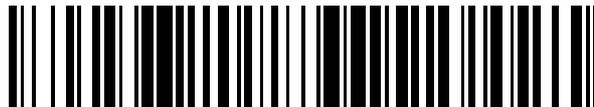


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 940**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
A23L 1/305	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
C07K 14/415	(2006.01)
A61K 38/01	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2011 E 11712058 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2563378**

54 Título: **Péptidos de proteína de guisante con actividad anti-Helicobacter pylori**

30 Prioridad:

29.03.2010 WO PCT/NL2010/050158

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

13.10.2014

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)
Eerste Stationsstraat 186
2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**GEORGI, GILDA ELISE;
EULER, MARCO;
MANK, MARKO;
HENSEL, ANDREAS;
NIEHUES, MICHAEL;
KLAPPERICH, MONIKA y
STAHL, BERND**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 506 940 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

Péptidos de proteína de guisante con actividad anti-*Helicobacter pylori*

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales, en particular *Helicobacter pylori*.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Las infecciones gastrointestinales suponen un gran problema en muchos seres humanos, y particularmente en el bebé y pacientes con un sistema inmunitario debilitado o enfermedades gastrointestinales. Las enfermedades resultantes pueden suponer un riesgo para la vida. Las infecciones gastrointestinales son frecuentemente provocadas por *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium*, *Enterobacter* y *Helicobacter*, por ejemplo *Helicobacter pylori*.

[0003] La *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un bacteria flagelada, Gram negativa y microaerófila que coloniza la mucosa gástrica de los seres humanos tras la infección. La infección por *H. pylori* ha sido asociada a enfermedades gástricas graves, tales como gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico. *H. pylori* ha sido clasificada como un carcinógeno de grupo I por la Organización Mundial de la Salud. La infección por *H. pylori* normalmente es crónica y principalmente no se cura sin una terapia específica.

[0004] La infección por *H. pylori* se adquiere principalmente en la infancia temprana. Muchos niños se infectan durante los primeros 5 años de vida. A la edad de 10 años, la prevalencia total es más del 75% en los países en vías de desarrollo, mientras que en países desarrollados se infecta el 10%, pero la prevalencia puede aumentar al 30 - 40% en niños de grupos socio-económicos inferiores.

[0005] Con respecto a los problemas de tratamiento por antibióticos y profilaxis por vacunación, la adhesión, y por lo tanto la infección por *H. pylori* de la mucosa gástrica, debería ser evitada, idealmente por intervención oral dietética.

[0006] El tratamiento para erradicar la infección por *H. pylori* requiere entre tres y cuatro medicaciones con antibióticos. El tratamiento es muy caro y también existe el riesgo de que aumente la resistencia al antibiótico en cepas bacterianas y de reinfección después de la terapia fallida. El tratamiento en niños puede ser el método más rentable para reducir la incidencia de infección y la morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedades relacionadas con *H. pylori*. Hasta el momento no hay pautas en la necesidad de tratar niños. Aún no existe una vacuna humana. La profilaxis y la vacunación terapéutica han tenido éxito en modelos animales, pero la traducción a una vacuna humana sigue siendo difícil, debido en parte a que la inmunología del estómago aún no se conoce bien.

[0007] Con respecto a los problemas de tratamiento por antibióticos y a la profilaxis por vacunación, se debería evitar la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica. Sin adhesión de la bacteria, se puede minimizar el riesgo de inflamación relacionada que resulte en gastritis o posiblemente en cáncer. Se ha demostrado que la modulación dietética es útil como apoyo al tratamiento o profilaxis de infección por *H. pylori* in vivo e in vitro.

[0008] EP 1178104 se refiere a una composición nutricional que se compone de un aceite esencial específico y/o un compuesto puro específico aislado del aceite esencial para prevenir o tratar la infección por un organismo tipo *Helicobacter*. La composición nutricional también puede contener una fuente de carbohidratos, una fuente de grasa y/o una fuente de una proteína dietética, siendo una de ellas la proteína de guisante.

[0009] JP 2005255679 describe un polipéptido obtenido tratando leche de mantequilla con una proteasa que tiene no sólo un efecto inhibitorio de la adhesión de la *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica, sino también el efecto de desunir la *Helicobacter pylori* desuniendo los receptores de *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica.

[0010] JP 2001335504 describe un inhibidor de proliferación de *Helicobacter pylori* que contiene un hidrolizado enzimático de proteína de semilla de soja como sustancia activa.

[0011] WO 2008/043424 divulga una composición para el tratamiento y/o prevención de la infección por patógenos gastrointestinales, en particular *Helicobacter pylori* y/o una enfermedad asociada a la infección por dicho patógeno gastrointestinal en mamíferos. La composición se compone de un hidrolizado de proteína de guisante, de una proteína intacta de guisante y/o de un hidrolizado de proteína de leche de camello. Se describe un hidrolizado de proteína de guisante obtenido por hidrólisis por quimiotripsina y tripsina.

[0012] DE 10317935 describe el uso de caseína para preparar una composición para prevenir o tratar la infección por *Helicobacter* y para evitar enfermedades provocadas por la infección por *Helicobacter*.

5 Resumen de la invención

[0013] La presente invención proporciona el uso de una composición compuesta por péptidos específicos de proteína de guisante para el tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por dicho patógeno gastrointestinal en mamíferos, particularmente de infecciones por patógenos gastrointestinales seleccionadas del grupo consistente de *Helicobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter*, *Clostridium* y *Enterobacter*. La invención se refiere además al uso de hidrolizado específico de proteína de guisante, no producido por hidrólisis de quimiotripsina, para la preparación de una composición para tratar y/o prevenir la infección o enfermedad, especificadas anteriormente.

[0014] Los presentes inventores han descubierto que un hidrolizado específico de proteína de guisante es capaz de inhibir la adhesión de *H. pylori* a las células de mucosa gástrica. La inhibición de adhesión hace que estos componentes de proteína sean especialmente adecuados para su uso en un método para el tratamiento y/o prevención de infección por *Helicobacter*. El hidrolizado de proteína de guisante ha sido obtenido por hidrólisis de proteína de guisante aislada por tripsina. Se aislaron e identificaron los péptidos responsables de la inhibición de adhesión. Se descubrió que los péptidos de la presente invención Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg (SEC ID n° 1) y Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg (SEC ID n° 2), que forman parte de la legúmina A y de la vicilina del guisante, inhiben la adhesión de *H. pylori* a las células gástricas. Debido a que estos péptidos tienen un sitio de escisión de quimiotripsina, el hidrolizado de proteína de guisante puede ser obtenido mediante hidrólisis por proteasas, preferiblemente por tripsina, siempre y cuando la proteasa no sea quimiotripsina, o con una preparación de proteasa, preferiblemente preparación de tripsina, que no tenga actividad sustancial de quimiotripsina.

[0015] El presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante pueden ser fácilmente añadidos a fórmulas para lactantes, productos de niño, y productos para gente joven. El uso seguro y fácil de este componente de proteína hace que la invención tenga una importancia particular, ya que se evitan los problemas de efectos secundarios normalmente provocados con medicamentos y las caras multiterapias medicinales. El presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante también pueden ser usados por adultos adecuadamente. El presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante no se deben administrar separadamente (por ejemplo a bebés), pero se pueden coadministrar dentro de una composición nutricional.

