

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 814**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/127</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/18</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/19</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/123</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2010 PCT/FR2010/050926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10130956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2010 E 10730816 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2430044**

54 Título: **Péptidos que aumentan la secreción y/o la expresión de al menos una mucina gastrointestinal y/o que inducen el aumento de la población de células de moco o células de Paneth**

30 Prioridad:

**13.05.2009 FR 0953165**

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

**26.11.2019**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) (100.0%)  
147, rue de l'Université  
75338 Paris Cedex 07, FR**

72 Inventor/es:

**PLAISANCIÉ, PASCALE;  
CLAUSTRE, JEAN;  
ESTIENNE, MONIQUE;  
JOURDAN, GÉRARD;  
LEONIL, JOËLLE;  
HENRY, GWÉNAËLE;  
MOLLE, DANIEL;  
MADEC, MARIE-NOËLLE;  
GOGLY, RACHEL y  
PAQUET, ARMELLE**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**Observaciones :**

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

ES 2 732 814 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 que aumentan la secreción y/o la expresión de al menos una mucina gastrointestinal y/o que inducen el aumento de la población de células de moco o células de Paneth

5

**[0001]** La presente invención tiene por objeto compuestos que permiten inducir un aumento de la expresión y/o la síntesis y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal. La presente invención también tiene por objeto compuestos que permiten inducir al menos una molécula de defensa intestinal expresada por células de Paneth tales como lisozima o alfa-defensina. La presente invención finalmente, tiene por objeto, compuestos que permiten inducir un aumento en la población de células de moco y/o células de Paneth.

10

**[0002]** El epitelio intestinal está organizado en criptas y vellosidades cuyas células se renuevan de forma rápida y continua. Esta renovación se realiza a partir de células madre multipotentes que se encuentran en la parte inferior de las criptas. Estas células pueden dividirse simétricamente (10 % de los casos) generando dos células madre adicionales que permanecerán en su nicho, o asimétricamente (90 % de los casos) al proporcionar una nueva célula madre y una célula progenitora hija con la intención de diferenciarse. Estas células progenitoras se convertirán en dos grandes familias de células especializadas capaces de garantizar las funciones intestinales de transporte, secreción (exocrina y endocrina) y defensa del cuerpo: las células absorbentes (enterocitos) y las células del linaje secretor que comprende las células caliciformes (o células de moco), células de Paneth y células enteroendocrinas.

15

**[0003]** El moco gastrointestinal es conocido por su papel en la protección de la superficie del epitelio del tracto gastrointestinal. Esta protección hace posible combatir ataques tales como el ácido, las enzimas digestivas, las toxinas o el alcohol, y también constituye una barrera natural contra ciertos tipos de patógenos (Deplancke et al. (2001) Am J Clin Nutr 73(6):1131S-1141S). Por lo tanto, los defectos en el establecimiento de este moco pueden inducir una alteración de la barrera de la mucosa y son el origen de numerosas patologías debidas, en particular, a una inflamación de las membranas mucosas gástricas e intestinales (Gibson et al. (2005) Gut 54:900-903, Einerhand et al. (2002) Eur J Gastroenterol Hepatol 14(7):757-65).

20

**[0004]** Los principales componentes del moco son las glucoproteínas de la familia de las mucinas. Éstas son polímeros de gran tamaño, compuestos por monómeros de glucoproteínas altamente glucosiladas. Se sabe que cuatro miembros de esta familia están involucrados en la formación de gel de moco: MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6 (Desseyn et al. (2000) Mol Biol Evol 17(8):1175-84). Un segundo grupo de mucinas asociadas con la membrana, a las que pertenecen MUC1, MUC3 y MUC4, también desempeña un papel en la protección del epitelio.

30

**[0005]** La MUC2 es la mucina principal presente en el moco intestinal. Recientemente se ha demostrado que la invalidación del gen *muc2* en ratones da como resultado la aparición de colitis y tumores intestinales (Velcich et al. (2002) Science 295(5560):1726-9). También se han observado modificaciones de la expresión de esta mucina en las enfermedades inflamatorias del intestino.

35

**[0006]** La mucina MUC2 se produce y se secreta por células epiteliales especializadas: células de moco o células caliciformes.

40

**[0007]** Las células de Paneth, por su parte, expresan la mucina MUC4 (Rong et al., (2005) J cell Physiol 202(1):275-84) y se caracterizan por la presencia, en su polo apical, de microgránulos que contienen particularmente lisozima, fosfolipasa A2 y alfa-defensinas (péptidos naturales para antibióticos). Las células de Paneth contribuyen así a la inmunidad innata y representan un importante sistema de defensa que permite mantener un entorno estéril en la luz del fondo de las criptas. Numerosos datos bibliográficos subrayan el papel de estas células en la defensa intestinal. Un defecto de lisozima en las células de Paneth se asoció fuertemente con la enterocolitis necrotizante neonatal (Coutinho et al. (1998) J Clin Pathol 51(7):512-4). Recientemente, se ha demostrado que la maduración de las células de Paneth va seguida de la muerte de bacterias que llegan al yeyuno, y el agotamiento de las células de Paneth predispone a las infecciones por *Shigella* (Fernandez et al. (2008) J Immunol 180(7):4924-30). El intestino de ratón agotado en células de Paneth también se caracteriza por una mayor penetración de la barrera mucosa por las bacterias comensales (Vaishnava et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105(52):20858-63). En los seres humanos, se ha descrito una disminución en la producción de las alfa-defensinas HD-5 y HD-6 por las células de Paneth en las formas ileales de la enfermedad de Crohn. Esta deficiencia da como resultado una disminución en la capacidad de la mucosa para eliminar diferentes cepas bacterianas de *Escherichia coli*, pero también de *Staphylococcus aureus*, o bacterias potencialmente anaerobias. Finalmente, es importante tener en cuenta que las células de Paneth no solo están involucradas con bacterias potencialmente patógenas. Su actividad antimicrobiana también regula la composición de la microbiota comensal. De hecho, Salzman et al (2010) Nat Immunol 11(1):76-83) han demostrado que los ratones *Mmp7<sup>-/-</sup>*, que no producen  $\alpha$ -defensinas funcionales, tienen una relación Firmicutes/Bacteroidetes significativamente mayor que ratones silvestres. De manera interesante, este tipo de relación también se observa en sujetos obesos, así como en diferentes modelos animales de obesidad (dieta hiperlipídica, ratones ob/ob, ...).

45

50

55

60

**[0008]** Actualmente se conocen pocos elementos sobre la regulación de la secreción y expresión de mucinas gastrointestinales o moléculas producidas por células de Paneth por los factores nutricionales. Algunos trabajos han

65

permitido caracterizar el efecto secretagogo de las fibras alimentarias y los ácidos grasos de cadena corta en las células de moco (Lundin et al. (1993) Scand J Gastroenterol 28(1):15-22, Sharma et al. (1995) Dig Dis Sci 40(12):2532-9, Sharma et al. (1995) Lab Invest 73(4):558-64, Barcelo et al. (2000) Gut 46(2):218-24, Satchithanandam et al. (1990) J Nutr 120(10):1179-84, Burger-van Paasen et al. (2009) Biochem J. Feb 2009 DOI BJ20082222, Hedemann et al. (2009) Brit J Nutr, 13: 1-9).

**[0009]** Más recientemente, los estudios se han centrado en el efecto de las  $\beta$ -casomorfina en la secreción de mucinas. Las  $\beta$ -casomorfina son una familia de péptidos opioides exógenos (exorfinas) derivados de la hidrólisis de una proteína de leche, caseína  $\beta$  (o  $\beta$ -caseína). Estos péptidos se liberan durante las distintas etapas de la digestión de las proteínas de la leche en el estómago y el intestino delgado y podrían atravesar las monocapas de células intestinales (Meisel et al. (2000) BR J Nutr 84 (Compl. 1): S27-31, Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009) Int Dairy J 19:252-257). También se liberan durante la fermentación de los productos lácteos. Se han identificado precursores de las  $\beta$ -casomorfina en productos fermentados y particularmente en yogur y queso (Schieber et al. (2000) Eur Food Res Technol 210:310-13, Sienkiewicz-Szlapka et al. (2009) Int Dairy J 19:258-263).

**[0010]** El principal representante de esta familia, la  $\beta$ -casomorfina-7, corresponde al fragmento [60-66] de la  $\beta$ -caseína bovina. Se ha demostrado que la  $\beta$ -casomorfina-7 es un potente secretagogo de moco *ex vivo* en el yeyuno de rata (Trompette et al. (2003) J Nutr 133(11):3499-503, Claustre et al. (2002) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283(3):G521-8) y que induce *in vitro* el aumento en la expresión de la mucina principal secretada MUC2 en la línea de colon mucípara de rata (DHE) (Zoghbi et al. (2006) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290(6):G1105-13).

**[0011]** En 1999, se identificó un péptido opiáceo novedoso en la secuencia de  $\beta$ -caseína bovina, la secuencia [114-119], denominada neocasomorfina-6 (Jinsmaa et al. (1999) Peptides 20:957-962).

## 25 Descripción de la invención

**[0012]** La presente invención se deriva de la inesperada demostración, por parte de los inventores, de que un péptido novedoso derivado de  $\beta$ -caseína bovina, correspondiente a los residuos 94-123 (SEQ ID NO: 1) de esta proteína, es un estimulante de la expresión y la secreción de mucinas gastrointestinales, es un estimulante de la expresión de la lisozima producida por las células de Paneth, e induce un aumento en la población de células de moco y células de Paneth.

**[0013]** Por lo tanto, la presente invención se define por las reivindicaciones.

**[0014]** Por lo tanto, la presente solicitud describe un polipéptido que comprende o está constituido por:

- SEQ ID NO: 1, o
- una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o
- una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO: 1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y
- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y

- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

y siempre que el polipéptido no comprenda la secuencia SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el polipéptido, como se define anteriormente, está constituido por la SEQ ID NO: 1.

**[0015]** SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia constituida por los aminoácidos 60 a 66 de la  $\beta$  caseína bovina.

**[0016]** El término "porcentaje de identidad" entre dos secuencias polipeptídicas se refiere al porcentaje de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se compararán. Las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas generalmente se realizan después de alinear óptimamente estas dos secuencias en toda su longitud. Este alineamiento se puede realizar manualmente o usando un programa informático. A modo de ejemplo de un programa informático, se puede mencionar el programa EMBOSS-Needle (alineamiento global Needleman-Wunsch) con la ayuda de la matriz BLOSUM62/Hueco abierto 10.0 y una penalización de extensión de 0,5 (Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; Kruskal (1983) An overview of sequence comparison en D. Sankoff y J.B. Kruskal, (ed)). Como se entiende en el presente documento, el número de posiciones para las cuales los aminoácidos son idénticos se divide entonces por el número total de aminoácidos de la más grande de las dos secuencias comparadas y el porcentaje de identidad se obtiene al multiplicar el resultado obtenido por 100. Un polipéptido que tiene, por

ejemplo, una identidad de al menos el 90 % con el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 es un polipéptido que comprende, a lo sumo, 3 aminoácidos modificados en 30 aminoácidos, con respecto a dicha secuencia. En otras palabras, hasta el 10 % de los aminoácidos en la secuencia SEQ ID NO: 1 se pueden eliminar o sustituir con un aminoácido adicional, o la secuencia puede comprender más o menos hasta un 10 % de aminoácidos, con respecto al número total de aminoácidos de la secuencia SEQ ID NO: 1.

**[0017]** Preferiblemente, la secuencia de al menos cuatro aminoácidos comprende al menos 4, 5, 10, 20 o 25 aminoácidos consecutivos comprendidos en la SEQ ID NO: 1, preferiblemente 20 aminoácidos.

10 **[0018]** Como se entiende en el presente documento, la secuencia homóloga puede comprender tanto las variantes naturales de la secuencia SEQ ID NO: 1, así como los mutantes artificiales.

**[0019]** Además, el polipéptido definido anteriormente puede modificarse, por ejemplo, reemplazando al menos un L-aminoácido por un D-aminoácido o por una modificación de la naturaleza química de al menos un aminoácido.  
15 Estas modificaciones, así como las mutaciones artificiales, son particularmente útiles para aumentar la estabilidad del péptido en el entorno gástrico e intestinal, en particular, para aumentar la estabilidad de los péptidos con respecto a proteasas y peptidasas digestivas tales como tripsina, quimotripsina y pepsina.

**[0020]** Los inventores han descubierto que el péptido según la invención es capaz de inducir *in vitro* la expresión y/o la secreción de mucinas gastrointestinales.  
20

**[0021]** Además, se ha demostrado que este efecto de inducción también existe *in vivo* y puede relacionarse, en particular, con un aumento en el nivel de transcritos que codifican las mucinas y con un aumento en el número de células secretoras de mucina, en particular el número de células de moco.  
25

**[0022]** La expresión y/o la secreción de mucinas gastrointestinales se puede determinar fácilmente por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica como se describe en particular por El Homsy et al. ((2007) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293(1):G365-73), Radhakrishnan et al. ((2007) Biochim Biophys Acta 1770(6):884-9) et Lu et al. ((2005) Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 288(1):L52-60)) y en particular, como se describe en el ejemplo 2 a continuación.  
30

**[0023]** A modo de ejemplo, la expresión de al menos una mucina gastrointestinal se puede determinar particularmente *in vitro* e *in vivo* mediante la cuantificación del ARNm de al menos una mucina o la cantidad de al menos una proteína de mucina producida por las células intestinales. Una medición de la expresión de una mucina mediante la estimación de la cantidad de ARNm que codifica la mucina en las células de moco puede realizarse, particularmente, como se describe *in vitro* en el ejemplo 2 e *in vivo* en el ejemplo 3. Una medición de la expresión de una mucina producida por las células de moco por inmunohistoquímica en secciones intestinales incorporadas en parafina con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra la mucina también se puede realizar como se describe en el ejemplo 3 o por ELISA, ELLA (ensayo de lecitina ligado a enzimas) y Western blot.  
35

**[0024]** A modo de ejemplo, la secreción de al menos una mucina gastrointestinal se puede determinar *in vitro* midiendo la cantidad de mucinas presentes en el medio de cultivo de las células mucosecretoras. Esta medición se puede realizar por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante Western blot, ELISA o ELLA como se describe particularmente en el ejemplo 2 con la ayuda de una lectina dirigida contra cadenas de oligosacáridos de las mucinas.  
40  
45

**[0025]** Los inventores también han demostrado que el péptido según la invención es capaz de inducir la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth.

