

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 306**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2014 PCT/NZ2014/000102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14193248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014 E 14804528 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3003485**

54 Título: **Composición que comprende beta-caseína A2 para su uso en la prevención de la inflamación del intestino**

30 Prioridad:

31.05.2013 US 201361829764 P

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**THE A2 MILK COMPANY LIMITED (100.0%)
Level 10, 51 Shortland Street
Auckland 1010, NZ**

72 Inventor/es:

**CLARKE, ANDREW JOHN y
TRIVEDI, MALAV SUCHIN**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 742 306 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

Composición que comprende beta-caseína A2 para su uso en la prevención de la inflamación del intestino

Campo técnico

5 La invención se refiere al uso de la proteína de la leche beta-caseína A2 para la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino. En particular, la invención se refiere a la leche y los productos alimenticios derivados de la leche y la evitación del consumo de leche y productos lácteos que contienen altos niveles de la proteína beta-caseína A1 la cual se ha demostrado que provoca la inflamación inmediata y continua del intestino. La invención se refiere a la prevención de la inflamación del intestino, que incluye la irritación del intestino general, así como también enfermedades inflamatorias del intestino y el síndrome del intestino irritable.

10 **Antecedentes de la invención**

La inflamación del intestino puede resultar de una variedad de trastornos o afecciones que se caracterizan por la inflamación del colon y el intestino delgado. Tales trastornos o afecciones incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) y el síndrome del intestino irritable (IBS). IBD se refiere por lo general a afecciones clínicamente definidas y persistentes, principalmente la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. IBD por lo general se consideran como enfermedades autoinmunes, donde el propio sistema inmune del cuerpo ataca los elementos del sistema digestivo. El IBS es un trastorno caracterizado por el dolor o malestar abdominal y la alteración del hábito intestinal (por lo general diarrea crónica o recurrente, estreñimiento, o ambos). Se dice que el IBS afecta a entre 25 y 45 millones de personas en los Estados Unidos solamente. Aproximadamente dos de cada tres pacientes con IBS son mujeres. El IBS afecta a personas de todas las edades, que incluyen niños. Se estima que aproximadamente el 10 al 25% de la población mundial sufre de IBS. El impacto del IBS puede variar desde molestias leves a un severo debilitamiento. Las personas con IBS moderada a severa luchan con síntomas que a menudo perjudican su bienestar físico, emocional, económico, educativo y social.

25 Las causas exactas de la inflamación del intestino no se comprenden bien. Sin embargo, la dieta parece ser importante, en especial en el caso del IBS. Se cree que las la leche y las grasas de leche, en particular, son un factor que contribuye. Muchas afecciones de inflamación del intestino se manejan, en lugar de curarse. A menudo, el tratamiento comprende una combinación del cuidado de la dieta, el control del estrés y la terapia con fármacos.

30 La leche, principalmente la leche bovina, que se consume en las poblaciones a lo largo de todo el mundo, es una importante fuente de proteínas en la dieta humana. La leche bovina de manera típica comprende aproximadamente 30 gramos por litro de proteína. Las caseínas constituyen el componente más grande (80%) de esa proteína. En las últimas dos décadas se ha producido un creciente cuerpo de evidencia que implica las proteínas de caseína, en especial beta-caseínas, en una serie de trastornos para la salud.

35 Las beta-caseínas se pueden categorizar como beta-caseína A1 y beta-caseína A2. Estas dos proteínas son las beta-caseínas predominantes de la leche que se consume en la mayoría de las poblaciones humanas. La beta-caseína A1 se diferencia de la beta-caseína A2 por un único aminoácido. Un aminoácido histidina se encuentra en la posición 67 de la secuencia de aminoácido 209 de la beta-caseína A1, mientras que una prolina se encuentra en la misma posición de la beta-caseína A2. Sin embargo, esta diferencia de un único aminoácido es de importancia crítica para la digestión enzimática de las beta-caseínas en el intestino. La presencia de histidina en la posición 67 permite que un fragmento de proteína que comprende siete aminoácidos, conocido como beta-casomorfin-7 (BCM-7), se produzca en la digestión enzimática. Por lo tanto, la BCM-7 es un producto de digestión de la beta-caseína A1. En el caso de la beta-caseína A2, la posición 67 está ocupada por una prolina que obstaculiza la escisión del enlace de aminoácido en esa ubicación. Por lo tanto, BCM-7 no es un producto de digestión de la beta-caseína A2.

45 Otras variantes de beta-caseína, tal como la beta-caseína B y C, también tienen histidina en la posición 67, y otras variantes, tales como A3, D y E, tienen prolina en la posición 67. Sin embargo, estas variantes sólo se encuentran en niveles muy bajos, o no se encuentran en absoluto, en la leche de las vacas de origen europeo. De este modo, en el contexto de esta invención, el término beta-caseína A1 se refiere a cualquier beta-caseína que tiene histidina en la posición 67, y el término beta-caseína A2 se refiere a cualquier beta-caseína que tiene prolina en la posición 67.