[0016] Debido a que la duración aumentada de la lactación exclusiva durante la infancia puede tener un efecto de protección a largo plazo contra la infección crónica por *H. pylori* y por lo tanto contra el riesgo de carcinoma gástrico, es particularmente deseable también proteger a bebés que reciben una fórmula infantil contra la infección por *H. pylori*.

40 Descripción detallada

[0017] Así, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención y/o reducción del riesgo de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero, dicho método consta de la administración a dicho mamífero de una composición que compuesta por hidrolizado de proteína de guisante, siempre y cuando dicho hidrolizado de proteína de guisante no se obtenga mediante hidrólisis por la quimiotripsina de proteasa. Preferiblemente el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene por hidrólisis con una proteasa además diferente a la quimiotripsina.

[0018] La invención puede también proporcionar el uso de una composición compuesta del hidrolizado de proteína de guisante para la producción de una composición para tratar y/o prevenir la infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero, siempre y cuando dicho hidrolizado de proteína de guisante no se obtenga por hidrólisis por la quimiotripsina de proteasa.

[0019] La invención se puede redactar como una composición compuesta por hidrolizado de proteína de guisante para su uso en el tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero, siempre y cuando dicho hidrolizado de proteína de guisante no se obtenga por hidrólisis por la quimiotripsina de proteasa.

[0020] En un aspecto la invención proporciona un método para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero, constando dicho método de la administración a dicho mamífero de una composición compuesta por al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-

Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m, donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10.

[0021] La invención también proporciona el uso de una composición compuesta por péptidos para producir una composición para tratar y/o prevenir la infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero, donde se selecciona el péptido del grupo consistente en Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m, donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10.

[0022] La invención puede también redactarse como una composición compuesta por al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m, donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10 para su uso en el tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero.

[0023] En otro aspecto, la invención también concierne una composición con un constituyente lipídico, proteínico y de carbohidrato donde el constituyente lipídico proporciona entre el 5 y el 50% de las calorías totales, el constituyente proteínico proporciona entre el 5 y el 50% de las calorías totales y el constituyente de carbohidrato proporciona entre el 15 y el 90% de las calorías totales, donde el constituyente proteínico está compuesto por (i) al menos una fuente de proteína consistente en el hidrolizado de proteína de guisante, siempre y cuando el hidrolizado de proteína de guisante no se obtenga por hidrólisis por la quimiotripsina de proteasa y por (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo consistente en las proteínas de leche, hidrolizado de proteína de la leche, proteínas de huevo, hidrolizado de proteínas de huevo, proteína de soja, hidrolizado de proteínas de soja, proteína de trigo, hidrolizado de proteína de trigo, proteína de arroz, hidrolizado de proteínas de arroz, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas.

[0024] En otro aspecto, la invención concierne a una composición con un constituyente lipídico, proteínico y de carbohidrato donde el constituyente lipídico proporciona entre el 5 y el 50% de las calorías totales, el constituyente proteínico proporciona entre el 5 y el 50% de las calorías totales y el constituyente de carbohidrato proporciona entre el 15 y el 90% de las calorías totales, donde el constituyente proteínico comprende (i) al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m, donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10 y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo consistente en las proteínas de leche, hidrolizado de proteína de la leche, proteína de huevo, hidrolizado de proteína de huevo, proteína de soja, hidrolizado de proteína de soja, proteína de trigo, hidrolizado de proteína de trigo, proteína de arroz, hidrolizado de proteína de arroz, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas.

Proteína

[0025] La presente invención proporciona una composición, y el uso de la misma para los tratamientos actuales, que contiene un hidrolizado de proteína de guisante, obtenido por proteasas diferentes a la quimiotripsina. El hidrolizado de proteína de guisante se obtiene por hidrólisis con otra proteasa además de la quimiotripsina, de forma más preferible el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene mediante hidrólisis con tripsina. De forma más preferible, la presente invención proporciona péptidos específicos de degradación de la proteína de guisante obtenible por hidrólisis de tripsina, es decir Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m, donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10. Por lo tanto n y m pueden ser independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una forma de realización preferida, cada uno de los péptidos Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m tienen un peso molecular calculado entre 1 kDa y 2.5 kDa, preferiblemente entre 1 kDa y 2 kDa, preferiblemente entre 1 y 1.5 kDa. En una forma de realización n y m son 0. Debido a que estos péptidos tienen un sitio de escisión de quimiotripsina, y debido a que se descubrió que los fragmentos más pequeños de estos péptidos eran inactivos, el hidrolizado de proteína de guisante no puede ser obtenido por hidrólisis con quimiotripsina o con tripsina más quimiotripsina. Tras consumir estos péptidos, éstos serán adicionalmente degradados en el tracto intestinal humano. No obstante, debido a que la quimiotripsina y otras enzimas como carboxipeptidasas y aminopeptidasas son liberadas sólo en el duodeno, los péptidos están presentes todavía en su forma activa en el estómago, lugar donde *H. pylori* está presente principalmente. Debido a que también se descubrió que estos péptidos son derivados de la legúmina A de proteína de guisante o vicilina, el hidrolizado de proteína de guisante es preferiblemente una legúmina A de guisante y/o hidrolizado de vicilina de guisante obtenido por otras proteasas además de la quimiotripsina, preferiblemente por tripsina. Las preparaciones comerciales de proteasas además de la quimiotripsina pueden contener pequeñas contaminaciones de quimiotripsina y por eso pueden mostrar

ES 2 506 940 T3

alguna actividad de quimiotripsina. Esto es aceptable para preparar los presentes hidrolizados. La pequeña actividad de quimiotripsina no llevará a hidrólisis sustancial en los péptidos de la SEC ID nº 1 y la SEC ID nº 2. Se considera que alguna actividad de quimiotripsina residual en los preparados de proteasa, en particular en los preparados de tripsina, solo es de influencia para el rendimiento de los péptidos en el hidrolizado que comprende la secuencia de SEC ID nº 1 o de SEC ID nº 2. Los métodos para hidrolizar proteína de guisante son conocidos en la materia. Así los péptidos de la SEC ID nº 1 y la SEC ID nº 2 se originan preferiblemente de proteína de guisante, pero también pueden ser proporcionados por una fuente diferente. Así en una forma de realización, los péptidos de SEC ID nº 1 y/o la SEC ID nº 2 se proporcionan en forma de una proteína de calidad alimenticia. En una forma de realización los péptidos de la SEC ID nº 1 y/o la SEC ID nº 2 se proporcionan en forma de hidrolizado de proteína de guisante.