50 **[0026]** Una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth puede ser, por ejemplo, la lisozima o una alfa-defensina, en particular, las alfa-defensinas HD5 y HD6, o la fosfolipasa A2 (sPLA2) o angiogenina 4 (Ang4) o el inhibidor de proteasa secretado por leucocitos (SLPI) o la proteína asociada al hepatocarcinoma-intestino-páncreas/páncreas (HIP/HAP) o RegIIIy (gen regenerador III), preferiblemente la lisozima.

55 **[0027]** La expresión de al menos una molécula de defensa intestinal puede determinarse, por ejemplo, *in vitro* e *in vivo* midiendo la cantidad de ARNm que codifica para al menos una molécula de defensa intestinal o la cantidad de al menos una proteína de defensa intestinal expresada por las células de Paneth. Una medición de la expresión de la lisozima se puede realizar, por ejemplo, por la estimación la cantidad de ARNm que codifica la lisozima en células de Paneth, particularmente como se describe en el ejemplo 3. Una medición de la expresión de lisozima producida por las células de Paneth también puede realizarse mediante inmunohistoquímica en secciones de intestino incorporadas en parafina con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra la lisozima como se describe particularmente en el ejemplo 3.  
60

**[0028]** A modo de ejemplo, la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal puede determinarse en particular *in vivo* midiendo la cantidad de moléculas de defensa intestinal presentes en el contenido de la luz

intestinal. Esta medición puede realizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante Western blot, o mediante técnica ELISA con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra la molécula de defensa a dosificar.

5 **[0029]** Los inventores también han demostrado que el péptido según la invención es capaz de inducir el aumento en la población de células de moco y/o células de Paneth.

**[0030]** El aumento de la población de células de moco y/o células de Paneth puede determinarse, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo* por la medición del número de células de moco y/o el número de células de Paneth. Los métodos para  
10 medir el número de células de moco y/o células de Paneth son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el número de células se puede determinar *in vivo* o *in vitro* por recuento, por ejemplo, en secciones de intestino incorporado en parafina e inmunomarcado con la ayuda de anticuerpos específicos, particularmente como se describe en el ejemplo 3.

15 **[0031]** Las células mucossecretoras usadas *in vitro* son preferiblemente células mucossecretoras intestinales tales como las células de la línea celular humana HT29-MTX o HT29-C116E.

**[0032]** La expresión determinar la expresión y/o la secreción de “al menos una” mucina o la expresión y/o la secreción de “al menos” una molécula de defensa intestinal indica que se puede determinar la expresión de una, dos,  
20 tres o más mucinas o de una, dos o tres o más moléculas de defensa intestinal. Preferiblemente, la mucina o mucinas cuya expresión y/o secreción se determina se seleccionan de las mucinas intestinales MUC2, MUC3 y MUC4 o gastrointestinales MUC5AC y MUC6. Preferiblemente, se trata de la mucina MUC2 y/o MUC4. Preferiblemente, la molécula o moléculas de defensa intestinal cuya expresión y/o secreción se determina se seleccionan de lisozima y alfa-defensinas. Preferiblemente, se trata de la lisozima.

25 **[0033]** Preferiblemente, el efecto de inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal o al menos una molécula de defensa intestinal corresponde a un aumento en la expresión y/o la secreción de al menos una de estas mucinas o al menos una de estas moléculas de defensa intestinal de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % con respecto a la expresión y/o la secreción obtenida en ausencia de  
30 péptido. Además preferiblemente, el efecto de inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal o al menos una molécula de defensa intestinal corresponde a un aumento en la expresión y/o la secreción de al menos una de estas mucinas o al menos una de estas moléculas de defensa intestinal de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % con respecto a la expresión y/o la secreción obtenida con un polipéptido constituido por la SEQ ID NO: 1 que se mide en las mismas condiciones.

35 **[0034]** En una realización particular, la solicitud describe el polipéptido como se define anteriormente para su uso como un medicamento, preferiblemente en el tratamiento de pacientes con un defecto de expresión y/o secreción de mucinas gastrointestinales y/o una alteración de la barrera de la mucosa gastrointestinal.

40 **[0035]** Las patologías relacionadas con un defecto de expresión y/o secreción de mucinas gastrointestinales y/o con una alteración de la barrera de la mucosa gastrointestinal incluyen todas las patologías relacionadas directa o indirectamente con una ausencia o insuficiencia de la expresión y/o la secreción de mucinas. Tales patologías pueden deberse a un agotamiento, disfunción o insuficiencia de las células de moco. Dichas patologías se conocen bien por los expertos en la técnica y se describen particularmente en Turner et al. (2003) *Cancer Chemother Biol Response*  
45 *Modif* 21:259-74), Utsunomiya et al. (1998) *Clin Cancer Res* 4:2605-14 y Nakamori et al. (1994) *Gastroenterol* 106:353-361.

**[0036]** Preferiblemente, las patologías relacionadas con un defecto de expresión y/o secreción de mucinas gastrointestinales y/o una alteración de la barrera de la mucosa gastrointestinal se seleccionan del grupo que consiste  
50 en inflamación intestinal, particularmente crónica, infección intestinal, úlcera gástrica o duodenal, particularmente debido a una infección por *Helicobacter pylori*, diarrea, estreñimiento, cánceres intestinales y de colon, y mucitas inducidas por radioterapia o quimioterapia. En otra realización, la solicitud describe el polipéptido como se define anteriormente para su uso como un medicamento en la prevención o tratamiento de pacientes con patologías que pueden prevenirse o tratarse mediante una acción sobre las células de Paneth, en particular en la prevención o el  
55 tratamiento de pacientes con un agotamiento y/o disfunción de las células de Paneth. Preferiblemente, un agotamiento o disfunción de las células de Paneth se debe a una disminución en esta población celular o a un defecto en la maduración o un defecto en la lisozima o en otra molécula de defensa, particularmente una alfa-defensina, de las células de Paneth.

60 **[0037]** Aún más preferiblemente, la solicitud describe el polipéptido como se define anteriormente para su uso como un medicamento en la prevención o el tratamiento de una patología seleccionada de una patología relacionada con un defecto de expresión y/o secreción de una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth, una infección causada por bacterias, virus, levaduras o protozoos, enterocolitis necrotizante del lactante, diarrea, enfermedad de Crohn y otras inflamaciones intestinales y del colon y el tratamiento de pacientes que tienen  
65 alteración de la microbiota intestinal, como se observa, por ejemplo, durante la obesidad o enfermedades metabólicas.

**[0038]** Las infecciones bacterianas se seleccionan preferiblemente de infecciones debidas a *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* o *Listeria*.

5 **[0039]** Los tratamientos según la invención pueden administrarse después de la aparición de estos trastornos o de manera preventiva. El tratamiento según la invención se puede administrar a animales, en particular a mamíferos, y en particular a seres humanos.

10 **[0040]** La presente solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define anteriormente como una sustancia activa, en asociación con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida tales como, por ejemplo, polímeros biodegradables para formar composiciones terapéuticas.

15 **[0041]** El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a moléculas y composiciones que no inducen una reacción adversa, alérgica o no deseada cuando se administran a un mamífero, en particular, a un ser humano. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un semisólido, un líquido, un diluyente, un material encapsulado o cualquier otra formulación accesoria.

20 **[0042]** La forma de la composición farmacéutica, el modo de administración, la dosis y la posología dependen, por supuesto, entre otras cosas, de la enfermedad a tratar, su gravedad, la edad, el peso y el sexo del paciente.

**[0043]** La composición farmacéutica según la invención se formula preferiblemente de modo que pueda administrarse por vía oral o enteral.

25 **[0044]** La composición farmacéutica según la invención puede ser una composición alimenticia. Por lo tanto, la presente solicitud también describe el uso de un polipéptido como se define anteriormente, para la preparación de una composición alimenticia, preferiblemente una composición alimenticia láctea. Este tipo de composición alimenticia se puede describir particularmente como un alimento o nutracéutico.

30 **[0045]** Las composiciones alimenticias lácteas según la invención pueden ser, sin limitación, yogures, quesos o bebidas lácteas. En una realización preferida, los quesos están excluidos de la presente invención.

35 **[0046]** La presente solicitud también describe una composición alimenticia láctea o no láctea, preferiblemente láctea, que comprende un polipéptido como se define anteriormente, preferiblemente a concentraciones de entre 0,001 y 100  $\mu\text{M}$ , por ejemplo, en una realización particular, la concentración puede ser al menos 7  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente superior a 10  $\mu\text{M}$  y preferiblemente inferior a 15  $\mu\text{M}$ , aún preferiblemente inferior a 20  $\mu\text{M}$ . En una realización preferida, el polipéptido está a una concentración comprendida entre 0,001 y 10  $\mu\text{M}$ , 0,001 y 1  $\mu\text{M}$ , 0,005 y 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,005 y 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,01 y 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,01 y 1  $\mu\text{M}$ , además, preferiblemente, el polipéptido está a una concentración igual a aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$ .

40 **[0047]** Los polipéptidos según la invención pueden obtenerse por muchos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

45 **[0048]** Por lo tanto, los polipéptidos pueden sintetizarse de antemano, por ejemplo, por medios químicos o por producción por una bacteria recombinante capaz de sintetizar tal polipéptido. Preferiblemente, tales bacterias son capaces de sintetizar y secretar los péptidos de interés. Los péptidos obtenidos se extraen entonces del sobrenadante del cultivo bacteriano.

50 **[0049]** Como alternativa, o de manera complementaria, la presencia del polipéptido, como se define anteriormente en las composiciones alimenticias, puede deberse a la degradación de la  $\beta$ -caseína bovina por la acción de las bacterias fermentadoras.

55 **[0050]** Por lo tanto, la presente solicitud también describe un procedimiento de preparación de un producto lácteo fermentado, por ejemplo, por fermentación con al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y/o al menos una cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, que comprende una etapa para determinar la concentración de un polipéptido tal como se define anteriormente. Preferiblemente, el procedimiento es de tal forma que se deja actuar la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y/o la cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* hasta que se alcance un valor predeterminado de la concentración del polipéptido.

60 **[0051]** Los métodos de fermentación de productos lácteos, tales como yogures y quesos, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los fermentos lácteos que se pueden usar comúnmente se basan en particular en la combinación de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y/o una cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*.

65 **Descripción de las figuras**

**[0052]**

- FIG. 1:** Perfiles obtenidos en RP-HPLC para la agrupación peptídica total derivada de yogur comercial (denominada agrupación peptídica C) y las diferentes fracciones obtenidas a partir de esta agrupación peptídica (denominadas C2 a C5). La fracción C1 se encontraba en una cantidad demasiado pequeña para ser analizada.
- FIG. 2:** Perfiles obtenidos en RP-HPLC para la agrupación peptídica total derivada de yogur preparado en laboratorio (denominada agrupación peptídica F) y las diferentes fracciones obtenidas a partir de esta agrupación peptídica (denominadas F2 a F5). La fracción F1 se encontraba en una cantidad demasiado pequeña para ser analizada.
- FIG. 3:** Efecto de la agrupación peptídica total de yogur comercial que se ensaya en las concentraciones Y/5, Y/2 e Y (horizontalmente) sobre la secreción de mucina por la línea HT29-MTX después de 4 h de estimulación, que se expresa como un porcentaje de la secreción de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de agrupación peptídica: CT (verticalmente). El símbolo de estrella (\*) corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles. Y corresponde a la MAT de los péptidos en el yogur inicial.
- FIG. 4:** Efecto de la agrupación peptídica total de yogur comercial que se ensaya en las concentraciones Y, Y/2 y Y/5 (horizontalmente), sobre la expresión de los genes *muc2*, *muc4* y *muc5AC* por la línea HT29-MTX después de 4 h de estimulación, que se expresa en porcentaje de la expresión de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de agrupación peptídica: CT (verticalmente).
- FIG. 5:** Efecto de diferentes fracciones C2 a C5, a la concentración Y, derivadas de yogur comercial (horizontalmente) sobre la secreción de mucinas por la línea HT29-MTX después de 4 h de estimulación, que se expresa en porcentaje de la secreción de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de fracción: CT (verticalmente). El símbolo de estrella (\*) corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles.
- FIG. 6:** Efecto de diferentes concentraciones (Y/5, Y/2, Y) de la fracción C2 derivada de yogur comercial (horizontalmente) sobre la secreción de mucinas por la línea HT29-MTX, después de 4 h de estimulación, que se expresa en porcentaje de la secreción de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de fracción: CT (verticalmente). El símbolo de estrella (\*) corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles.
- FIG. 7:** Efecto de diferentes concentraciones (Y/5, Y/2, Y) de la fracción C2 derivada de yogur comercial (horizontalmente) sobre la expresión del gen *muc4* por la línea HT29-MTX después de 4 h de estimulación, que se expresa en porcentaje de la expresión de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de fracción: CT (verticalmente).
- FIG. 8:** Efecto de diferentes concentraciones (Y/5, Y/2, Y) de la fracción C2 derivada de yogur comercial (horizontalmente) sobre la expresión del gen *muc2* por la línea HT29-MTX después de 4 h de estimulación, que se expresa en porcentaje de la expresión de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de fracción: CT (verticalmente).
- FIG. 9:** Efecto sobre la secreción de mucinas por la línea HT29-MTX después de una pre-incubación de 10 minutos en presencia o no de ciprodima, seguido de 4 h de estimulación con la fracción C2 (a la concentración Y) en presencia o no de ciprodima que se expresa en porcentaje de la secreción de mucinas por la línea HT29-MTX en ausencia de ciprodima y de la fracción C2. \* corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles.
- FIG. 10:** Efecto de diferentes concentraciones ( $10^{-6}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-4}M$ ) del péptido [94-123] (horizontalmente) sobre la secreción de mucinas por la línea HT29-MTX, después de 4 h de incubación, que se expresa en porcentaje de la secreción de mucinas después de 4 h de incubación en ausencia de péptido: CT (verticalmente). El símbolo de estrella (\*) corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles.
- FIG. 11:** Efecto de diferentes concentraciones ( $10^{-8}M$  a  $10^{-4}M$ ) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN(94-123)) (horizontalmente) sobre la expresión del gen *muc2* por la línea HT29-MTX después de 4 h de incubación, que se expresa en porcentaje de la expresión del gen *muc2* de CT (4 h de incubación sin péptido). Datos obtenidos por qRT-PCR. El símbolo de estrella (\*) corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles.
- FIG. 12:** Efecto de diferentes concentraciones ( $10^{-8}M$  a  $10^{-4}M$ ) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN(94-123)) (horizontalmente) sobre la expresión del gen *muc4* por la línea HT29-MTX después de 4 h de incubación, que se expresa en porcentaje de la expresión del gen *muc4* de CT (4 h de incubación sin péptido). Datos obtenidos por qRT-PCR. El símbolo de estrella (\*) corresponde a una probabilidad  $p < 0,05$  con respecto a los controles.
- FIG. 13:** Efecto de la administración por sonda gástrica (D10-D18) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN(94-123)) a la concentración de  $10^{-4}M$  sobre el número de células de moco por eje criptovelloso en el duodeno, el yeyuno y el íleon de rata. \*  $p < 0,05$  frente a vehículo. Los datos se analizaron por un Anova de un factor seguido de la prueba de