50 La BCM-7 es un péptido opioide y puede activar de manera potente los receptores de opioides en todo el cuerpo. La BCM-7 tiene la capacidad de atravesar la pared gastrointestinal y entrar en la circulación, lo que le permite influir en las actividades sistémicas y celulares a través de receptores opioides. El solicitante y otros previamente han determinado una relación entre el consumo de beta-caseína A1 en la leche y los productos lácteos y la incidencia de ciertas enfermedades que incluyen la diabetes de tipo I (la Patente WO 1996/014577), la enfermedad cardíaca coronaria (la Patente WO 1996/036239) y los trastornos neurológicos (la Patente WO 2002/019832).

55 Se ha especulado que el BCM-7 también puede afectar a la función digestiva. Se ha informado que los receptores opioides desempeñan un papel en el control de la función gastrointestinal, que incluyen la regulación de la motilidad gastrointestinal, la producción de moco y la producción de hormonas (por ej., Mihatsch, W.A, *et al.*, *Biol. Neonate*, 2005,

87(3):160 a 3). Se cree que las caseínas de la leche están asociadas con la inhibición de la motilidad intestinal, lo cual puede conducir al estreñimiento (Gunn T.R. y Stunzer D..., *NZ Med. J.*, 1986, 99(813):843 a 846) y la investigación sobre casomorfina y derivados de casomorfina sintéticos indica que la BCM-7 contribuye a este efecto mediado por el receptor opioide (Charlin V. *et al.*, *Rev. Med. Chil.*, 1992, 120(6):666 a 669). Sin embargo, si bien hay algunas pruebas *in vitro* de una relación entre las casomorfina y el tiempo de tránsito en el intestino, es evidente que el efecto no necesariamente se puede extrapolar a un efecto *in vivo* en seres humanos. Por ejemplo, al menos un estudio no logró demostrar una relación entre el consumo de beta-caseína A1 o beta-caseína A2 y el estreñimiento (Crowley, E.T., *Nutrients*, 2013, 5, 253 a 266). Se ha demostrado que la BCM-7 estimula la producción de moco a través de las vías mediadas por el receptor mu-opiáceo (Zoghbi, S., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006, 290(6):G1105 a 13), y para modular la proliferación de linfocitos de lámina propia (Elitsur, Y. y Luk, G.D., *Clin. Exp. Immunol.*, 1991, 85(3):493 a 497), que son células asociadas con el sistema inmune.

Los informes anteriores indican vínculos entre las caseínas y las casomorfina (que incluyen BCM-7) y la función gastrointestinal. Estos informes están basados en estudios que utilizan proteínas de leche o caseína por lo general o en los estudios que utilizan BCM-7 en sí. Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido ningún informe que vincule directamente el consumo de beta-caseína A1 con la inflamación del intestino. Además, ha habido informes anecdóticos de los consumidores que se refieren a mejoras en la función gastrointestinal después de beber leche rica en beta-caseína A2 (y a la inversa baja en beta-caseína A1), pero estos informes no son científicos y no son específicos como a la causa de cualquier mejora en la función. Por otra parte, también existen varios informes anecdóticos de ningún efecto de mejora en el consumo de este tipo de leche. Estos informes son contradictorios en que incluyen informes sobre el continuo efecto de la digestión, desde el estreñimiento hasta la diarrea. No se pueden hacer conclusiones con la confianza de los informes anecdóticos, en particular en el caso de productos alimenticios y la función fisiológica donde el número de variables que puede afectar potencialmente los resultados es muy grande.

El solicitante ahora ha hallado evidencia científica concluyente para un enlace directo entre el consumo de beta-caseína A1 y la inflamación del intestino en relación con el consumo de beta-caseína A2. Dada la gran cantidad de factores en la dieta humana que pueden influir en la salud del intestino, y que la leche y los productos lácteos contienen una amplia gama de componentes de proteínas y otros componentes, el hallazgo del solicitante de una asociación directa clara entre el consumo de beta-caseína A1 y las condiciones inflamatorias del intestino es sorprendente. En particular, el solicitante ha hallado evidencia, no sólo de una respuesta de inflamación del intestino aguda a la ingestión de beta-caseína A1, sino también de la inflamación continua a largo plazo del intestino como resultado de una exposición a corto plazo a la beta-caseína A1.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar una composición para su uso en un método para la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino, o al menos proporcionar una alternativa útil a las terapias preventivas o de tratamiento existentes.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición para la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino en un animal, en el que la composición contiene beta-caseína y en el que la beta-caseína comprende al menos 50% en peso beta-caseína A2.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición para la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino en un animal, en la que la composición contiene beta-caseína y en la que la beta-caseína comprende al menos 50% en peso de beta-caseína A2.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de leche en la fabricación de una composición para la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino de un animal, en el que la leche contiene beta-caseína y en el que la beta-caseína comprende al menos 50% en peso de beta-caseína A2.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición para su uso en un método para la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino en un animal que comprende el consumo por parte del animal de una composición que contiene beta-caseína, o el suministro de la composición al animal para su consumo, en el que la beta-caseína comprende al menos 50% en peso de beta-caseína A2.