[0026] Mediante cromatografía de filtración en gel, una metodología cromatográfica basada en la matriz entrecruzada agarosa/dextrano, se determinó el rango de peso molecular de los péptidos y/o glicoconjugados adhesivos anti-*Helicobacter* más eficaz en el presente hidrolizado de proteínas. Se ha observado que el rango en que los péptidos adhesivos anti-*Helicobacter* son eficaces se encuentra entre 300 y 10000 Da. Los péptidos adhesivos anti-*Helicobacter* eficaces se encuentran preferiblemente en el rango entre 500 y 5000 Da. Por lo tanto el presente hidrolizado de proteínas contiene preferiblemente al menos un 1% en peso en péptidos y/o glicoconjugados, preferiblemente péptidos, basados en el peso total del presente hidrolizado de proteínas, con un peso molecular de entre 300 y 10000 Da, preferiblemente al menos un 5% en peso, de forma más preferible al menos un 50% en peso, de la forma más preferible al menos un 75% en peso. De forma más preferible, el presente hidrolizado de proteínas comprende al menos un 1% en peso en péptidos y/o glicoconjugados, preferiblemente péptidos, basados en peso total del presente hidrolizado de proteínas, con un peso molecular de entre 500 y 5000 Da, preferiblemente al menos un 5% en peso, de forma más preferible al menos un 50% en peso, de la forma más preferible al menos un 75% en peso. A menos que se indique lo contrario, los pesos moleculares mencionados aquí se determinan por cromatografía de filtración en gel.

[0027] El presente hidrolizado de proteína de guisante se administra preferiblemente en una cantidad de 0,1 a 100 gramos al día, preferiblemente en una cantidad de 0.5 a 10 gramos al día. Los presentes péptidos de proteína de guisante se pueden administrar en una dosis inferior, es decir en una cantidad de 0.005 a 50 gramos al día, preferiblemente en una cantidad de 0.05 a 5 gramos al día.

[0028] En la forma más preferible, los péptidos de guisante de la presente invención se administran en forma de un hidrolizado de proteína de guisante. Alternativamente, los péptidos de guisante de la presente invención se pueden sintetizar o expresar a través de (micro-)organismos genéticamente modificados.

[0029] Preferiblemente la composición comprende hidrolizado de proteína de guisante, de forma más preferible un hidrolizado de proteína de guisante de fracción inferior a 10 kDa, de forma más preferible inferior a 7.5 kDa, debido a que la administración del hidrolizado fue la más activa en la prevención de la adhesión del *H. pylori*. Una fracción de hidrolizado de proteína de guisante preferida tiene un peso molecular medio de alrededor de 2 kDa. Una fracción del hidrolizado de proteína de guisante preferida tiene una concentración alta en el rango entre 1 kDa y 2.5 kDa. Por lo tanto se usan preferiblemente péptidos de guisante, obtenidos por hidrólisis de tripsina, con un tamaño de entre 1 y 2.5 kDa. Preferiblemente el hidrolizado de proteína de guisante supone más del 35% en peso, de forma más preferible más del 40% en peso péptidos con un tamaño de 1 kDa a 2.5 kDa, basado en peso total del hidrolizado de proteína de guisante.

Patógenos gastrointestinales

[0030] El presente método se refiere al tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a la infección por dicho patógeno gastrointestinal en mamíferos, particularmente al tratamiento y/o prevención de infecciones por un patógeno gastrointestinal seleccionado del grupo consistente en *Helicobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter*, *Clostridium* y *Enterobacter* y/o una enfermedad asociada a infección por dicho patógeno gastrointestinal en mamíferos.

[0031] La presente invención proporciona particularmente el tratamiento y/o prevención de infecciones por *Helicobacter* y/o una enfermedad asociada a infección por *Helicobacter* en mamíferos. La *Helicobacter* se selecciona preferiblemente del grupo consistente en la *Helicobacter pylori*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter salomonis*, *Helicobacter heilmannii* y *Helicobacter felis*. Preferiblemente la presente invención proporciona el tratamiento y/o prevención de infecciones por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y/o una enfermedad asociada a infección por *Helicobacter pylori* en mamíferos.

Composiciones alimentarias

[0032] Se ha observado que el presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante pueden ser aplicados ventajosamente en el alimento, tal como en alimentos y nutrición clínica para bebés, particularmente en

ES 2 506 940 T3

nutrición infantil. La presente composición nutricional comprende preferiblemente un constituyente lipídico, un constituyente proteínico y un constituyente de carbohidrato.

5 [0033] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición nutricional compuesta por el presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante y su uso en el presente método, donde el constituyente lipídico proporciona del 5 al 50% de las calorías totales, el constituyente proteínico proporciona del 5 al 50% de las calorías totales, el constituyente de carbohidrato proporciona del 15 al 90% de las calorías totales. La presente composición se usa preferiblemente como fórmula infantil, donde el constituyente lipídico proporciona del 35 al 50% de las calorías totales, el constituyente proteínico proporciona del 7.5 al 12.5% de las calorías totales, y el
10 constituyente de carbohidrato proporciona del 40 al 55% de las calorías totales. Para calcular el % de calorías totales para el constituyente proteínico, es necesario tomar el total de proteínas, péptidos y aminoácidos.

[0034] Además del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante, la presente composición contiene preferiblemente una fuente de nitrógeno adicional para uso nutricional. La fuente de nitrógeno
15 adicional se selecciona preferiblemente del grupo que consta de la proteína, péptido, aminoácidos y las mezclas de los mismos. Por lo tanto, en una forma de realización preferida el componente proteínico de la presente composición consta de: (i) al menos una fuente de proteína seleccionada del hidrolizado de proteína de guisante no obtenido por hidrólisis de quimiotripsina, y/o péptidos de proteína de guisante; y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo consistente en las proteína de la leche, proteínas del huevo, proteína de la soja, proteína del trigo, proteína del arroz,
20 aminoácidos libres y las mezclas de las mismas. Preferiblemente la presente composición está compuesta por hidrolizado de proteína de guisante (i) no obtenido por hidrólisis de quimiotripsina y/o péptidos de proteína de guisante y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo del suero de leche de vaca hidrolizado, suero de leche de vaca no hidrolizado, caseína de vaca hidrolizada, caseína de vaca no hidrolizada y proteína de soja no hidrolizada. El hidrolizado de proteína de guisante se obtiene preferiblemente por hidrólisis de tripsina.

25 [0035] Cuando el presente componente de proteína y en particular el presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante se administra en combinación con una fuente de nitrógeno adicional, la presente composición preferiblemente supone entre el 0.1 y el 50% en peso del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante y en particular entre el 1 y el 10% en peso del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante basado en peso total de proteína. Cuando el presente componente de proteína y en particular el presente hidrolizado de proteína de guisante se administra en combinación con una fuente de nitrógeno adicional, la presente composición preferiblemente comprende entre 1 y 50% en peso del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante y en particular entre 1 y 10% en peso del presente hidrolizado de proteína de guisante basado en peso total de proteína. Cuando el presente componente de proteína y en particular los presentes péptidos de proteína de guisante se administra en combinación con una fuente de nitrógeno adicional, la presente composición supone preferiblemente entre el 0.1 y el 50% en peso del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante y en particular entre el 0.1 y el 10% en peso del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante basado en peso total de proteína.

40 [0036] Se puede añadir una fuente de carbohidratos digeribles a la fórmula nutricional. La presente composición contiene preferiblemente lactosa.