Bonferroni.

**FIG. 14:** Efecto de la administración por sonda gástrica (D10-D18) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN(94-123)) sobre las células de Paneth del duodeno de rata. \*  $p < 0,05$  frente a vehículo. Los datos se analizaron por un Anova de un factor seguido de la prueba de Bonferroni.

**FIG. 15:** Efecto de la administración por sonda gástrica (D10-D18) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN(94-123)) a la concentración de  $10^{-4}$ M sobre las células de Paneth del duodeno, yeyuno e íleon de rata. \*  $p < 0,05$  frente a vehículo. Los datos se analizaron por un Anova de un factor seguido de la prueba de Bonferroni.

10

**FIG. 16:** Efecto de la administración por sonda gástrica (D10-D18) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN(94-123)) a la concentración de  $10^{-4}$ M sobre la expresión de lisozima en el duodeno, yeyuno e íleon de rata (qRT-PCR). \*  $p < 0,05$  frente a vehículo. Los datos se analizaron por un Anova de un factor seguido de la prueba de Bonferroni.

## 15 **EJEMPLOS**

**EJEMPLO 1: La proteólisis de las caseínas por las bacterias lácticas de yogur conduce a la formación de precursores de péptidos bioactivos con actividad opiácea.**

## 20 **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Cultivo de fermentos lácticos**

**[0053]** Los fermentos lácticos utilizados industrialmente para la producción de yogur todavía se basan en la asociación en cultivo mixto de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* con una cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, derivadas de colecciones disponibles para los fabricantes. Las cepas de fermentos lácticos (Syndifrais) mantenidas a  $-18$  °C se revivieron y se transplantaron varias veces. La cepa de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* se cultivó a  $43$  °C de forma anaerobia en medio MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) líquido a pH 5,4, mientras que la cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* se cultivó a  $43$  °C de forma anaerobia en medio M17 líquido. La pureza de las cepas se controló mediante aislamiento (método de cuadrantes, Estándar FIL 146: 1991). El seguimiento de la población bacteriana se realizó a través de recuentos (Estándar FIL 117B: 1997) en agar MRS a pH 5,4 para *L. bulgaricus* y en agar M17 lactosa para *S. thermophilus*. El día anterior a la preparación del yogur, se sembraron diluciones (en agua de peptona) de cada una de las cepas en 10 ml de leche esterilizada en autoclave. Después de la incubación durante una noche a  $43$  °C, la dilución que no causó la coagulación de la leche se selección como precultivo.

### **Fermentación de la leche mediante cultivo mixto**

**[0054]** Yogur preparado en laboratorio: Se incubaron 100 ml de leche desnatada UHT comercial con el 2 % (p/p) de leche desnatada en polvo Ultra Low Heat (INRA Rennes) durante 45 min a  $37$  °C con agitación, y después se sometieron a un tratamiento térmico de 10 min a  $90$  °C. Después de una caída de la temperatura a  $43$  °C, la leche se sembró con 2 g de precultivo de cada uno de los fermentos. El medio se incubó entonces a  $43$  °C hasta alcanzar un pH de 4,9 - 4,5 después de 2 a 5 horas. La acidificación del medio se controló con un medidor de pH (posición múltiple, CINAC) y se realizó un recuento de bacterias en t0 (inoculación) y en tf. El yogur obtenido se almacenó a  $4$  °C y la evolución de la proteólisis se controló por la dosificación de la MAT (materia nitrogenada total) y por RP-HPLC analítica (cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa) hasta 3 semanas de almacenamiento (muestreros a las 24 h, día 10 y día 20).

**[0055]** Yogur comercial: El yogur comercial utilizado fue un yogur natural cuyos valores nutricionales promedio por 100 g de producto fueron los siguientes (indicaciones del fabricante): 4,1 % de proteínas, 5,5 % de glúcidos, 1 % de lípidos. En condiciones estándar, este tipo de yogur se deriva de la fermentación de las bacterias lácticas de una leche complementada con proteínas y tratadas térmicamente, cuyo contenido en materia grasa se ha ajustado.

### **Obtención de una agrupación peptídica total de yogur**

55

**[0056]** El yogur se homogeneizó manualmente y después se centrifugó durante 30 min a 5000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se filtró entonces en papel Whatman N.º 41. En esta etapa, se obtuvo una precipitación selectiva de las proteínas de sobrenadante mediante la adición de TCA (ácido tricloroacético) al 2 % final, para eliminar las proteínas de lactosuero (principalmente  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina). Después de 30 minutos, una centrifugación de 10 minutos a 5000 g permitió obtener el sobrenadante correspondiente en una agrupación peptídica total de yogur. Una etapa final de diálisis extensa contra agua desionizada (tubos SpectraPor, membrana de éster de celulosa, umbral de corte 500 Da) permitió eliminar la lactosa, el TCA y disminuir la fuerza iónica de las muestras a efectos del cultivo celular.

### **65 Obtención de las fracciones peptídicas de yogur**

**[0057]** Las fracciones peptídicas de yogur se obtuvieron por RP-HPLC preparativa. Antes de la inyección, las agrupaciones peptídicas totales se filtraron a través de 1,2 µm y la columna se equilibró durante 30 min con el tampón A. La columna utilizada era una columna preparativa (250 x 50 mm) que contenía un soporte injertado con C18 (C18, LiChrospher RP18, 12 µm, Merck). El tampón A consistió en TFA (ácido trifluoroacético) al 1,06 ‰ en agua milliQ y el tampón B de TFA al 1 ‰ en acetonitrilo al 80 %. Después de 18 min en elución isocrática bajo el tampón A, la elución se realizó a 45 ml/min en 4 mesetas de elución sucesivas de 8 min al 15 %, 30 %, 45 % y después al 60 % de tampón B. Una meseta final de 20 min al 100 % de tampón B terminó el gradiente. La detección se realizó a 214 nm, con una recolección manual de fracciones. Después de 2 inyecciones de 60 ml de muestra, las fracciones correspondientes se agruparon y después se evaporaron al vacío (Rotavapor, Buchi) para eliminar el acetonitrilo y la mayor parte del agua. Las muestras se concentraron de este modo para obtener aproximadamente 10 ml de producto, se ajustaron a pH 7 con amoníaco (25 %) y después se liofilizaron.

#### Caracterización de péptidos de yogur

15 - Dosificación de la materia nitrogenada total (MAT) por micro-Kjeldhal

**[0058]** La dosificación de MAT se realizó mediante el método de Kjeldhal (Ogg (1960) J. Assoc. Off. Anal. Chem. 43:689-694) aplicado al análisis de pequeños volúmenes de 500 µl. Se realizó un rango estándar de sulfato de amonio para cada análisis. Los resultados se expresaron en mg de nitrógeno/ml. Las muestras se analizan por duplicado. La tasa óptima de recuperación de nitrógeno fue entre el 97 y el 99 %, caracterizada por una muy buena reproducibilidad.

25 - Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC analítica)

**[0059]** La cromatografía se realizó en una cadena Waters (Waters alliance). La absorbancia se controló a 214 y 280 nm. Las columnas utilizadas fueron Symmetry C18 (150 x 2,1 mm) para el análisis de péptidos y Vydac C4 (150 x 4,6 mm) para el análisis de proteínas. Para el análisis en Vydac C4, las muestras se trataron previamente con DTT (Ditiotreitol, Sigma). La elución se realizó a 40 °C después de la inyección de 100 µl de la muestra. El tampón A consistió en TFA al 1,06 ‰ en agua milliQ y el tampón B de TFA al 1 ‰ en acetonitrilo al 80 %.

30 - Nano-cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (Nano-LC-MS/MS)

**[0060]** Para el análisis de espectrometría de masas (QSTAR XLR, Applied Biosystems), las muestras preparadas previamente para la RP-HPLC se diluyeron 20 veces en TFA al 1 ‰ y después se inyectaron 5 µl a 200 nL/min para el análisis. La columna utilizada (diámetro interno 75 µm, longitud 15 cm) se llenó con una fase inversa C18. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se determinaron gracias a bases de datos accesibles a través de Internet (Mascot).

## 40 RESULTADOS

### Proteólisis en el yogur

45 - Evolución del pH

**[0061]** La asociación de dos fermentos *Streptococcus salivarius* spp. *Thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* causa una rápida acidificación del medio que alcanzó pH de aproximadamente 4,9 y 4,5 después de 3 y 4 horas de incubación respectivamente.

50 - Evolución de la MAT

**[0062]** Para la preparación de yogur se utilizó leche descremada UHT complementada con leche desnatada en polvo Ultra Low Heat al 2 % (INRA Rennes). Los yogures obtenidos se almacenaron a 4 °C y la evolución de la proteólisis se controló durante 3 semanas gracias a las dosis a las 24 h, 10 días y 20 días de almacenamiento. Se observó un aumento promedio del 0,5 % en los valores de MAT durante las 3 semanas de almacenamiento. Sin embargo, el análisis de las muestras por HPLC analítica realizado en paralelo muestra que no se producen cambios en términos cualitativos.

### Identificación de la agrupación peptídica del yogur

60 - Preparación y caracterización por RP-HPLC

**[0063]** La combinación de técnicas de precipitación selectiva con TCA al 2 %, diálisis en una membrana de 500 Da y cromatografía hizo posible aislar y purificar la agrupación peptídica a partir del medio complejo que es el yogur. Esta agrupación peptídica dio como resultado la proteólisis realizada en el yogur por los fermentos lácticos. Se

caracterizó por RP-HPLC, con una elución según una escala de hidrofobicidad creciente obtenida gracias a un gradiente lineal de acetonitrilo.

5 **[0064]** *Yogur comercial:* El perfil de elución de la agrupación peptídica derivado del yogur comercial se determinó mediante RP-HPLC (indicado por Agrupación peptídica C en la **FIG. 1**). La primera mitad del cromatograma, así como las masas encontradas entre 40 y 53 minutos de elución son de naturaleza peptídica. El pico eluido a los 62 minutos es el residuo de  $\beta$ -lactoglobulina presente inicialmente en el medio antes de la etapa de precipitación con TCA al 2 %.

10 **[0065]** *Yogur preparado en el laboratorio:* El perfil de elución de la agrupación peptídica derivado del yogur preparado en el laboratorio se determinó mediante RP-HPLC (indicado por Agrupación peptídica F en la **FIG. 2**). La intensidad de los picos obtenidos reflejó un menor contenido de péptidos en este yogur en comparación con el yogur comercial. Este resultado es consistente con la menor proteólisis medida por la MAT en el yogur preparado en el laboratorio. El yogur preparado en el laboratorio también tenía una textura más viscosa que el yogur comercial. Esta  
15 característica puede deberse al hecho de que la cepa de *Lb. bulgaricus* empleada ha resultado ser productora de exopolisacáridos.

**Identificación de péptidos por nano-LC-MS/MS**

20 **[0066]** *Yogur comercial:* Se podrían identificar un centenar de péptidos en el yogur comercial. La mayoría, aproximadamente sesenta, provienen de la caseína  $\beta$ , aproximadamente 20 péptidos se derivan de la caseína  $\kappa$ , 15 péptidos provienen de la caseína  $\alpha_{s1}$ , y 5 péptidos se derivan de la caseína  $\alpha_{s2}$ .

