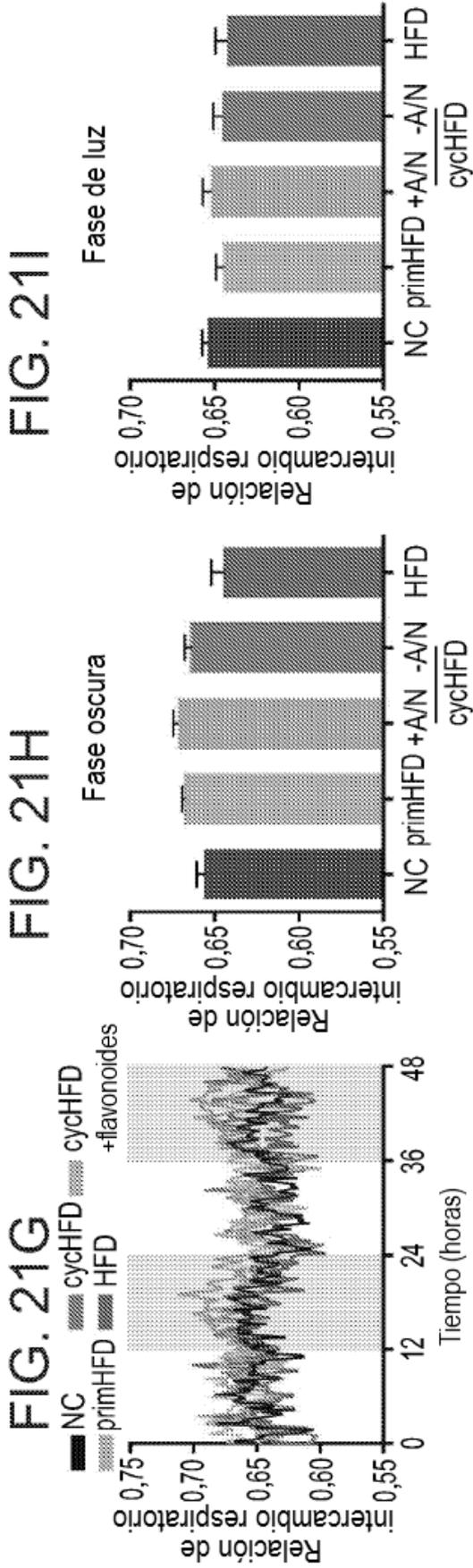


FIG. 20I









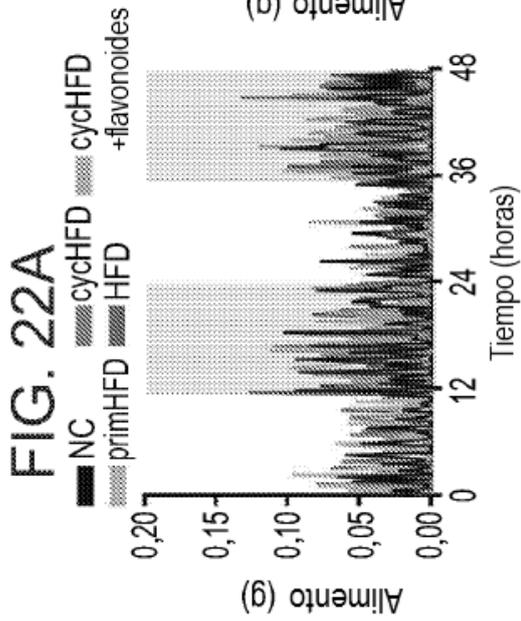


FIG. 22B

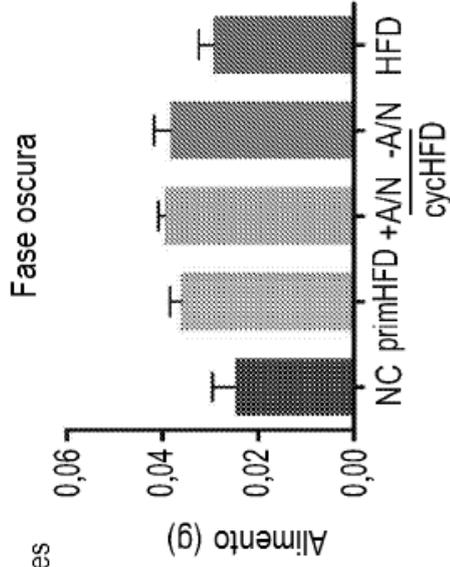


FIG. 22C

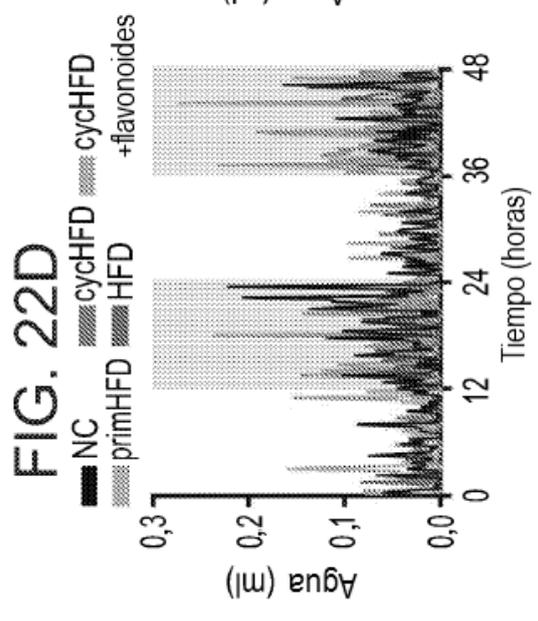
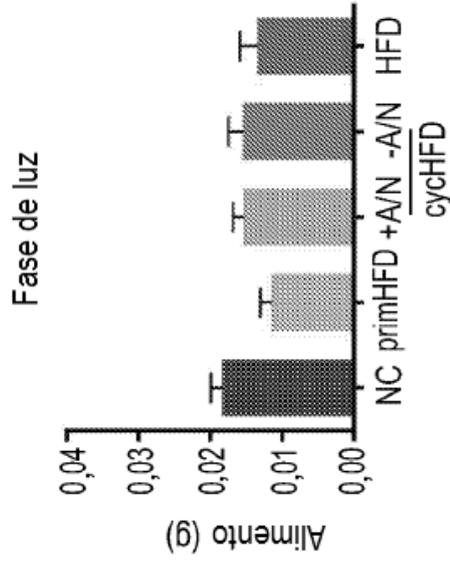