[0037] En una forma de realización preferida, el efecto anti-infeccioso contra el patógeno gastrointestinal del presente componente de proteína y en particular el presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante, se mejora por co-administración de un oligosacárido soluble no digerible fermentable. La administración de estos oligosacáridos estimula el crecimiento de bacterias del ácido láctico tales como bifidobacterias y lactobacilos, previniendo la colonización e infección por patógenos gastrointestinales. Por lo tanto el presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante y el presente oligosacárido actúan sinérgicamente en este aspecto.

50 [0038] Preferiblemente la presente composición está compuesta por oligosacáridos no digeribles con un grado de polimerización (DP) entre 2 y 250, de forma más preferible 3 y 60. El oligosacárido no digerible se selecciona preferiblemente del grupo consistente en fructo-oligosacáridos (como inulina), galacto-oligosacáridos (como transgalacto-oligosacáridos o beta-galacto-oligosacáridos), gluco-oligosacáridos (como gentio-, nigero- y ciclodextrina-oligosacáridos), arabinooligosacáridos, mananoligosacáridos, xilooligosacáridos, fucooligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos,
55 glucomano-oligosacáridos, galactomano-oligosacáridos, ácido siálico que contiene oligosacáridos y oligosacáridos de ácido urónico. Preferiblemente la composición contiene goma arábiga en combinación con un oligosacárido no digerible.

[0039] La presente composición contiene preferiblemente fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y/o oligosacáridos de ácido galacturónico, de forma más preferible galacto-oligosacáridos, de la forma más preferible transgalacto-oligosacáridos. En una forma de realización preferida, la composición está compuesta por una mezcla de transgalacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos. La presente composición está compuesta preferiblemente por galacto-

ES 2 506 940 T3

- oligosacáridos con un DP de 2-10 y/o fructo-oligosacáridos con un DP de 2-60. El galacto-oligosacárido se selecciona preferiblemente del grupo consistente en transgalacto-oligosacáridos, lacto-N-tetrosa (LNT), lacto-N-neotetrosa (neo-LNT), fucosil-lactosa, LNT fucosilada y neo-LNT fucosilado. En una forma de realización particularmente preferida, el presente método consta en la administración de transgalacto-oligosacáridos ([galactosa]_n-glucosa; donde n es un número entero entre 1 y 60, es decir 2, 3, 4, 5, 6, ..., 59, 60; preferiblemente n se selecciona entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10). Los transgalacto-oligosacáridos (TOS) se venden por ejemplo bajo la marca registrada Vivinal™ (Borculo Domo ingredients, Países Bajos). Preferiblemente los sacáridos del transgalacto-oligosacáridos son β-enlazados.
- 5
- [0040] El fructo-oligosacárido es un oligosacárido no digerible compuesto por una cadena de unidades de fructosa β-enlazada con un DP o DP medio entre 2 y 250, de forma más preferible entre 10 y 100. El fructo-oligosacárido incluye inulina, levano y/o un tipo mezclado de polifructano. Un fructo-oligosacárido especialmente preferido es la inulina. El fructo-oligosacárido adecuado para usar en las composiciones también se encuentra ya disponible comercialmente, por ejemplo Raftiline®HP (Orafti).
- 10
- [0041] Los oligosacáridos de ácido urónico se obtienen preferiblemente de la degradación de pectina. Los oligosacáridos de ácido urónico son oligosacáridos de ácido preferiblemente galacturónico. Por lo tanto la presente composición está compuesta preferiblemente por un producto de degradación de pectina con un DP entre 2 y 100. Preferiblemente el producto de degradación de pectina se obtiene a partir de pectina de manzana, pectina de remolacha y/o pectina cítrica. Preferiblemente la composición está compuesta por transgalacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido y un producto de degradación de pectina. La proporción de peso transgalacto-oligosacárido : fructo-oligosacárido : producto de degradación de pectina es preferiblemente (20 a 2) : 1: (1 a 3), de forma más preferible (12 a 7) : 1: (1 a 2).
- 15
- 20
- [0042] Preferiblemente, el oligosacárido de ácido urónico tiene una, preferiblemente dos, unidades de ácido urónico terminal, que puede ser libre o esterificado. Preferiblemente la unidad de ácido urónico terminal se selecciona del grupo consistente en el ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido altrurónico. Estas unidades pueden ser libres o esterificadas. En una forma de realización aún más preferida, la unidad de hexosa terminal (es decir ácido urónico) tiene un enlace doble, que está situado preferiblemente entre la posición C4 y C5 de la unidad de hexosa terminal. Preferiblemente una de las unidades de hexosa terminal contiene el enlace doble. Los grupos de ácido carboxílico en estas unidades de ácido urónico pueden ser libres o (parcialmente) esterificados, y preferiblemente son al menos parcialmente metilados.
- 25
- 30
- [0043] Los oligosacáridos de ácido urónico usados en la invención se obtienen preferiblemente a partir de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparano, carbohidratos bacterianos, sialoglicanos, fucoidano, fucooligosacáridos o carragenina, de forma más preferible de pectina y/o alginato. Los oligosacáridos de ácido urónico se preparan preferiblemente por digestión enzimática con lisasa, liasa y/o endopoligalacturonasa. Preferiblemente se usa hidrolizado o lisado de pectina. El presente oligosacárido de ácido urónico se obtiene preferiblemente por digestión enzimática de pectina con pectina lisasa, liasa péctica, endopoligalacturonasa y/o pectinasa.
- 35
- 40
- [0044] Tales oligosacáridos de ácido urónico previenen la adhesión de patógenos intestinales. Las composiciones que contienen la proteína de guisante péptidos/hidrolizado de la presente invención y el oligosacárido de ácido urónico tendrán un efecto anti-*H. pylori* mejorado.
- 45
- [0045] Un oligosacárido preferido es la sialilactosa, de forma más preferible la sialilactosa de 3', ya que este oligosacárido también interfiere con la adhesión del *H. pylori*. Las composiciones de la presente invención contienen adicionalmente sialilactosa, preferiblemente 3'sialilactosa, por lo que tendrán un efecto anti-*H. pylori* mejorado. Preferiblemente, la composición contiene entre 80 mg y 2 g de oligosacáridos no digeribles por cada 100 ml, de forma más preferible entre 150 mg y 1.50 g, incluso de forma más preferible entre 300 mg y 1 g por cada 100 ml. Basado en peso en seco, la composición preferiblemente contiene entre el 0.25% en peso y el 20% en peso, de forma más preferible entre el 0.5% en peso y el 10% en peso, incluso de forma más preferible entre el 1.5% en peso y el 7.5% en peso.
- 50
- [0046] Así en otra forma de realización, la presente invención concierne una composición que contiene un oligosacárido no digerible seleccionado del grupo consistente en el trans-galactooligosacárido, fructo-oligosacáridos, oligosacárido de ácido urónico y sialilactosa y
- 55
1. , a) hidrolizado de proteína de guisante, siempre y cuando dicho hidrolizado de proteína de guisante no se obtenga por hidrólisis por la quimiotripsina de proteasa o sea preferiblemente hidrolizado de proteína de guisante que se obtiene por hidrólisis con proteasa además de la quimiotripsina; y/o
- 60
2. b) al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en Xaa_n-Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg-Xaa_m y Xaa_n-Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg-Xaa_m, donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10.