**[0067]** Se han identificado varios péptidos potencialmente portadores de actividad opiácea seleccionados de  
25 un cierto número de péptidos de la  $\beta$ -caseína: 8 péptidos contienen la secuencia Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile de la  $\beta$ -casomorfina-7 (fragmento [60-66] de la  $\beta$ -caseína) considerados como pro- $\beta$ -casomorfina debido a la presencia del motivo Tyr- X(n)-Phe; 6 péptidos contienen la secuencia Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr correspondiente al fragmento [114-120] de la  $\beta$ -caseína. Esta secuencia opióide [114-120] derivada de la  $\beta$ -caseína se identificó en 1999 (Jinsmaa *et al.* (*op. cit.*)). También debe señalarse que entre los péptidos identificados derivados de la  $\beta$ -caseína, varios otros  
30 son precursores de péptidos bioactivos, particularmente, secuencias que contienen la secuencia Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y, por lo tanto, potencialmente actividad antihipertensiva.

**Tabla 1: Péptidos identificados por nano-LC-MS/MS en la agrupación peptídica de yogur comercial.**

Región de la $\beta$ caseína	Péptidos identificados
Pro- $\beta$ -casomorfina (60-66)	54-65 57-68 57-72 57-77 57-91 57-93 59-72
Opióide (114-120)	94-123 100-123 102-123 106-119 106-123 108-123

35 **[0068]** *Yogur preparado en el laboratorio:* Al igual que el yogur comercial, la mayoría de los péptidos que se encuentran en el yogur preparado en el laboratorio se derivan de la  $\beta$ -caseína o 55 péptidos, mientras que treinta se derivan de la caseína  $\alpha_{s1}$ , una docena de caseína  $\alpha_{s2}$ , y 2 de la  $\kappa$ -caseína. También se identifican varios precursores de péptidos opiáceos en el yogur preparado en el laboratorio (**tabla 2**), incluidos 7 péptidos considerados pro- $\beta$ -casomorfina que incluyen la región 60-66 de la  $\beta$ -caseína y 15 péptidos que contienen el fragmento potencialmente  
40 opióide [114-120] de la  $\beta$ -caseína. Muchas secuencias prohipertensivas también se encuentran en el yogur de laboratorio.

**Tabla 2: Péptidos identificados por nano-LC-MS/MS en la agrupación peptídica de yogur preparado en laboratorio.**

Región de la $\beta$ caseína	Péptidos identificados
Pro- $\beta$ -casomorfina (60-66)	53-72 57-68 57-72 57-77 57-87 57-91 59-91
Opioide (114-120)	92-123 94-123 94-119 97-123 98-119 100-123 100-119 101-123 101-119 102-123 102-119 103-123 103-119 106-123 108-123

**[0069]** Para estos dos tipos de yogur, hay un corte específico después de la glutamina en la posición 123 en la secuencia de la  $\beta$ -caseína. Este corte está relacionado con la proteasa de la pared de tipo PIII que hidroliza la  $\beta$ -caseína específicamente después de la glutamina en la posición 123 y que se encuentra, particularmente, en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Visser et al. (1991) Appl Microbiol Biotechnol. 35(4):477-83. Los sistemas proteolíticos de *Lactococcus* (modelo *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) y *Lactobacillus* (modelo *Lb. delbrueckii*) están muy cerca y, por lo tanto, explican la hidrólisis del enlace 123-124. En el yogur, se puede suponer que *Lb. bulgaricus*, con una actividad de proteasa superior a la de *S. thermophilus*, es responsable de la especificidad de corte.

#### Aislamiento de fracciones peptídicas

- Preparación y caracterización por RP-HPLC preparativa

**[0070]** Las fracciones peptídicas de yogur se obtuvieron por RP-HPLC preparativa a partir de las agrupaciones peptídicas totales como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

**[0071]** *Fracciones derivadas de yogur comercial:* Se obtuvieron 5 fracciones de la agrupación peptídica (FIG. 1). Estas fracciones se llaman C1 a C5. La fracción C1, eluida durante la primera meseta al 15 % del tampón B, no pudo analizarse biológicamente porque se recogió en una cantidad demasiado pequeña.

**[0072]** Las fracciones C2, C3, C4 y C5 se eluyeron al 30, 45, 60 y el 100 % de tampón B, respectivamente.

**[0073]** *Fracciones derivadas de yogur preparado en laboratorio:* Se obtuvieron 5 fracciones de la agrupación peptídica (FIG. 2). De la misma manera que para C1 en el yogur comercial, la fracción F1 eluida durante la meseta al 15 % del tampón B no se pudo ensayar porque se recuperó en una cantidad demasiado pequeña.

**[0074]** Las fracciones F2, F3, F4 y F5 se eluyen respectivamente durante las mesetas al 30, 45, 60 y el 100 % del tampón B.

- Identificación de péptidos por nano-LC-MS/MS

**[0075]** *Fracciones derivadas de yogur comercial:* Los péptidos de interés identificados en las fracciones de C2, C3 y C4 se muestran en la tabla 3. Tres péptidos que contienen la secuencia [114-120] de la  $\beta$ -caseína se identifican en la fracción C2, incluyendo el péptido [94-123]. La fracción C3 contiene 5 precursores de la secuencia [114-120] de la  $\beta$ -caseína así como 3 pro- $\beta$ -casomorfina, de las secuencias [57-68], [57-72] y [59-72]. La fracción C4, cuando contiene 3 pro- $\beta$ -casomorfina y la fracción C5 contiene 5 péptidos derivados de la  $\beta$ -caseína, para los cuales no se ha identificado ninguna secuencia de interés.

40

**Tabla 3: Péptidos identificados por nano-LC-MS/MS en las diferentes fracciones derivadas de yogur comercial.**

Péptidos identificados	Fracción		
	C2	C3	C4
54-65			
57-68		+	
57-72		+	
57-77			+
57-91			+
57-93			+
59-72		+	
61-72			
94-123	+		
100-123		+	
102-123	+	+	
106-119		+	
106-123	+	+	
108-123		+	

**[0076]** *Fracciones derivadas de yogur preparado en laboratorio:* Las fracciones F3 y F4 contienen péptidos de interés. No se identifica ningún péptido derivado de la  $\beta$ -caseína en la fracción F2, mientras que la fracción F5 no contiene péptidos de interés. La fracción F3 contiene 2 pro- $\beta$ -casomorfina de las secuencias [57-68], [57-72] y 6 precursores de la secuencia opioide [114-120], todos con la glutamina123 en la posición C<sub>terminal</sub>. La fracción F4 contiene 5 pro- $\beta$ -casomorfina y 6 derivados de la secuencia opioide [114-120], todos con fenilalanina119 en la posición C<sub>terminal</sub>.

10

**Tabla 4: Péptidos identificados por nano-LC-MS/MS en las diferentes fracciones derivadas de yogur preparado en laboratorio.**

Péptidos identificados	Fracción	
	F3	F4
53-72		
57-68	+	
57-72	+	+
57-77		+
57-87		+
57-91		+
59-91		+
92-123		
94-119		+
94-123	+	
97-123		
98-119		+
100-119		+
100-123	+	
101-119		+
101-123		
102-119		+
102-123	+	
103-119		+
103-123	+	
106-123	+	
108-123	+	

## **EJEMPLO 2: Los péptidos presentes en leches fermentadas modulan in vitro la secreción y la expresión de mucinas gastrointestinales**

### **5 MATERIAL Y MÉTODO**

#### **Cultivo celular**

**[0077]** Las células HT29-MTX y HT29-C116E se cultivaron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> con medio esencial mínimo DMEM complementado con el 10 % de FCS (suero de ternera fetal) y el 1 % de antibióticos (penicilina 10.000 UI/ml y estreptomicina 10 µg/ml). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda (5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de O<sub>2</sub>). En la confluencia, las células sometidas previamente a la acción de la tripsina (tripsina-EDTA) se cultivaron en placas de 12 pocillos a la razón de 1 ml de medio de cultivo completo por pocillo. Para mantener las células en condiciones de crecimiento óptimas, el medio de cultivo se cambió cada 2 días.

#### **Protocolos experimentales**

**[0078]** Los experimentos se realizaron en las placas de 12 pocillos 21 días después de la confluencia de las células. El día antes de la estimulación, las placas se cultivaron sin FCS. La agrupación peptídica total de los yogures, así como las diferentes fracciones liofilizadas, se recogieron primero en agua estéril en una solución concentrada 10 veces (10[Y]), [Y] correspondiente a la concentración de los péptidos en el yogur inicial). La osmolaridad y el pH de las muestras (ajustado a la neutralidad con NaOH) se controlaron en esta etapa. Después, se realizaron diluciones sucesivas ([Y], [Y]/2 y [Y]/5) en medio de cultivo desprovisto de FBS. El día del experimento, se aspiró el medio y después las células se lavaron con PBS a 37 °C. Del medio sin FBS que contenía o no (control), las fracciones peptídicas de yogur a la concentración deseada se depositaron a una razón de 1 ml por pocillo (triplicado). Después, las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se congelaron a -20 °C para la dosificación de las mucinas mediante ELLA (ensayo de lectina ligado a enzimas). Las células se lisaron finalmente mediante la adición de Tri-Reagent y su contenido de ácido nucleico se retiró para la extracción del ARN total. Cada estimulación se realizó 4 veces.

#### **Estimación del nivel de ARNm mediante RT-PCR semicuantitativa**

**[0079]** Los ARN se extrajeron utilizando Tri-Reagent y después se retrotranscribieron con la ayuda del kit "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit", usando cebadores de nucleótidos aleatorios (hexámero aleatorio). La amplificación se realizó utilizando Taq polimerasa (Invitrogen) y los cebadores específicos se buscaron en Internet con la ayuda de sitios especializados o derivados de la bibliografía. La ciclofilina A se utilizó como un gen constitutivo. Después de un número determinado de ciclos, elegidos para permanecer en la fase exponencial de la amplificación, la reacción se detuvo a +4°. Las muestras se analizaron entonces mediante electroforesis en gel de agarosa impregnada de bromuro de etidio para detectar el ADNc. Las manchas se visualizaron bajo luz ultravioleta y se pixelaron con la ayuda de un transiluminador (Quantum Appligene). El análisis de la imagen se realizó con la ayuda del software de imagen Scion.

#### **Medición del nivel de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa en el aparato LightCycler (Roche)**

**[0080]** Los ARN se aislaron y se volvieron a transcribir como se describe anteriormente, y los ADNc se cuantificaron en capilares con la ayuda del kit "FastStart DNA Master SYBR Green I" en un aparato "lightCycler" (Roche). La ciclofilina A se usó como un gen constitutivo y los cálculos se realizaron mediante el método "DDCt".

### **RESULTADOS**

#### **Efectos de las agrupaciones peptídicas totales en la secreción de mucinas**

**[0081]** La actividad biológica de las dos agrupaciones peptídicas se buscó en la línea mucosecretora intestinal humana HT29-MTX. Para este propósito, las células se expusieron a diferentes concentraciones de agrupación peptídica durante 4 h, siendo C el yogur comercial y F el yogur de laboratorio. La concentración Y corresponde a la MAT de los péptidos en el yogur inicial. La osmolaridad se ajustó a 330 mmol/ml/l y el pH a 7. En el transcurso de estos experimentos, se demostró que la secreción de mucinas aumentaba de manera dependiente de la dosis por las agrupaciones peptídicas totales derivadas de dos yogures. Este efecto fue máximo a la concentración Y (**FIG. 3**).

#### **Efectos de las agrupaciones peptídicas totales sobre la expresión de mucinas**

**[0082]** El estudio se centró en las dos mucinas gastrointestinales principales secretadas producidas por las células HT29-MTX, las mucinas MUC2 y MUC5AC, así como en la membrana mucina MUC4. En el tracto intestinal, esta mucina también se describe como capaz de producirse en forma secretada (Rong et al. (2005) J Cell Physiol 202(1):275-84). Por lo tanto, podría participar en las propiedades del gel de moco. La estimulación de la línea HT29-

MTX durante 4 h por la agrupación peptídica C (concentración Y, Y/2 e Y/5) produjo un aumento en el nivel de transcripciones que codifican MUC2 y MUC4 en comparación con las células no tratadas, mientras que las transcripciones de MUC5AC no se modificaron significativamente (**FIG. 4**; análisis por RT-PCR semicuantitativa). La agrupación peptídica F aumentó la expresión de MUC5AC y MUC4, con una respuesta máxima observada a la concentración Y. En estos experimentos, las agrupaciones peptídicas totales C y F no modificaron la expresión de la ciclofilina (gen constitutivo).

#### **Efectos de diferentes fracciones C de yogur comercial sobre la secreción y la expresión de mucinas *in vitro* (HT29-MTX)**

10 - Efectos de las fracciones C sobre la secreción de mucinas

**[0083]** Después de este resultado, las fracciones C2, C3, C4 y C5 (a la concentración Y), obtenidas por cromatografía preparativa (RP-HPLC), se ensayaron para determinar la secreción y expresión de mucinas gastrointestinales. El ensayo de los sobrenadantes de cultivo por ELLA hizo posible mostrar que solo la fracción C2 indujo un aumento significativo en la secreción de mucinas en comparación con las células no tratadas (203 +/- 11 % de los controles,  $p < 0,05$ ) (**FIG. 5**). Esta fracción tiene un efecto dependiente de la dosis en la secreción de mucinas (**FIG. 6**) y en el nivel de transcripciones que codifican MUC2 y MUC4 (**FIG. 7** y la **FIG. 8**; análisis por RT-PCR semicuantitativa) en comparación con las células no tratadas. Por otro lado, la expresión de MUC5AC no se modificó. Entre los péptidos identificados en las diferentes fracciones, solo el [94-123] está presente en la fracción activa (C2) mientras está ausente en las otras fracciones, por lo que es un buen candidato para ser responsable de la actividad biológica (véase la tabla 3).