FIG. 22E

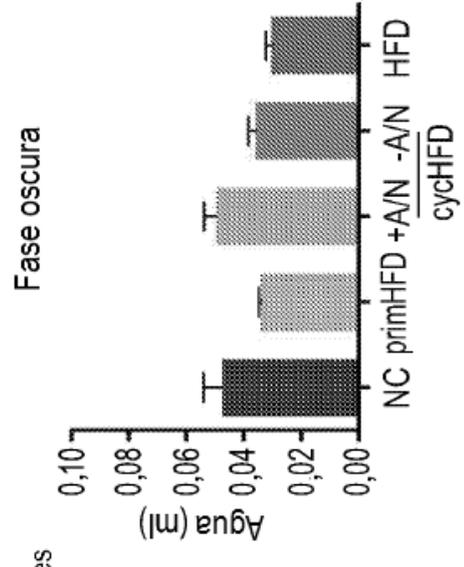
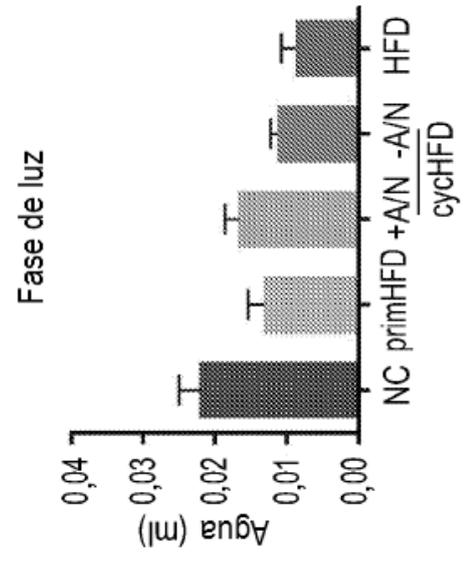
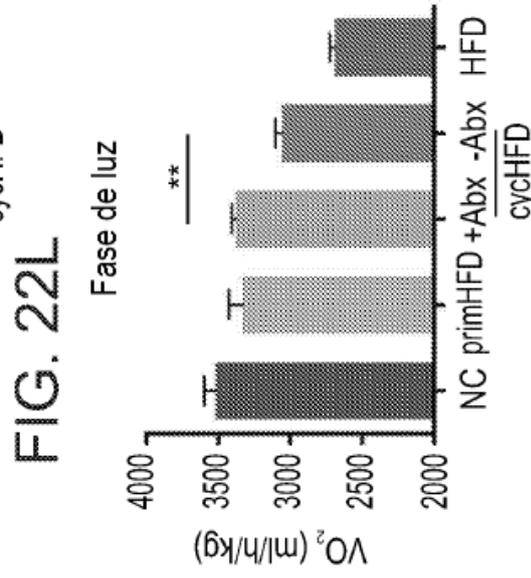
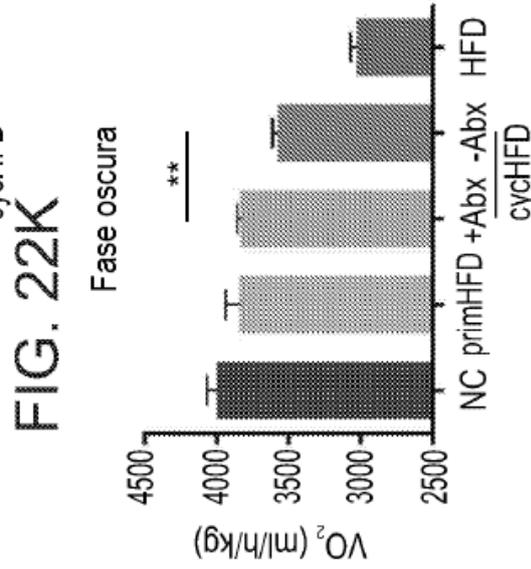