[0047] Las irregularidades intestinales (por ejemplo heces duras, volumen de deposición insuficiente, diarrea) son un problema importante en muchos bebés y sujetos enfermos que tienen o están en riesgo de sufrir una infección por *H. pylori*. Estos sujetos reciben frecuentemente alimentos líquidos. Se ha observado que los problemas de deposición se pueden reducir administrando el presente componente de hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante en alimentos líquidos que tienen una osmolalidad entre 50 y 500 mOsm/kg, de forma más preferible entre 100 y 400 mOsm/kg. La prevención de problemas de deposición es de particular importancia cuando el presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante se usan juntos o después del tratamiento con antibióticos. Visto lo anterior, también es importante que el alimento líquido no tenga una densidad calórica excesiva, pero que todavía proporcione calorías suficientes para alimentar al sujeto. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica entre 0.1 y 2.5 kcal/ml, incluso de forma más preferible una densidad calórica de entre 0.5 y 1.5 kcal/ml, de la forma más preferible entre 0.6 y 0.8 kcal/ml.

Aplicación

[0048] La presente invención proporciona una composición y un método de tratamiento y/o prevención de la infección por patógenos gastrointestinales (particularmente *H. pylori*) y/o una enfermedad asociada a la infección por patógenos gastrointestinales (particularmente *H. pylori*) en un mamífero, preferiblemente un sujeto humano, consistiendo dicho método en la administración del presente hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de proteína de guisante al mamífero o sujeto humano. Las enfermedades asociadas a infección por patógenos gastrointestinales en seres humanos incluyen gastritis crónica persistente, diarrea, dolor abdominal, úlceras y/o cáncer de estómago. Las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* en seres humanos incluyen gastritis crónica persistente, úlceras y/o cáncer de estómago. La presente invención también proporciona el tratamiento y/o prevención de estas enfermedades en mamíferos, sujetos preferiblemente humanos en riesgo, o que necesiten tratamiento de las mismas.

[0049] La presente invención se refiere al tratamiento y/o prevención en un mamífero, preferiblemente un humano o un animal de compañía, de forma más preferible seres humanos. La presente composición es administrada ventajosamente a a) bebés de entre 0 y 5 años de edad, preferiblemente bebés entre 0 y 2 años y/o b) pacientes que sufren de enfermedades gastroduodenales, particularmente pacientes que sufren de úlcera péptica.

[0050] La presente invención también es especialmente adecuada para evitar una reinfección por patógenos gastrointestinales, particularmente *H. pylori*, después del tratamiento del mamífero con uno o varios antibióticos.

Ejemplo 1: Las fracciones de hidrolizado de proteína de guisante inhiben la adhesión de H. pylori a la mucosa gástrica.

1.1: Ensayo de anti-adhesión

[0051] Se cultivó *Helicobacter pylori* ATCC 700824 (J99) durante dos o tres pasos para minimizar el riesgo de conmutación variable de fase de genes OMP. Se incubó *H. pylori* durante 48 h bajo condiciones microaerófilas a 37°C en Tryptic Soy Agar (Becton Dickinson, Alemania), suplementado con un 5% de sangre de oveja defibrinada (Oxoid, UK). Se cultivaron las células epiteliales gástricas humanas (células AGS) en RPMI 1640 con L-glutamina (PAA, Alemania), suplementado con 10% de FCS, en los matraces de cultivo de tejido (75 cm², Sarstedt, USA) y microtituladoras de 6 pocillos (Sarstedt, USA) en 5% de CO₂.

[0052] El *H. pylori* crecido en el agar fue cosechado y resuspendido en un tampón carbonato estéril (pH 9.0) a una densidad de aproximadamente 1,0 x 10⁸ bacterias por ml. Se añadieron 10 µl de una solución FITC (1% en DMSO) y se incubaron con las bacterias durante 45 min. La etiquetación fluorescente finalizó con la granulación de las bacterias (3.150 x g, 5 min). Se lavaron las bacterias dos veces en PBS para eliminar el exceso de FITC y se resuspendieron suavemente para otro uso. El análisis in vitro de la actividad antiadhesiva de los compuestos de prueba contra el *H. pylori* en células AGS marcado con FITC se realizó mediante un método citométrico de flujo (Niehues & Hensel, 2009 J. Pharm. Pharmacol. 61: 1303-1307).

1.2 El bio-ensayo guió el fraccionamiento del hidrolizado de proteína de guisante.

[0053] Se disolvieron 50 gramos de proteína de guisante aislada (Nutralys® F85F, 84% p/p proteína de Roquette Frères (Lestrem, Francia) en 1.5 l de agua destilada a 50°C. Se comenzó la hidrólisis añadiendo 0.56 g de tripsina (Novo PTN 6.0S, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). Se controló el pH a 7.0 añadiendo NaOH. Se permitió que la reacción continuara durante 2 horas. Se detuvo el proceso mediante la inactivación térmica de la enzima a 85°C durante 5 min. Se granuló el material precipitado mediante centrifugado a 3,800 x g durante 20 min a 20°C y se ultrafiltró el sobrenadante con un dispositivo plate-and-frame usando una membrana PES 700 cm² 10 kDa NMWCO (UltranLab,

ES 2 506 940 T3

Schleicher&Schuell, Dassel, Alemania). El retenido fue liofilizado y usado para otra separación de los péptidos de guisante.

5 [0054] La actividad contra *H. pylori* fue determinada como se describe bajo 1.1. La proteína de guisante en sí mismo no mostró ninguna actividad antiadhesiva contra *H. pylori*. Tras la ultrafiltración del hidrolizado de proteína de guisante se descubrió actividad antiadhesiva (56% adhesión bacteriana con 0.5 mg/ml) en la fracción de retenido y no en la fracción de permeato.

10 [0055] El retenido de 10 kDa fue fraccionado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) utilizando una columna ID de 42 x 5.0 cm envasada con Toyopearl® HW-50S (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania). Se usó el carbonato de amonio hidrogenado 0.1 M, que contiene 2% (v/v) 2-propanol como fase móvil. Se accionó la columna a una velocidad de flujo de 4 ml/min a 4°C. Los compuestos de elución fueron monitoreados a UV 220 nm, las fracciones fueron recogidas en intervalos de 7 ml y agrupadas para producir cuatro fracciones mayores, es decir F1 a F4. F1 es el volumen de elución de aproximadamente 0 a 220 ml y muestra una adhesión del 76% a 0.5 mg/ml, F2 es el volumen de elución de aproximadamente 220 a 310 ml y muestra una actividad de adhesión del 94% a 0.5 mg/ml, F3 es el volumen de elución de aproximadamente 310 a 500 ml y muestra una actividad de adhesión del 25% a 0.5 mg/ml, y F4 es el volumen de elución de aproximadamente 500 a 720 ml y muestra una actividad de adhesión del 118% a 0.5 mg/ml.