#### **Efectos de diferentes fracciones F de yogur de laboratorio sobre la secreción y la expresión de mucinas *in vitro* (HT29-MTX)**

25 - Efectos de las fracciones F sobre la secreción de mucinas

**[0084]** Las fracciones F3, F4 y F5 (a la concentración Y), obtenidas por cromatografía preparativa (RP-HPLC), se ensayaron para determinar la secreción y expresión de mucinas gastrointestinales. No se identificó ningún péptido derivado de la  $\beta$ -caseína en la fracción F2, este último no se ensayó. La fracción F3 indujo un aumento significativo en la secreción de mucinas en comparación con las células no tratadas (160 +/- 8 % de los controles,  $p < 0,05$ ). Por el contrario, las fracciones F4 y F5 no mostraron ningún efecto sobre la secreción de mucinas.

**[0085]** La fracción F3 contiene 2 pro- $\beta$ -casomorfina (péptidos [57-68] y [57-72]) y 6 precursores de la secuencia opioide [114-120]. En cuanto al yogur comercial, el péptido de secuencia [94-123] se ha identificado en la fracción activa, lo que refuerza la hipótesis de un efecto biológico inducido por este péptido [94-123].

35 - Efecto de la dosis de la fracción F3 sobre la secreción de mucinas

**[0086]** Se realizó un estudio de respuesta a la dosis para la fracción F3. Los resultados obtenidos mostraron que esta fracción tiene un efecto dependiente de la dosis sobre la secreción de mucinas.

40 - Efectos de la fracción F3 sobre la expresión de mucinas

**[0087]** En contraste con los resultados obtenidos con la fracción C2, la estimulación de las células HT29-MTX por la fracción F3 durante 4 horas no modificó el nivel de las transcripciones que codifican MUC2 en relación con las células no tratadas. Por otro lado, se observó un aumento significativo en el nivel de transcripciones que codifican MUC5AC y MUC4 después de la incubación de las células en presencia de esta fracción.

**[0088]** En conclusión, el efecto de cada agrupación peptídica (C y F) se reprodujo por solo una de sus fracciones (respectivamente C2 y F3). Ambas fracciones activas contienen precursores de péptidos opioides, así como el péptido (94-123). La fracción C2 aumentó la expresión de las mucinas gastrointestinales MUC2 y MUC4, mientras que la fracción F3 aumentó la de MUC5AC y MUC4.

#### **Implementación de la vía $\mu$ -opioide por las fracciones C2 y F3**

**[0089]** Se han puesto de manifiesto receptores  $\mu$ -opioide en la superficie de las células HT29-MTX (Zoghbi *et al.* (*op. cit.*)). El presente estudio muestra que la preincubación de las células HT29-MTX en presencia de ciprodimina ( $10^{-5}$  M), un antagonista específico del receptor  $\mu$ -opioide (Marki *et al.* (1999) *Eur J Pharmacol* 383(2):209-14), inhibe la secreción de mucinas inducida por las fracciones C2 (**FIG. 9**) o F3 (concentración Y). El efecto de la fracción C2 en la expresión de mucinas MUC2 y MUC4 también se eliminó por el uso de este antagonista. Por RT-PCR cuantitativa en el aparato Lightcycler, también se ha demostrado que la ciprodimina elimina el aumento en el nivel de transcripciones que codifican MUC5AC inducido por la fracción F3. Se observó un resultado idéntico con la mucina MUC4.

**[0090]** Estos resultados sugieren que las fracciones C2 y F3 ejercen su efecto sobre la secreción y sobre la expresión de mucinas a través de la activación de los receptores  $\mu$ -opioides.

5 **[0091]** Las dos fracciones de interés C2 y F3 también se ensayaron a la concentración de Y en otra línea mucosecretora, la línea HT29-C116E. Los resultados obtenidos en la expresión de MUC2, MUC5AC y MUC4 fueron similares a los observados en las células HT29-MTX con un aumento en la expresión de mucinas MUC2 y MUC4 bajo estimulación por la fracción C2 (4 h, concentración Y) y un aumento en la expresión de mucinas MUC5AC y MUC4 bajo estimulación con la fracción F3 (4 h, concentración Y). El ensayo de sobrenadantes de cultivo por ELLA también  
10 mostró que las fracciones C2 y F3 aumentan significativamente la cantidad de mucinas liberadas en el medio de cultivo después de 4 horas de estimulación (172  $\pm$  3 % y 157  $\pm$  8 % para las fracciones CE y F3, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

#### **Efecto del péptido [94-123], un precursor de neocasomorfina identificado en ambas fracciones C2 y F3**

15 **[0092]** La  $\beta$ -casomorfina-7, péptido  $\mu$ -opioidérgico exógeno de referencia, ejerce un efecto biológico sobre las células HT29-MTX en una dosis de  $10^{-4}$  M, en particular al aumentar la secreción de mucinas y la expresión de MUC5AC. El péptido [94-123] (Millegen, Labège, Francia) ensayado a esta misma concentración, por otro lado, inhibió la secreción de mucinas (**FIG. 10**), así como la expresión de MUC4 (**FIG. 12**) medida por RT-PCR cuantitativa en un aparato Lightcycler. Se debe tener en cuenta que este péptido induce un aumento significativo en los transcritos que  
20 codifican MUC2 cuando se analiza a la concentración de  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M (**FIG. 11**). Otros resultados han demostrado que a la concentración de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M, este péptido también causa un aumento brusco en la expresión de la mucina MUC4. En todos estos experimentos, el péptido [94-123] ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$ M) no tuvo efecto en la expresión de MUC5AC.

**[0093]** También se ha demostrado que el péptido [94-123] no actúa por la vía  $\mu$ -opioidérgica.

25

#### **EJEMPLO 3: El péptido [94-123] modula la expresión *in vivo* de mucinas gastrointestinales y lisozima y modifica el número de células de moco y células de Paneth.**

**[0094]** El péptido [94-123] se administró solo por sonda a ratas jóvenes para evaluar su impacto en la expresión  
30 de la mucina secretada (MUC2) y de la membrana de mucina (MUC4) en el duodeno, el yeyuno, el íleon y el colon. El efecto del tratamiento en las células de moco (producción de MUC2) y las células de Paneth (células con un papel fundamental en la defensa antimicrobiana) también se evaluó mediante inmunohistoquímica y qRT-PCR.

### **MATERIAL Y MÉTODO**

35

#### **Experimentos con animales**

**[0095]** El péptido [94-123] se administró una vez al día mediante canulación gástrica a ratas jóvenes (Wistar, Harlan, Francia) del día 10 al 18 postnatal. Las concentraciones de péptidos administradas fueron  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  o  $10^{-4}$  M bajo un volumen de 900  $\mu$ l/100 g de peso. Los animales de control recibieron el vehículo en solitario (agua). Cada grupo experimental consistió en 9 ratones.

#### **Análisis histológico**

45 **[0096]** Después del sacrificio de los animales, se retiraron muestras de duodeno, yeyuno, íleon, colon proximal y colon distal y se fijaron en alcohol al 80 % para el análisis histológico. Las biopsias (longitud: 1 cm) también se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción de ARNm.

#### **Técnicas inmunohistoquímicas**

50

**[0097]** Las secciones (5  $\mu$ m) de intestino incorporadas en parafina se desparafinaron sucesivamente, se rehidrataron y se incubaron en presencia de peróxido de hidrógeno (3 % en PBS, 20 min). El tratamiento del portaobjetos con microondas permitió el desmascaramiento de los sitios antigénicos. Después de la saturación de sitios no específicos mediante incubación en suero de caballo diluido al 10 % en PBS, las secciones se incubaron  
55 durante una hora en presencia del anticuerpo primario (MUC2, H-300, Santacruz, 1/250 o lisozima, Zymed Laboratories, 1/100) diluido en PBS que contenía el 1 % de suero de caballo. Para inmunohistoquímica de la lisozima, no se realizó la etapa de desmascaramiento en el microondas. Después de los aclarados, las secciones se incubaron en presencia de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (ImmPress, Vector Laboratories, Abcys) seguido de reactivo revelador (AEC, Vector Laboratories, Abcys). Las secciones se contramancharon (hematoxilina,  
60 Vector Laboratories) y se montaron en medio acuoso.

#### **Medición del nivel de ARNm por RT-PCR cuantitativa en el aparato Mastercycler ep Realplex (Eppendorf)**

**[0098]** El ARN se aisló y se retrotranscribió como se describe en el ejemplo 2. La amplificación se realizó en la  
65 placa de 96 pocillos usando un kit para PCR cuantitativa (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Fermentas) y los

cebadores específicos buscados en Internet con la ayuda de sitios especializados o derivados de la bibliografía. La ciclofilina A se usó como un gen constitutivo y los cálculos se realizaron mediante el método "DDCt".

## RESULTADOS

5

### Efecto del péptido [94-123] en las células de moco.

**[0099]** En el ejemplo 2, se demostró *in vitro* en la línea intestinal mucosecretora humana HT29-MTX que la secuencia [94-123] aumenta en gran medida la expresión de MUC2 y/o MUC4 cuando se ensaya a concentraciones de entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M. Tal efecto se encuentra en el intestino delgado de rata. De hecho, el seguimiento de las transcripciones de qRT-PCR permitió mostrar que el péptido (administrado por sonda a concentraciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-4}$  M) induce la expresión de MUC2 en el yeyuno de rata (tabla 5).

**[0100]** En la inmunohistoquímica, este efecto da como resultado un aumento de las células caliciformes en el duodeno ( $10^{-7}$ M), el yeyuno ( $10^{-7}$  y  $10^{-4}$  M) y el íleon ( $10^{-7}$  y  $10^{-4}$  M), lo que sugiere un posible efecto sobre la diferenciación de esta línea celular (tabla 5 y la FIG. 13).

**[0101]** Cabe señalar que la expresión de la mucina MUC4 también se aumenta por el péptido a lo largo del tracto gastrointestinal (tabla 5), pero sólo cuando este último se ensaya a concentraciones de  $10^{-8}$  y  $10^{-4}$  M.

20

Tabla 5: Efecto de la administración por sonda gástrica (D10-D18) del péptido [94-123] ( $\beta$ -CN (94-123)) en el número de células de moco por eje criptovelloso y en la expresión de mucinas MUC2 y MUC4 en el duodeno, el yeyuno y el ileon de rata. Los resultados de la qRT-PCR se expresan en % de CT. \*  $p < 0,05$  frente a vehículo. Los datos se analizaron por un ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni

	MUC2		Inmunohistoquímica		MUC2		qRT-PCR		MUC4		qRT-PCR	
	Duodeno	Yeyuno	Yeyuno	Ileon	Duodeno	Ileon	Yeyuno	Ileon	Duodeno	Ileon	Yeyuno	Ileon
CT	6,75 (0,11)	7,75 (0,14)	8,03 (0,14)		100 (1,3)		100 (1,2)		100 (1,7)		100 (2,8)	
$\beta$ -CN (94-123) 10-8M	6,57 (0,23)	7,96 (0,18)	7,61 (0,18)		83 (0,8)		102 (1,8)	100 (17)	144 (1,3)*		160 (1,4)*	100 (2,1) 157 (2,2)*
$\beta$ -CN (94-123) 10-7M	8,86 (0,17)*	9,22 (0,24)*	9,79 (0,09)*		84 (1,3)		152 (1,1)*	104 (1,1)	112 (1,5)		94 (1,2)	84 (0,7)
$\beta$ -CN (94-123) 10-4M	6,61 (0,16)	10,21 (0,21)*	10,54 (0,17)*		90 (1,0)		139 (1,8)*	84 (1)	106 (1,4)		161 (2,1)*	113 (1,7)

**Efecto del péptido [94-123] en las células de Paneth**

**[0102]** Las células de Paneth desempeñan un papel importante en la defensa intestinal. Estas células se encuentran solo en las glándulas inferiores de Lieberkühn del intestino delgado. Expresan la mucina MUC4 y se caracterizan por la presencia, en su polo apical, de microgránulos secretores que contienen particularmente lisozima y  $\alpha$ -defensinas (péptidos naturales para antibióticos).

**[0103]** La actividad biológica del péptido [94-123] se investigó en células de Paneth utilizando técnicas inmunohistoquímicas dirigidas a la lisozima. En ratas, las células de Paneth aparecen en el intestino delgado entre el D10 y D13 postnatal. El D18 postnatal, se observaron las células de Paneth en aproximadamente el 20 % de las criptas del duodeno. Estos resultados muestran que el péptido [94-123], administrado por sonda a la concentración de  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M y  $10^{-4}$  M, aumenta considerablemente el porcentaje de criptas que contienen células de Paneth ( $p < 0,05$ ) en el duodeno (**FIG. 14**).

**[0104]** Los datos obtenidos por qRT-PCR también permitieron mostrar que el péptido [94-123] aumenta el nivel de transcripciones que codifican la lisozima (tabla 6).

**[0105]** Estos efectos en las células de Paneth y la expresión de la lisozima obtenida después de la administración del péptido también se observan en el yeyuno y el íleon (tabla 6, **FIG. 15** y **FIG. 16**). En estas dos partes del tracto, la primera respuesta significativa se observa cuando el péptido se administra a una concentración de  $10^{-8}$  M.

**[0106]** El péptido [94-123], o una forma resultante de su digestión, por lo tanto, resistirá la acción de las enzimas del tracto intestinal y alcanzará el íleon en forma activa. Tales péptidos podrían desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de la función de barrera y la defensa intestinal, especialmente en el periodo postnatal. Cabe señalar, sin embargo, que también es posible un efecto indirecto.