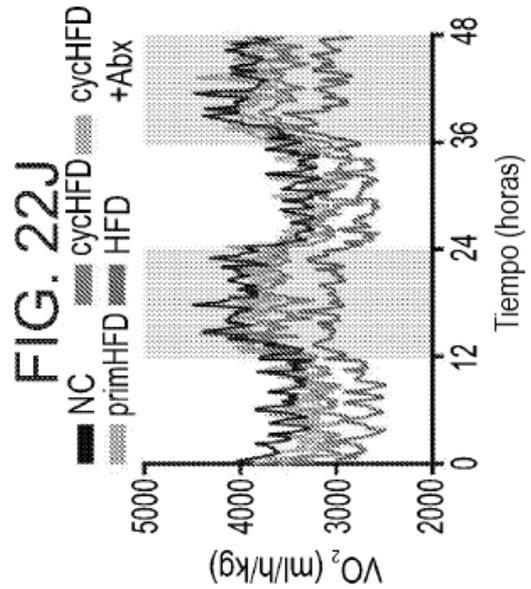
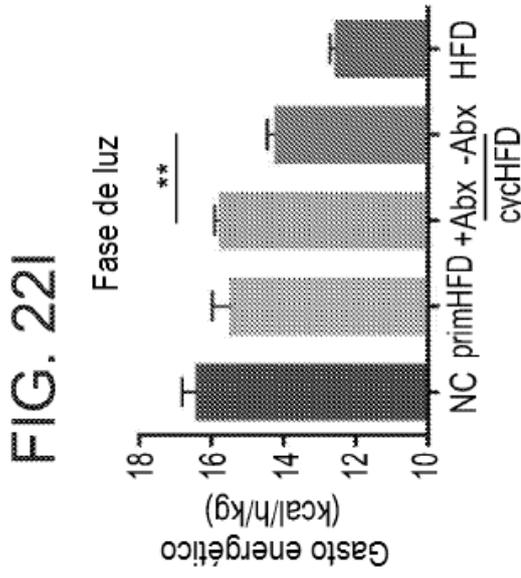
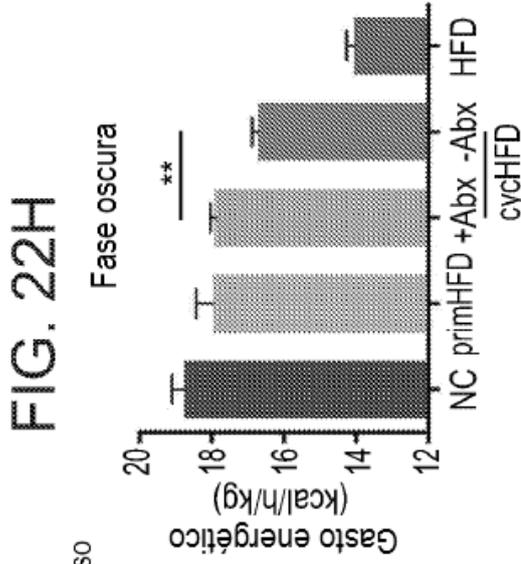
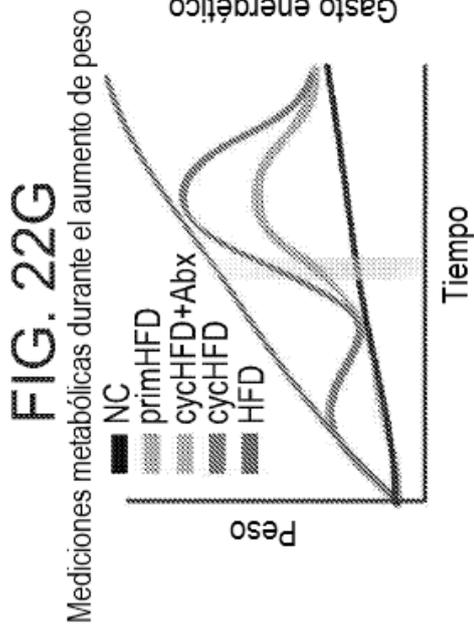