20 [0056] Se consiguió otra purificación de F3 mediante cromatografía de fase inversa (RPC) utilizando una columna ID de 11.8 x 1.0 cm envasada con resina Amberchrom® CG-161S (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania). Las fases móviles usadas fueron 0.1% (v/v) TFA en el agua destilada (A) y 0.1% (v/v) TFA en el 2-propanol (B). La elución se realizó con un gradiente lineal empezando por 5% B a 60% B en 7 volúmenes de columna, velocidad de flujo 0.85 ml/min, UV 220 nm. Se recogieron fracciones cada una de 4 ml y se agruparon para obtener tres fracciones principales: F3.1 a F3.3. Las fracciones fueron liofilizadas antes de realizar otro análisis.

25 F3.1 tenía un volumen de elución de aproximadamente 3 a 33 ml, y mostraba actividad de adhesión del 109% a 0.5 mg/ml, F3.2 tenía un volumen de elución de aproximadamente 33 a 54 ml, y mostraba actividad de adhesión del 112% a 0.5 mg/ml, y F3.3 tenía un volumen de elución de aproximadamente 54 a 85 ml, y mostraba actividad de adhesión del 40% a 0.5 mg/ml, 70% a 0.2 mg/ml, y 78% a 0.1 mg/ml.

30 [0057] La distribución del tamaño molecular como se determinó con Calibration Superdex Peptide 10/300 GL (Amersham Biosciences Cat. No. 17-5176-01). Se diluyó una muestra de 2% p/v (sobrenadante tras el centrifugado) en 0.1% TFA en 30% ACN/agua. Los péptidos se detectaron por UV a 214 nm. La distribución de tamaño (porcentaje de área de total) fue de la siguiente manera:

Rango PM	GPC F1 (A0622)	GPC F2 (A0623)	GPC F3 (A0624)	GPC F4 (A0625)
> 10 kDa	3.7	16.4	0.0	0.0
10 kDa < > 7.5 kDa	3.9	15.2	0.2	0.1
7.5 kDa < > 5 kDa	11.6	16.9	1.4	0.4
5 kDa < > 2.5 kDa	29.0	16.3	23.9	4.3
2.5 kDa < > 1 kDa	29.8	17.3	46.3	21.0
1 kDa < > 0.5 kDa	11.3	9.8	16.2	23.6
< 0.5 kDa	10.7	8.2	11.9	50.6

35 [0058] El peso molecular medio de la fracción F3 está por lo tanto alrededor de 2 kDa con las máximas cantidades de péptidos en el rango entre 1 kDa y 2,5 kDa.

1.3 Identificación de los péptidos

40 [0059] Para la identificación no ambigua de péptidos activos, las fracciones F3.1, F3.2 y F3.3 fueron investigadas mediante un análisis de espectrometría de masas (MS) tándem MALDI-TOF-TOF. Las señales de péptidos presentes en las fracciones activas pero no encontradas en las mezclas inactivas fueron específicamente seleccionadas para la posterior secuencia de aminoácidos basada en la MS tándem. Se determinaron seis secuencias peptídicas (S1 a S6) mediante este método (secuencias dadas en la tabla 1) y se identificaron sin ambigüedad con el paquete de software ProteinPilot™ con el algoritmo de Paragon™ integrado (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Se escogieron los siguientes parámetros para permitir la atribución de aminoácidos a los datos del MS tándem MALDI mediante el

ES 2 506 940 T3

algoritmo de Paragon™: tipo de muestra: identificación; alquilación de cisteína: ninguna; digestión: tripsina; instrumento: 4800; factores especiales: ninguno; especies: ninguna restricción; foco de ID: modificaciones biológicas; base de datos: UniProt/Swiss-Prot (versión 23 de enero de 2007 que incluye una base de datos de contaminantes, ambos en el formato FASTA); esfuerzo de búsqueda: profundo.

5

[0060] Los péptidos S1 a S6 fueron identificados como fragmentos peptídicos de legúmina A de guisante o vicilina. Posteriormente los respectivos péptidos fueron sintetizados para otro análisis inequívoco en propiedades antiadhesivas (Thermo Fisher Scientific (Ulm, Alemania). El endecapéptido S3 resultó ser el compuesto más activo a la hora de reducir la adhesión bacteriana de *H. pylori* significativamente a 81 y 83% respectivamente (75 resp. 150 μ M que correspondiente a 0.1 resp. 0.2 mg/ml). También se aplicaron al S5, que inhibió la adhesión en un 6 a 17% (75 resp. 150 μ mol), dos de los péptidos activos obtenidos de la digestión triptica de la proteína de guisante.

10

Tabla 1: secuencias de los péptidos S1 a S6, de péptidos sintéticos S3A a S3H, con la adhesión media (\pm SEM) de *H. pylori* marcado por FITC a células AGS tras el pretratamiento de las bacterias con los respectivos péptidos. Los datos están relacionados con el control no tratado de *H. pylori* (= 100%). Control positivo: 3'sialilactosa (15 mM).

15

Compuesto de prueba	Secuencia de aminoácidos	Rel. adhesión en [%] (\pm SEM; n=3)	
		75 μ M	150 μ M
S1	Leu-Asp-Ala-Leu-Glu-Pro-Asp-Asn-Arg-Ile-Glu-Ser-Glu-Gly-Gly-Leu-Ile-Glu-Thr-Trp-Asn-Pro-Asn-Asn-Lys (SEC ID n° 3)	95 \pm 10	104 \pm 7
S2	Leu-Asn-Ile-Gly-Pro-Ser-Ser-Ser-Pro-Asp-Ile-Tyr-Asn-Pro-Glu-Ala-Gly-Arg (SEC ID n° 4)	93 \pm 8	94 \pm 6
S3	Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg (SEC ID n° 1)	81 \pm 3	83 \pm 6
S4	Trp-Glu-Arg-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-Gln-Val-Asp-Glu-Glu-Trp-Arg (SEC ID n° 5)	98 \pm 2	107 \pm 2
S5	Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg (SEC ID n° 2)	94 \pm 2	85 \pm 2
S6	Gly-Asp-Phe-Glu-Leu-Val-Gly-Gln-Arg (SEC ID n° 6)	94 \pm 3	97 \pm 2
S3A	Asp-Phe-Leu-Glu-Asp (SEC ID n° 7)	102 \pm 3	108 \pm 6
S3B	Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg (SEC ID n° 8)	97 \pm 4	104 \pm 1
S3C	Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg (SEC ID n° 9)	95 \pm 5	100 \pm 4
S3D	Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg (SEC ID n° 10)	89 \pm 4	89 \pm 3
S3E	Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val (SEC ID n° 11)	91 \pm 4	91 \pm 4
S3F	Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe (SEC ID n° 12)	85 \pm 3	90 \pm 5
S3G	Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val (SEC ID n° 13)	93 \pm 2	94 \pm 3
S3H	Asp-Ala-Phe	104 \pm 6	105 \pm 1
Control no tratado	-	100 \pm 2	100 \pm 2
Control positivo	-	70 \pm 5	70 \pm 5

[0061] Se realizó un experimento similar al descrito en el ejemplo de WO 2008/043424. Brevemente, la digestión de la proteína de guisante fue micro-fraccionada por cromatografía de nanofase inversa (C18) y cada fracción se localizó en línea en un objetivo MALDI. Se verificaron cada uno de los 832 puntos para la presencia de los péptidos mencionados S3 (m/z 1339) y S5 (m/z 1418) por espectrometría de masas MALDI-TOF. En el péptido de conclusión no se pudo identificar S5 de ninguna manera. Del péptido S3 sólo se encontraron rastros.