Tabla 6: Efecto de la administración por sonda gástrica (D10-D18) del péptido [94-123] en el porcentaje de criptas que muestran células de Paneth y en la expresión de lisozima en el duodeno, el yeyuno y el íleon de rata. Los resultados de la qRT-PCR se expresan en % de CT. \*  $p < 0,05$  frente a vehículo. Los datos se analizaron por un ANOVA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni.

	Inmunohistoquímica			qRT-PCR		
	Lisozima Duodeno	Lisozima Yeyuno	Lisozima Íleon	Lisozima Duodeno	Lisozima Yeyuno	Lisozima Íleon
<b>CT</b>	21,39 (0,6)	45,65 (0,49)	43,09 (1,26)	100 (0,9)	100 (1)	100 (1,4)
<b>[94-123] 10-8M</b>	28,51 (0,94)	59,29 (0,76)*	59,38 (0,58)*	82 (1,2)	118 (2)	113 (2)
<b>[94-123] 10-7M</b>	34,53 (0,77)*	51,92 (0,44)	49,8 (1,08)	139 (1,8)*	110 (2)	101 (1)
<b>[94-123] 10-4M</b>	37,26 (0,63)*	66,9 (0,45)*	61,19 (1,23)*	128 (1,9)*	140 (1,5)*	128 (1,5)

**[0107]** El estudio *in vivo* reveló un efecto significativo del péptido [94-123] en dos poblaciones celulares cruciales para la inmunidad innata y la defensa intestinal: las células de moco y las células de Paneth. El impacto del péptido [94-123] en el número de células de Paneth podría hacer que la mucosa intestinal sea particularmente menos vulnerable a las infecciones bacterianas. Cabe señalar que el péptido es activo a baja concentración ( $10^{-8}$  M en el yeyuno y el íleon,  $10^{-7}$  M en el duodeno), cuya concentración puede estar presente en las leches fermentadas. Este estudio también es el primero, a nuestro entender, en mostrar una interacción positiva entre un nutriente y las células de Paneth. La biología y los factores que contribuyen a la maduración de las células de Paneth o a su actividad secretora son todavía poco conocidos, en particular debido a la ausencia de un modelo de estudio celular. Por lo tanto, el efecto del péptido [94-123] en las células de Paneth representa un progreso real en términos de valorización en un contexto de alimentación preventiva y desarrollo de productos innovadores.

LISTA DE SECUENCIAS

45

**[0108]**

<110> INRA

50 <120> Compuestos que aumentan la secreción y/o la expresión de al menos una mucina gastrointestinal y/o que

inducen el aumento de la población de células de moco o células de Paneth

<130> BEX10P0366

5 <150> FR0953165

<151> 13-05-2009

<160> 2

10

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

15 <211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> péptido

25 <400> 1

Gly Val Ser Lys Val Lys Glu Ala Met Ala Pro Lys Gln Lys Glu Met  
1 5 10 15

Pro Phe Pro Lys Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu Ser Gln  
20 25 30

<210> 2

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> péptido

40 <400> 2

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido aislado constituido por:

- 5 - SEQ ID NO: 1, o
- una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o
- una secuencia de al menos 20 aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

- 10 - la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y
- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y
- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

15 siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias

20 comparadas, y obteniéndose el porcentaje de identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, constituido por la SEQ ID NO: 1.

3. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, para su uso como medicamento.

25

4. Polipéptido constituido por:

- SEQ ID NO: 1, o
- una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o
- 30 - una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y
- 35 - la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y
- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

40 para su uso como medicamento en el tratamiento de un efecto de expresión y/o secreción de mucinas gastrointestinales y/o de una alteración de la barrera mucosa gastrointestinal en un paciente, siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias comparadas, y obteniéndose el porcentaje de

45 identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

5. Polipéptido para su uso según la reivindicación 4 como medicamento en la prevención o tratamiento de una patología seleccionada del grupo constituido por inflamación intestinal, particularmente crónica, infección intestinal, úlceras gástricas o duodenales, particularmente debido a una infección por *Helicobacter pylori*, diarrea,

50 estreñimiento, cánceres intestinales y de colon, y mucositis inducida por radioterapia o quimioterapia.

6. Polipéptido constituido por:

- SEQ ID NO: 1, o
- 55 - una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o
- una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

- 60 - la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y
- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y
- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

65 para su uso como medicamento en la prevención o tratamiento de un agotamiento y/o disfunción de las células de

Paneth en un paciente,

siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan  
5 alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias comparadas, y obteniéndose el porcentaje de identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

7. Polipéptido para su uso según la reivindicación 6, como un medicamento en la prevención o tratamiento  
10 de una patología seleccionada de una patología asociada con un defecto de expresión y/o secreción de una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth, una infección intestinal debida a bacterias, virus, levaduras o protozoos, una alteración de la microbiota intestinal, enterocolitis necrotizante en lactantes, diarrea, enfermedad de Crohn y otras inflamaciones intestinales y del colon.

15 8. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en la reivindicación 1 o 2 como principio activo, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Uso de un polipéptido aislado constituido por:

20 - SEQ ID NO: 1, o

- una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o

- una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

25

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y

- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

30

para la preparación de una composición alimenticia,

siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan  
35 alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias comparadas, y obteniéndose el porcentaje de identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

10. Uso según la reivindicación 9, para la preparación de una composición alimenticia láctea.

40

11. Composición alimenticia no láctea que comprende un polipéptido constituido por:

- SEQ ID NO: 1, o

- una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o

45 - una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y

50 - la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y

- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

en la que el polipéptido está a una concentración comprendida entre 0,001 y 10  $\mu$ M,

55

siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan  
alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las  
60 cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias comparadas, y obteniéndose el porcentaje de identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

12. Composición alimenticia láctea que comprende un polipéptido constituido por:

- SEQ ID NO: 1, o

65 - una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o

- una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

- 5 - la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y
- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y
- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

10 en la que el polipéptido está a una concentración de al menos 7 µM,

siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las

15 cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias comparadas, y obteniéndose el porcentaje de identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

13. Composición alimenticia según la reivindicación 11, en la que el polipéptido está a una concentración igual a 0,01 µM.

20

14. Procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado por al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y/o al menos una cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, que comprende una etapa para determinar la concentración de un polipéptido constituido por:

25 - SEQ ID NO: 1, o

- una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, o

- una secuencia de al menos cuatro aminoácidos consecutivos contenidos en la SEQ ID NO:1,

que tiene al menos un efecto seleccionado de:

30

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una mucina gastrointestinal; y

- la inducción de la expresión y/o la secreción de al menos una molécula de defensa intestinal expresada por las células de Paneth; y

- la inducción del aumento de la población de células de moco y/o de la población de células de Paneth,

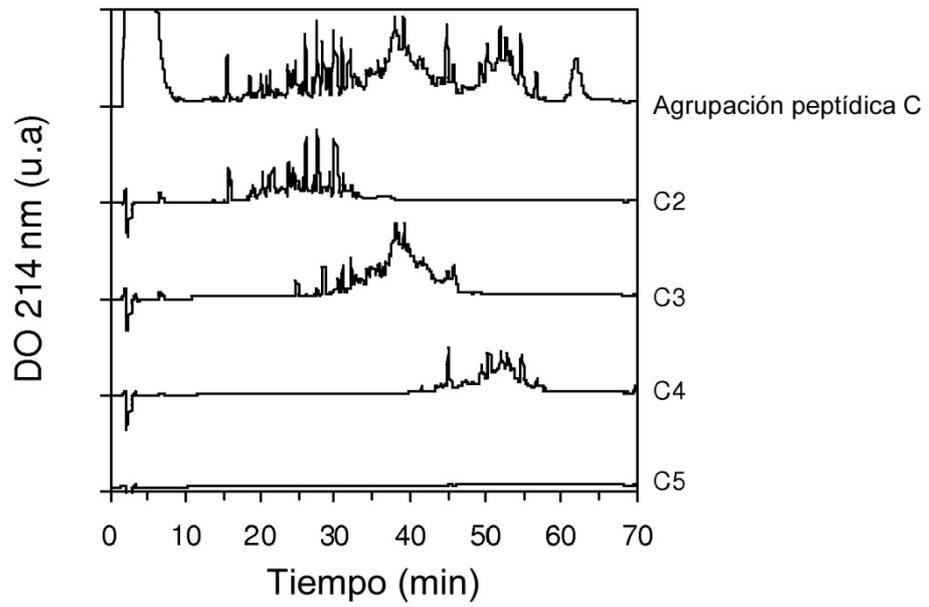
35

siendo el porcentaje de identidad el porcentaje de aminoácidos idénticos entre dos secuencias a comparar, realizándose las comparaciones entre dos secuencias polipeptídicas después de que las dos secuencias se hayan alineado de manera óptima en la totalidad de su longitud, después dividiéndose el número de posiciones para las

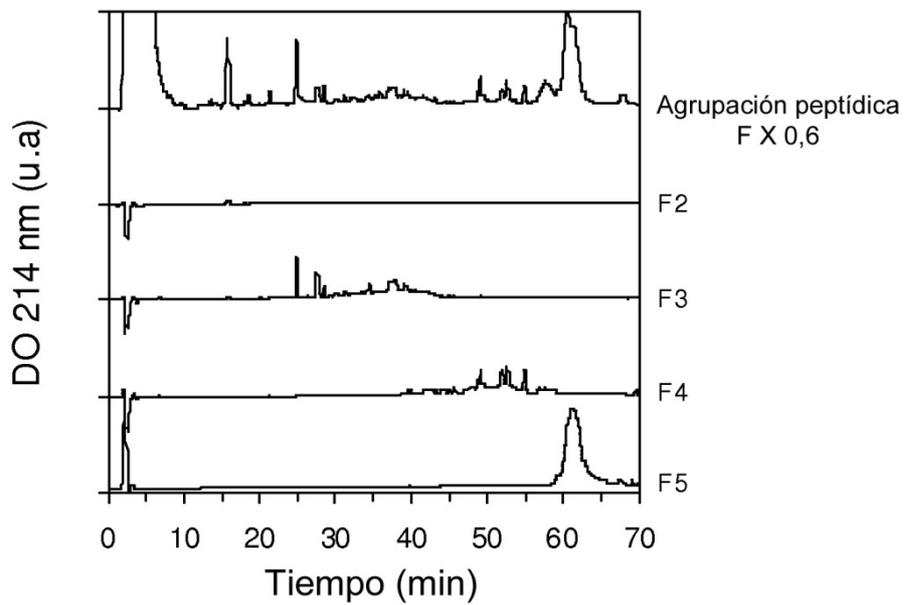
40 cuales los aminoácidos son idénticos por el número total de aminoácidos de la mayor de las dos secuencias comparadas, y obteniéndose el porcentaje de identidad multiplicando el resultado obtenido por 100.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que se deja actuar la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y/o la cepa de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* hasta que se alcance un valor predeterminado de la concentración del polipéptido.