FIG. 22F





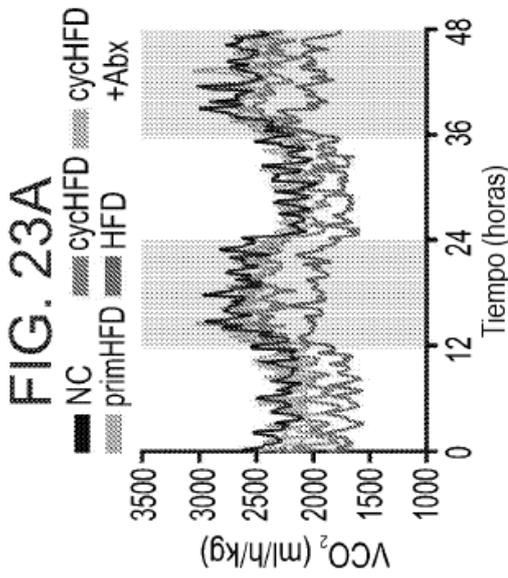


FIG. 23B

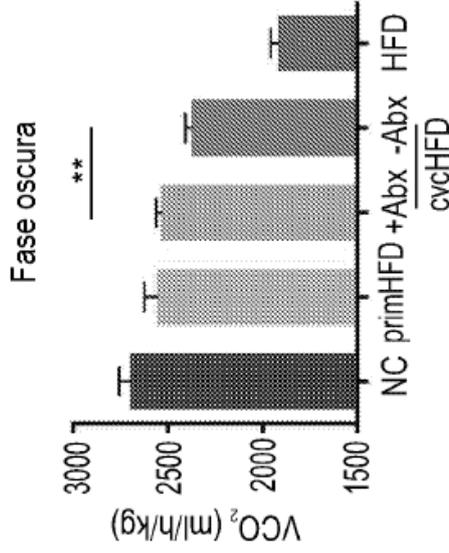


FIG. 23C

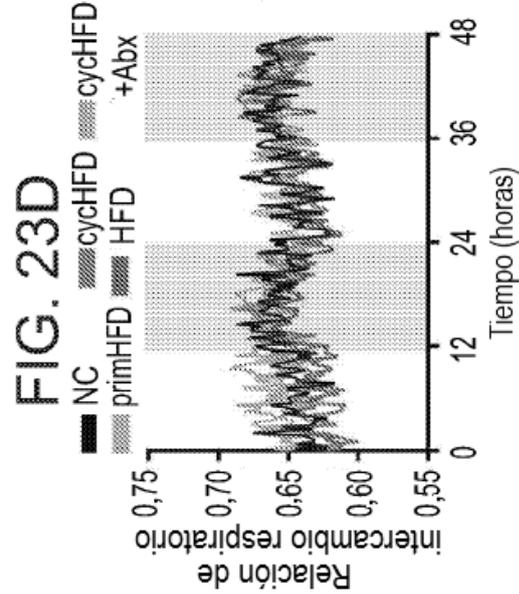
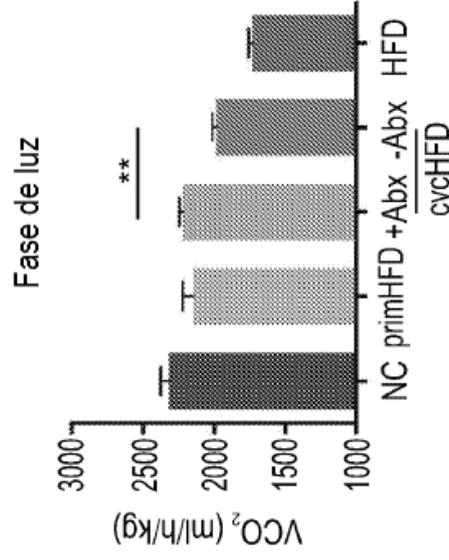


FIG. 23E

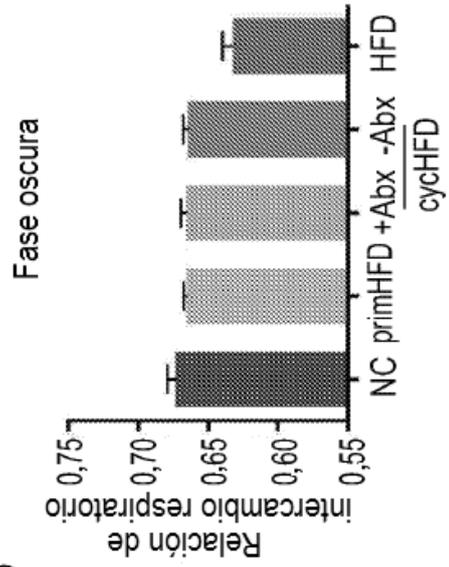


FIG. 23F