20

1.4 Inhibición de la adhesión de *H. pylori* in situ

25

[0062] Para confirmar estos resultados, se investigó la actividad anti-adhesiva de esta fracción F3, al igual que del péptido S3, en el ensayo in situ en el tejido gástrico humano. Se realizaron los experimentos in situ con cortes histológicos de la mucosa gástrica humana y de *H. pylori* marcado con FITC según Lengsfeld et al, 2004, J. Agricul. Food Chem: 52,1495-1503, y se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. Se evaluó la adhesión del *H. pylori* marcado con FITC al epitelio mediante microscopía de fluorescencia y tomografía. Se evaluó la cantidad de bacterias adheridas a la superficie epitelial bajo condiciones doblemente ciegas. La adhesión máxima fue expresada como adhesión total 100%. Se calculó la intensidad del área de fluorescencia mediante el software ImageJ® (Olympus, Alemania), estandarizando el área fluorescente del control negativo como 100%.

[0063] El *H. pylori*, pretratado con fracción F3 (1.0 mg/ml), mostró una adhesión considerablemente disminuida en este sistema de prueba (aproximadamente una inhibición del 70%). También el S3 (300 µM redujo la adhesión bacteriana considerablemente (aproximadamente una inhibición del 40%). Estos datos confirman claramente la actividad antiadhesiva de F3 y S3. Por otro lado el fraccionamiento guiado por bioensayo indicó también una actividad no lineal de especie de perfilado: los efectos antiadhesivos no aumentaron de forma constante durante los pasos de purificación peptídica, sino que disminuyeron para los péptidos individuales que fueron aislados y evaluados. Ésta es una indicación clara de la presencia de otros compuestos activos en la mezcla, que influyen en las propiedades antiadhesivas de la mezcla de forma sinérgica.

1.5 Relaciones actividad-estructura

[0064] Para obtener una relación actividad-estructura del endecapéptido S3 activo, se sintetizaron varios fragmentos que diferían en su longitud (S3A a S3H, ver Tabla 1). El análisis funcional demostró una pérdida general de fuerza inhibitoria en comparación con el péptido S3 nativo.

[0065] Solo los péptidos S3D, E, F y G bloquearon ligeramente la adhesión (aproximadamente una reducción del 10%). Si se compara con la secuencia de aminoácidos S3, se puede identificar un motivo homólogo con la secuencia tripeptídica terminal e integral, es decir Asp-Ala-Phe. Por lo tanto, se evaluó y demostró que el tripéptido sintetizado (Asp-Ala-Phe) S3H es inactivo, lo que posiblemente significa que esta secuencia puede sólo ser funcional si está integrada en una cadena peptídica más larga. Asumimos que, muy probablemente, se necesita la secuencia peptídica entera de al menos 11 aminoácidos como en S3 por su actividad inhibitoria a la adhesión bacteriana, debido a una posible formación de plegado peptídico tridimensional, necesario para las interacciones con el objetivo receptor. La existencia de determinada estructura secundaria y plegado peptídico tridimensional puede cambiar la funcionalidad de los péptidos. Para estos experimentos de ejemplo conformacional preliminar de los diferentes péptidos, con el software de condiciones de ejecución moleculares (MOE), indicaron un alto grado de plegado del endecapéptido S3 que estaba claramente ausente en los fragmentos de péptido molecularmente bajos S3A a S3H (datos no mostrados).

1.6 Especificidad de prevención de la adhesión

[0066] Se demostró la especificidad de los péptidos activos hacia las proteínas de la membrana externa (OMP) del *H. pylori* mediante un ensayo glicoconjugado dot blot siguiendo los métodos previamente descritos [Walz, et al. 2005, Glycobiology, 15,700-708; Valkonen et al, 1994,62 (9), 3640-3648].

[0067] Se marcaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de los poros de 0.2 µm con 2 µl de una solución que contenía 1 µg de glicoproteínas y neoglicoproteínas.

Una selección representativa de ligandos típicos para las adhesinas del *H. pylori* usadas para estos experimentos fueron conjugados de Lewis^b y el antígeno del grupo sanguíneo H tipo I, interactuando con el OMP BabA, 3'-sialilactosa interactuando específicamente con el OMP HpaA, sialil-Lewis^a y laminina conocida por interactuar con el OMP SabA, y fibronectina con una afinidad a la adhesina bacteriana todavía no determinada. Además, se usó la albúmina de suero humano (HSA) y la albúmina de suero bovino (BSA) como control para excluir una unión no específica del *H. pylori* a los compuestos marcados en la membrana. Además, se usó la 6'-sialilactosa para demostrar la especificidad de enlace de la HpaA a la 3'-sialilactosa. Se midió la fluorescencia de las bacterias marcadas adherentes pretratadas y no tratadas.

[0068] En casos de pretratamiento de *H. pylori* con F3, se observó una fuerte reducción en la interacción bacteriana con conjugados de Lewis^b, H tipo I- y 3'-sialilactose-HSA al igual que con fibronectina. F3 también afectó en un grado más pequeño a la unión con el conjugado sialil-Lewis^a, pero no con la laminina marcada. Este hallazgo claramente indica que la F3 interactúa específicamente con las adhesinas de *H. pylori* BabA, HpaA, con la adhesión de unión de fibronectina y de forma más débil también con SabA. En cambio los péptidos S3 y S5 mostraron sólo inhibición de la adhesión mediada Lewis^b-HSA, sugiriendo la inhibición de la adhesina BabA, mientras otras adhesinas no se veían influidas significativamente.

ES 2 506 940 T3

[0069] En conclusión, estas inhibiciones sugieren o bien un fuerte mimetismo o sitios de unión adicionales de péptidos de F3 a estructuras receptoras conocidas por BabA, HpaA, SabA y a una adhesina todavía no identificada con afinidad a la fibronectina de proteína de la matriz extracelular. Los péptidos purificados se mostraron significativamente menos activos que las fracciones más complejas, lo cual se debe a la inhibición monovalente de una única adhesina bacteriana por el péptido purificado. En cambio, el uso de una mezcla heterogénea compleja es capaz de interactuar con *H. pylori* OMPs en una estrategia multi-objetivo y por lo tanto llevar a un bloqueo de diferentes proteínas, responsables de la adhesión bacteriana. Esto demuestra claramente que en el supuesto de diferentes OMPs relevantes para un proceso de adhesión, se pueden usar posiblemente mezclas complejas de forma mucho más eficaz que los compuestos únicos altamente purificados.