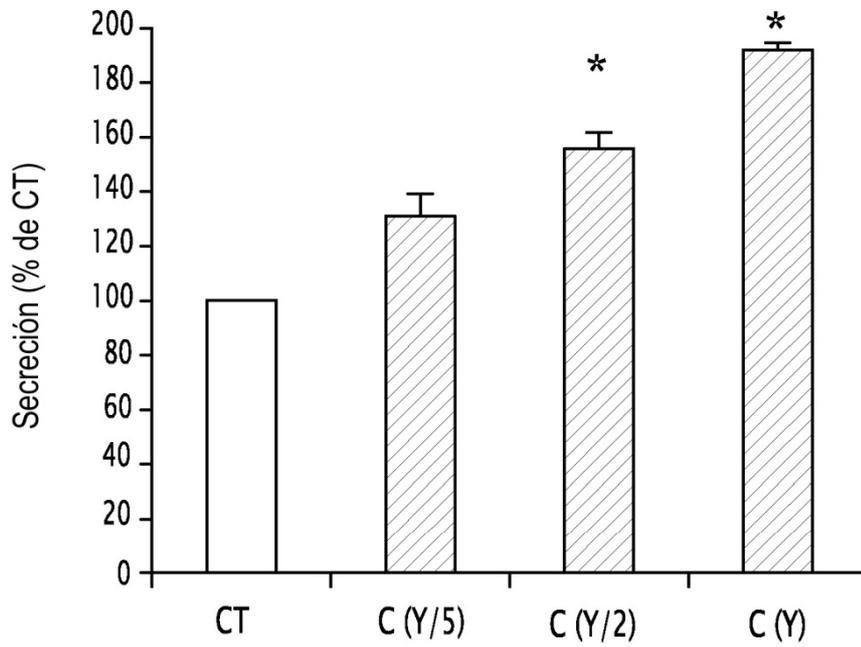
45



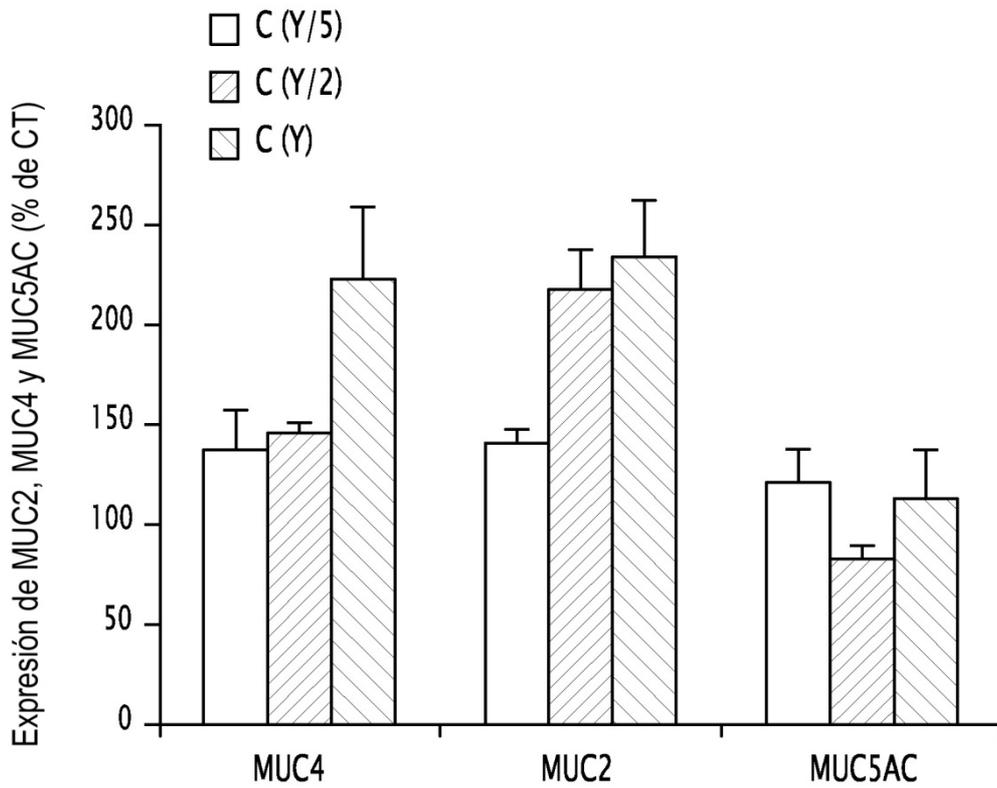
**FIG.1**



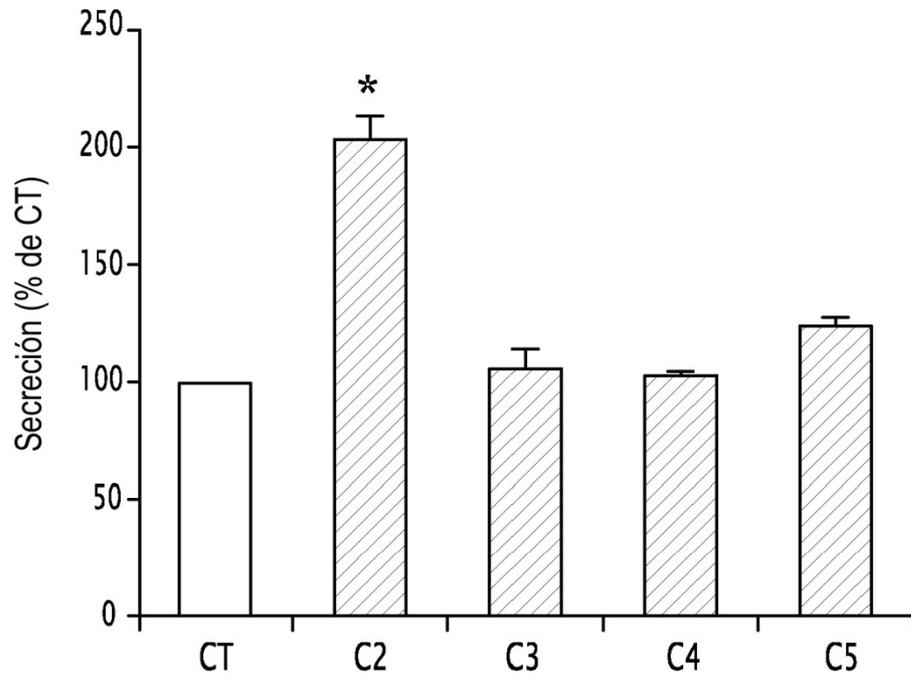
**FIG.2**



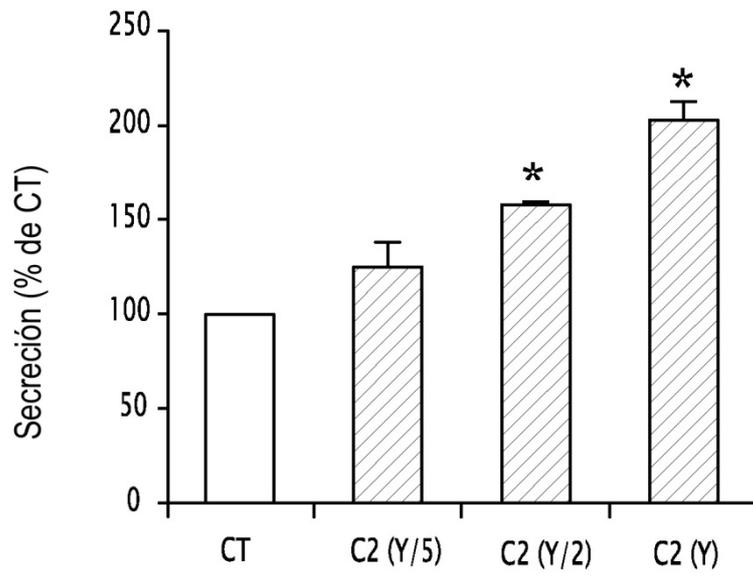
**FIG.3**



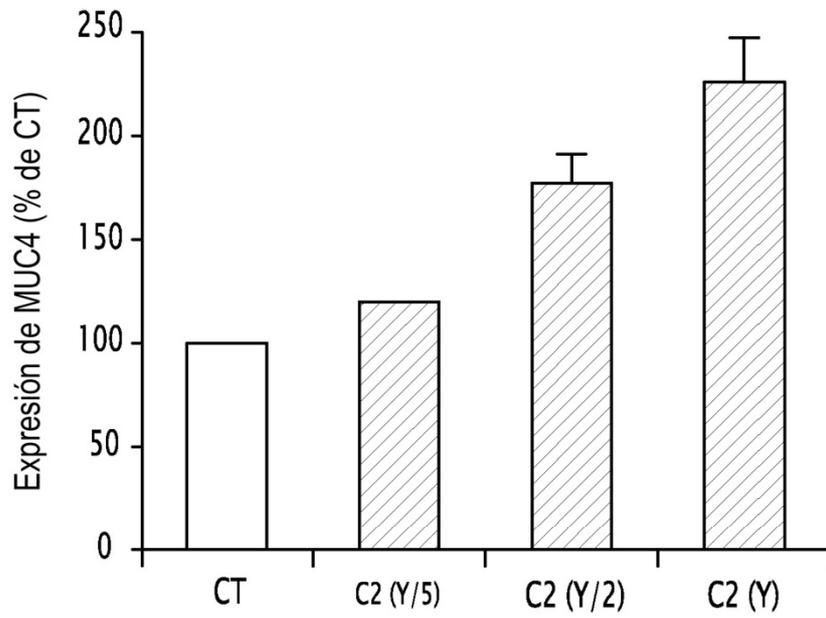
**FIG.4**



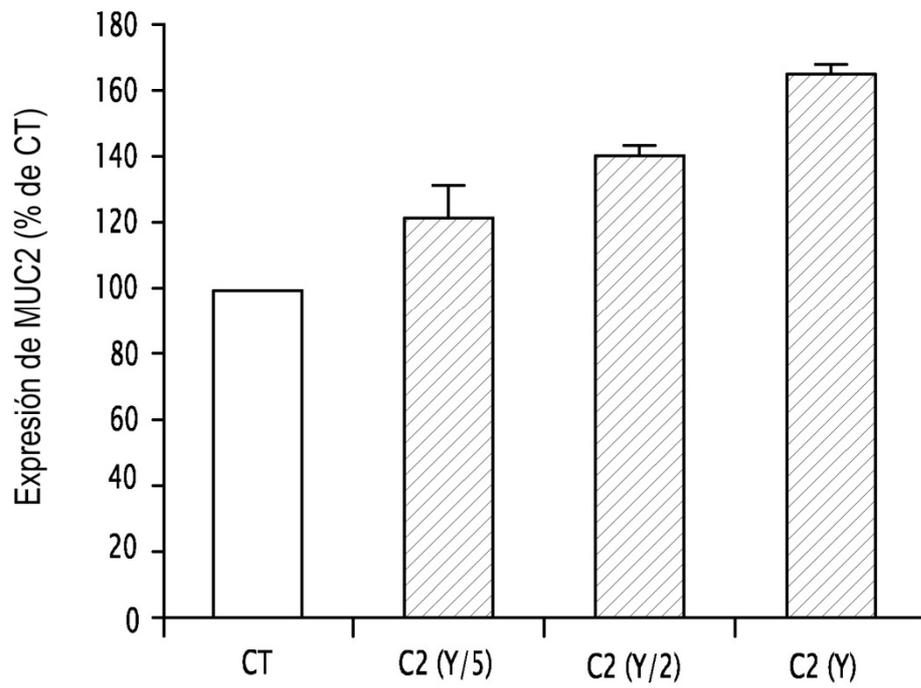
**FIG.5**



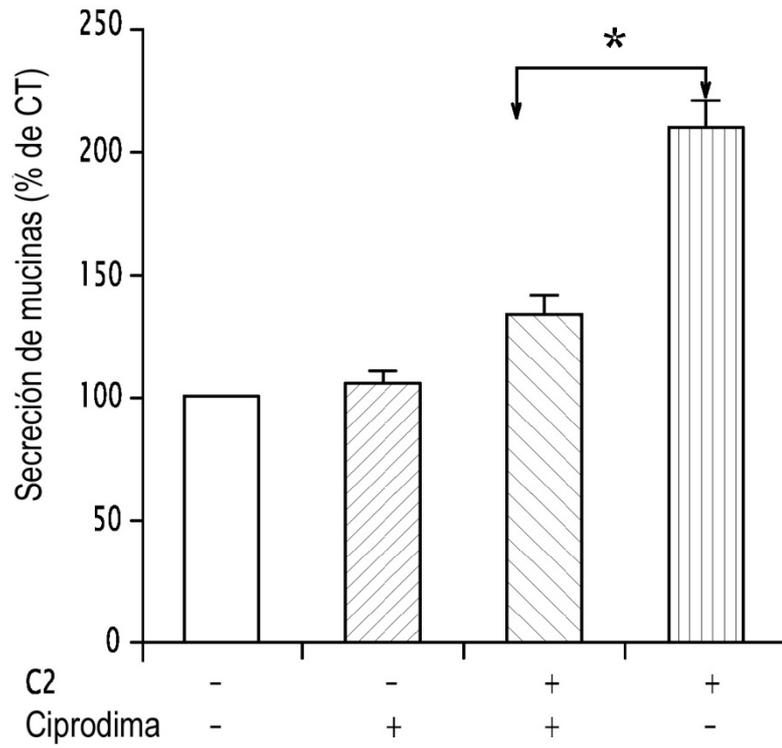
**FIG.6**



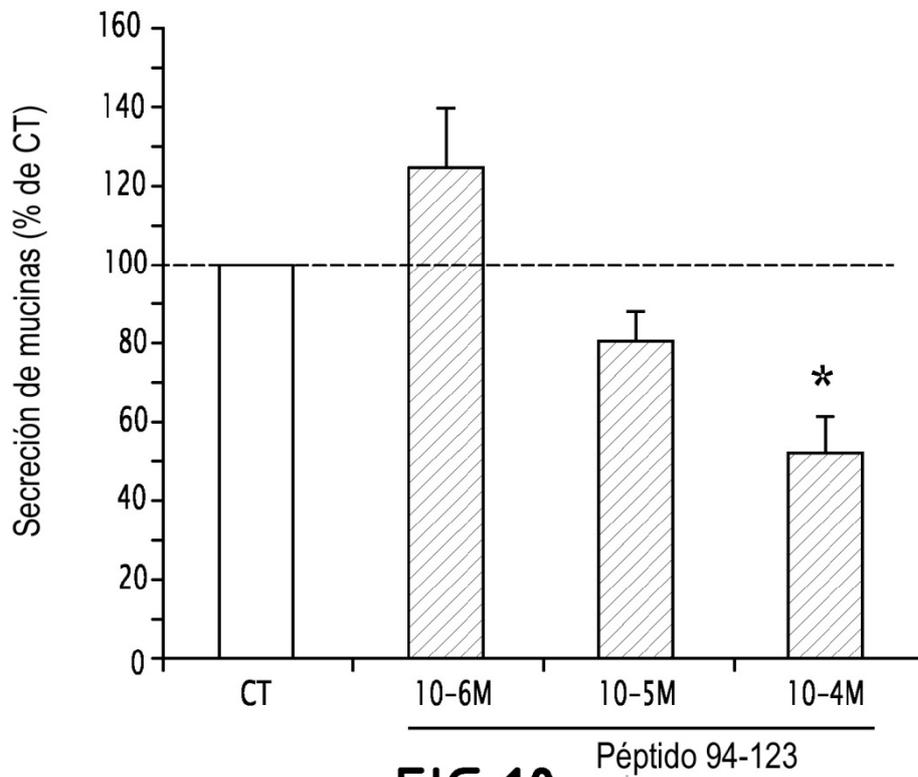