[0070] Los presentes resultados del ejemplo 1 indican las ventajas de usar hidrolizado de proteína de guisante y/o péptidos de guisante para el tratamiento y/o prevención de infecciones por *H. pylori* y/o una enfermedad asociada a la infección por *H. pylori* en mamíferos.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0071]

<110> N.V. Nutricia

<120> Péptidos de proteína de guisante con actividad anti-*Helicobacter pylori*

<130> P6030455PCT1

<160> 13

<170> Versión PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido aislado de hidrolizado de proteína de guisante

<400> 1

Asp Phe Leu Glu Asp Ala Phe Asn Val Asn Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido aislado de hidrolizado de proteína de guisante

<400> 2

Glu Leu Ala Phe Pro Gly Ser Ala Gln Glu Val Asp Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 506 940 T3

<220>

<223> Péptido aislado de hidrolizado de proteína de guisante

5 <400> 3

Leu Asp Ala Leu Glu Pro Asp Asn Arg Ile Glu Ser Glu Gly Gly Leu
1 5 10 15

Ile Glu Thr Trp Asn Pro Asn Asn Lys
20 25

<210> 4

10 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido aislado de hidrolizado de proteína de guisante

<400> 4

Leu Asn Ile Gly Pro Ser Ser Ser Pro Asp Ile Tyr Asn Pro Glu Ala
1 5 10 15

Gly Arg

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido aislado de hidrolizado de proteína de guisante

<400> 5

30

Trp Glu Arg Glu Glu Asp Glu Glu Gln Val Asp Glu Glu Trp Arg
1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido aislado de hidrolizado de proteína de guisante

40

<400> 6

Gly Asp Phe Glu Leu Val Gly Gln Arg
1 5

45 <210> 7

<211> 5

ES 2 506 940 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 7

Asp Phe Leu Glu Asp
1 5

10 <210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 8

20 **Ala Phe Asn Val Asn Arg**
1 5

25 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 9

Leu Glu Asp Ala Phe Asn Val Asn Arg
1 5

35 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 10

Asp Ala Phe Asn Val Asn Arg
1 5

45 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición compuesta por hidrolizado de proteína de guisante donde el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene por hidrólisis con una proteasa diferente a la quimiotripsina para usar en el tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero.
- 10 2. Composición para su uso según la reivindicación 1 donde el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene hidrolizando la legúmina A de proteína de guisante o vicilina.
- 15 3. Composición para su uso según la reivindicación 1 o 2 donde el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene por hidrólisis mediante la tripsina de proteasa.
- 20 4. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el hidrolizado de proteína de guisante tiene más del 35 % de peso en péptidos con un tamaño de entre 1 y 2,5 kDa basado en peso total del hidrolizado de proteína de guisante.
- 25 5. Composición compuesta por al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en Xaa_n -Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg- Xaa_m y Xaa_n -Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg- Xaa_m , donde cada Xaa independientemente puede ser cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y 10 para su uso en el tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a infección por patógenos gastrointestinales en un mamífero.
- 30 6. Composición para su uso según la reivindicación 5, donde el péptido está comprendido en el hidrolizado de proteína de guisante.
- 35 7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el patógeno gastrointestinal se selecciona del grupo consistente en el *Helicobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium* y *Enterobacter*.
- 40 8. Composición para usar según la reivindicación 7, donde el patógeno es *Helicobacter*, de forma más preferible *Helicobacter pylori*.
- 45 9. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la enfermedad asociada a la infección se selecciona del grupo consistente en gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico.
- 50 10. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el mamífero es (i) un bebé de entre 0 y 5 años de edad o (ii) un paciente que sufre de enfermedades gastroduodenales.
- 55 11. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para evitar la reinfección por el patógeno tras el tratamiento del mamífero con uno o varios antibióticos.
- 60 12. Composición con un constituyente lipídico, proteínico y de carbohidrato donde el constituyente lipídico proporciona del 5 al 50 % de las calorías totales, el constituyente proteínico proporciona del 5 al 50 % de las calorías totales y el constituyente de carbohidrato proporciona del 15 al 90 % de las calorías totales, caracterizado por el hecho de que el constituyente proteínico consta de: (i) al menos una fuente de proteína consistente en el hidrolizado de proteína de guisante, donde el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene por hidrólisis con una proteasa además de la quimiotripsina y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo consistente en la proteína de leche, hidrolizado de proteína de leche, proteína de huevo, hidrolizado de proteína de huevo, proteína de soja, hidrolizado de proteína de soja, proteína de trigo, hidrolizado de proteína de trigo, proteína de arroz, hidrolizado de proteína de arroz, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas.
- 65 13. Composición según la reivindicación 12 donde el hidrolizado de proteína de guisante se obtiene por hidrólisis por la tripsina de proteasa.
- 70 14. Composición con un constituyente lipídico, proteínico y de carbohidrato donde el constituyente lipídico proporciona del 5 al 50 % de las calorías totales, el constituyente proteínico proporciona del 5 al 50 % de las calorías totales y el constituyente de carbohidrato proporciona del 15 al 90 % de las calorías totales, **caracterizado por el hecho de que** el constituyente de proteína consta de: (i) al menos una fuente de proteína que consiste en péptidos seleccionados del grupo consistente en Xaa_n -Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg- Xaa_m y Xaa_n -Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg- Xaa_m , donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son

ES 2 506 940 T3

- números enteros que varían independientemente entre 0 y 10, y (ii) al menos una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo consistente en proteína de leche, hidrolizado de proteína de la leche, proteína de huevo, hidrolizado de proteína de huevo, proteína de soja, hidrolizado de proteína de soja, proteína de trigo, hidrolizado de proteína de trigo, proteína de arroz, hidrolizado de proteína de arroz, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas.
- 5
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, compuesta por al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en el suero de leche de vaca hidrolizado, suero de leche de vaca no hidrolizado, caseína de vaca hidrolizada, caseína de vaca no hidrolizada, proteína de soja hidrolizada y proteína de soja no hidrolizada.
- 10
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 compuesta por un oligosacárido soluble, no digerible y fermentable.
17. Composición compuesta por un oligosacárido no digerible seleccionado del grupo consistente en transgalactooligosacáridos, fructo-oligosacáridos, oligosacárido de ácido urónico y sialilactosa, y
- 15
- a. hidrolizado de proteína de guisante, que se obtiene por hidrólisis con una proteasa diferente de la quimiotripsina; y/o
- b. al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en Xaa_n -Asp-Phe-Leu-Glu-Asp-Ala-Phe-Asn-Val-Asn-Arg- Xaa_m y Xaa_n -Glu-Leu-Ala-Phe-Pro-Gly-Ser-Ala-Gln-Glu-Val-Asp-Arg- Xaa_m , donde cada Xaa puede ser independientemente cualquier aminoácido y n y m son números enteros que varían independientemente entre 0 y
- 20
- 10.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 con una osmolalidad entre 50 y 500 mOsm/kg.
- 25
19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en forma de una composición farmacéutica o nutricional.
20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19 para su uso en un mamífero para su uso en el tratamiento y/o prevención de infección por patógenos gastrointestinales y/o una enfermedad asociada a infección por dicho patógeno gastrointestinal, preferiblemente por *H. pylori*.
- 30