**FIG.7**



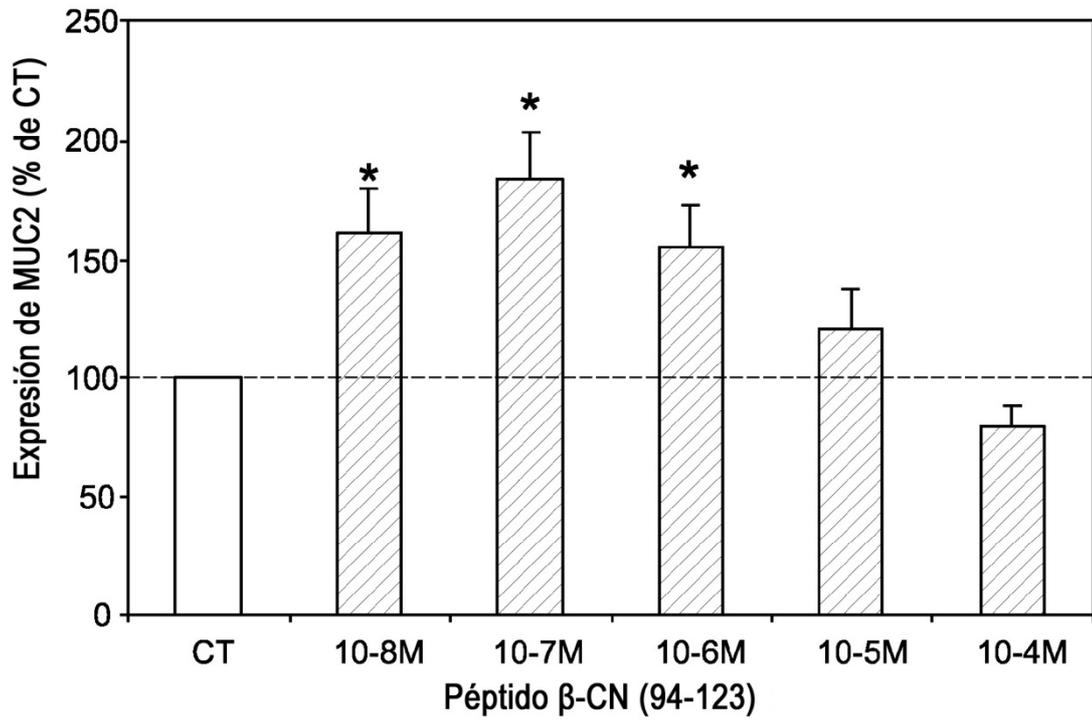
**FIG.8**



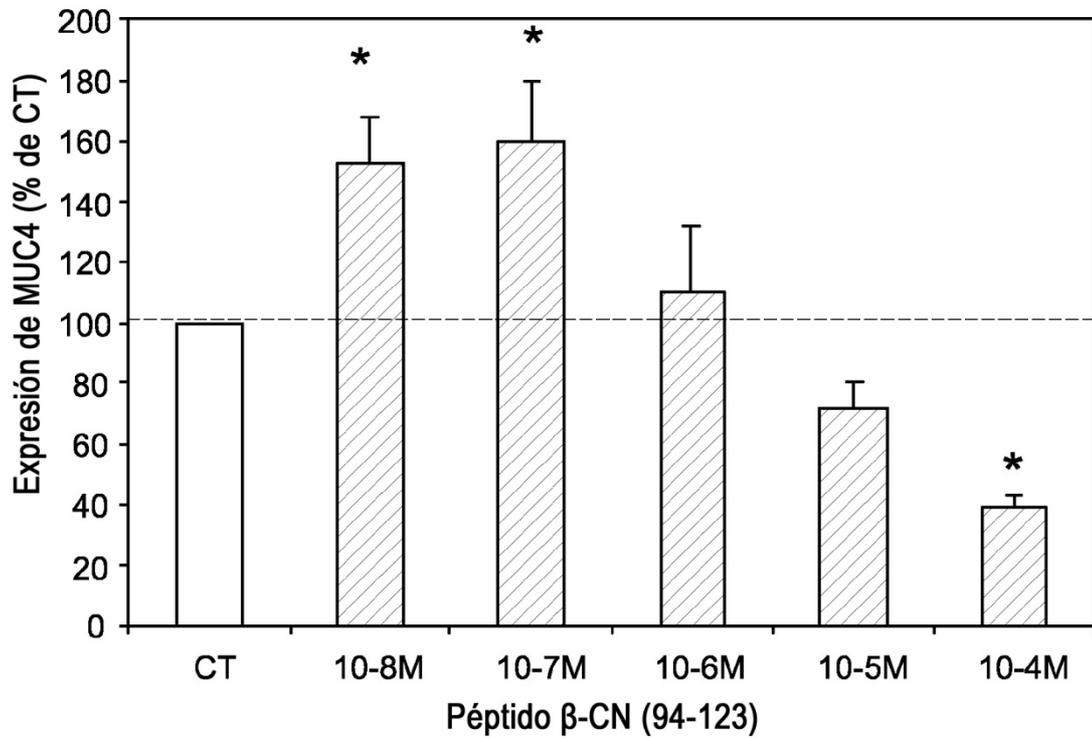
**FIG.9**



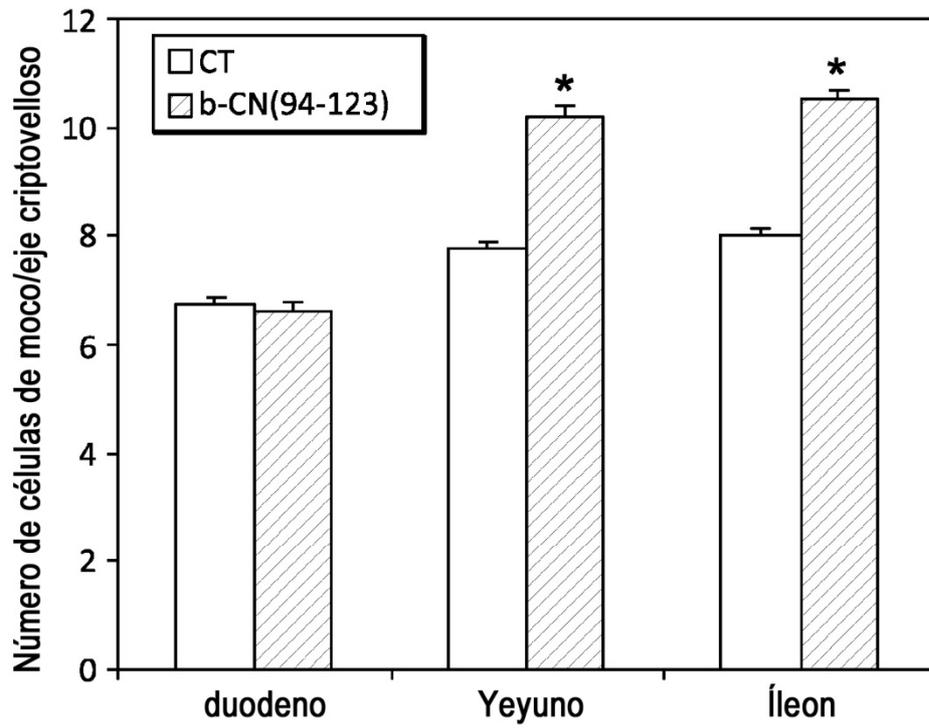
**FIG.10**



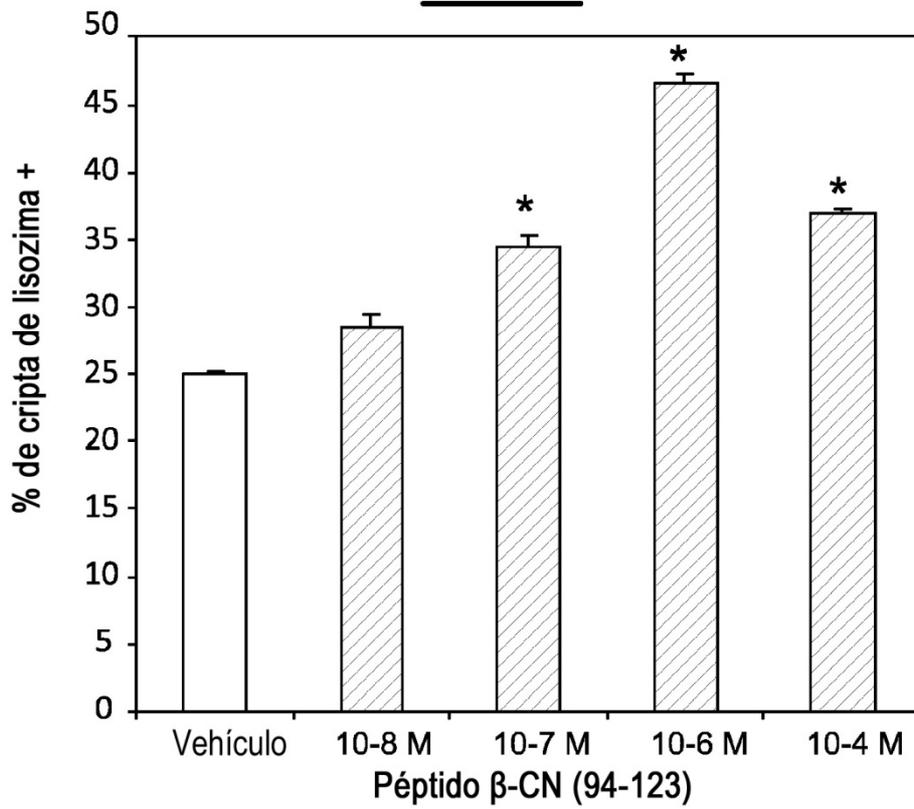
**FIG.11**



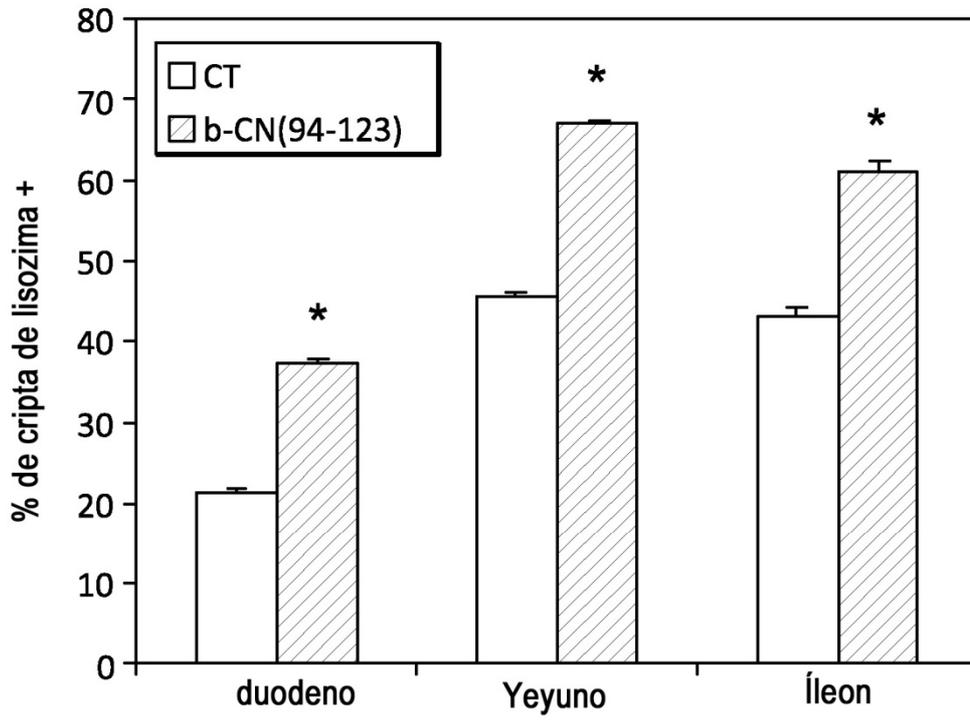
**FIG.12**



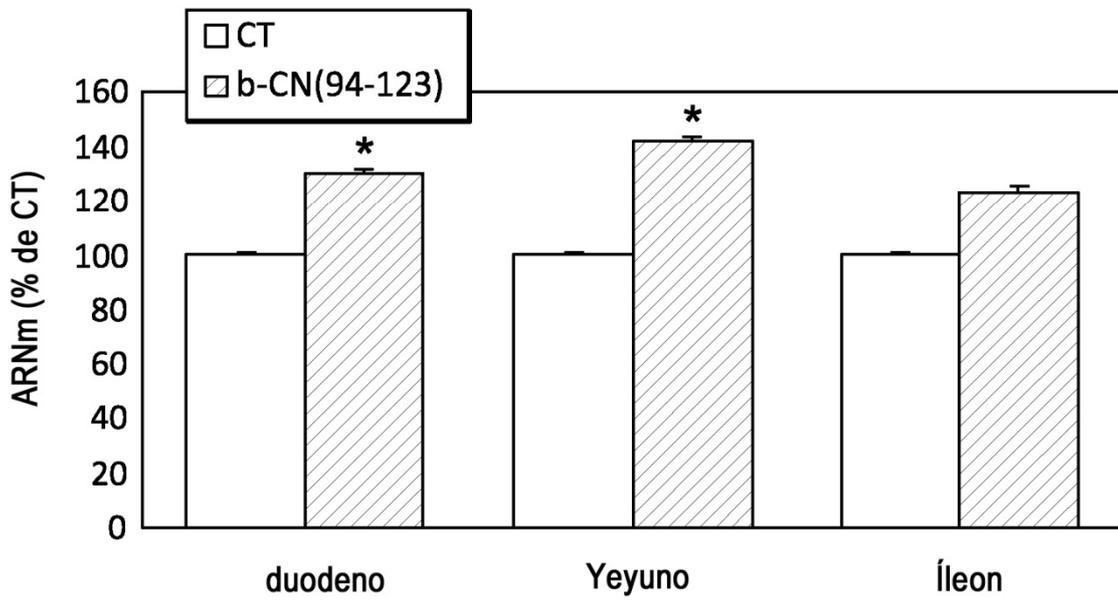
**FIG.13**



**FIG.14**



**FIG.15**



**FIG.16**