La cantidad de beta-caseína A2 puede ser cualquier cantidad en el intervalo de 50% a 100% en peso de la beta-caseína, por ejemplo, al menos 90%, al menos 99%, o incluso 100%.

En ciertas formas de realización de la invención, la composición es leche o un producto lácteo. La leche puede ser leche en polvo o leche líquida. La leche líquida puede estar en la forma de leche fresca, leche líquida reconstituida a partir de un polvo, leche desnatada, leche homogeneizada, leche condensada, leche evaporada, leche pasteurizada o leche no pasteurizada, leche UHT o cualquier otra forma de leche. El producto lácteo puede ser nata, yogur, queso quark, queso, mantecquilla, helados o cualquier otro producto lácteo.

La inflamación del intestino puede ser, si bien no se limita a, una enfermedad inflamatoria del intestino o el síndrome del intestino irritable. La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser, si bien no se limita a, la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

5 En la mayoría de formas de realización de la invención, el animal es un ser humano. Sin embargo, en otras formas de realización, el animal puede ser un perro, un gato o cualquier otro animal doméstico, donde el pienso se complementa con leche.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la actividad de mieloperoxidasa en el colon de ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra la actividad de mieloperoxidasa en el yeyuno de ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

10 La Figura 3 muestra los niveles de suero amiloide A en el plasma de ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

La Figura 4 muestra los puntajes de histología para secciones del intestino tomadas de ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

La Figura 5 muestra la absorción dependiente de la concentración de morfina y BCM-7 de cisteína en las células neuronales y las células epiteliales gastrointestinales.

15 La Figura 6 muestra la absorción de cisteína en las células neuronales y las células epiteliales gastrointestinales a lo largo del tiempo.

La Figura 7 muestra el efecto de BCM-7 y morfina en la cisteína, GSH/GSSG y SAM/SAH a lo largo del tiempo.

La Figura 8 muestra los cambios de la metilación de CpG en genes implicados en la respuesta inflamatoria (NFkappaB e IL10) bajo la influencia de BCM-7.

20 La Figura 9 muestra los cambios de la metilación de CpG en genes implicados en la respuesta inflamatoria (MPO) y genes implicados en la respuesta inmune (IL1R).

Descripción detallada

25 La invención se refiere a una composición que contiene la proteína beta-caseína y a su uso para la prevención de la inflamación del intestino o al menos la reducción del riesgo del desarrollo de la inflamación del intestino. Es importante destacar que la beta-caseína es la variante A2 de beta-caseína, o constituye al menos 50% en peso del total de variantes de beta-caseína presentes en la composición. La importancia del predominio de la variante A2 en la composición es debido al hecho de que el solicitante ha demostrado que existe una relación directa entre la variante A1 y marcadores biológicos de la inflamación del intestino en seres humanos. Por lo tanto, se puede esperar una mejora en la salud del intestino si se evita el consumo de la variante A1.

30 Se pretende que el término "inflamación del intestino" como se utiliza en la presente memoria descriptiva signifique cualquier enfermedad, trastorno o afección que se caracteriza por una inflamación aguda, transitoria o crónica y continua del colon y/o el intestino delgado. Tales enfermedades, trastornos o afecciones incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) y el síndrome del intestino irritable (IBS), además de la irritación no específica del intestino. El IBD se refiere por lo general a afecciones clínicamente definidas y persistentes, principalmente la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

35 El término "leche A1" como se utiliza en la presente memoria descriptiva pretende significar leche que contiene beta-caseína donde la beta-caseína está predominantemente en la forma de beta-caseína A1 (o cualquier otra variante de beta-caseína que tiene histidina en la posición 67 de su secuencia de aminoácido 209). La leche A1 puede tener un componente de beta-caseína que es mayor que 50%, de manera típica mayor que 90% (idealmente 100%), de beta-caseína A1.

40 El término "leche A2", como se utiliza en la presente memoria descriptiva pretende significar leche que contiene beta-caseína donde la beta-caseína está predominantemente en la forma de beta-caseína A2 (o cualquier otra variante de beta-caseína que tiene prolina en la posición 67 de su secuencia de aminoácido 209). La leche A2 puede tener un componente de beta-caseína que es mayor que 50%, de manera típica mayor que 90% (idealmente 100%), de beta-caseína A2.

45 Dado que la principal, si no la única, fuente de beta-caseínas en la dieta de la mayoría de las poblaciones humanas es la leche o productos derivados de la leche, y dado que la mayoría de la leche consumida contiene una mezcla de las variantes de A1 y A2 de beta-caseína solamente, el consumo de leche (o productos hechos de dicha leche) que tienen un alto contenido de la variante A2 necesariamente significará que el consumo de la variante A1 es bajo. Para tomar

este análisis más en detalle, si la única fuente dietética de beta-caseína contiene la variante A2 y ninguna otra variante, la ingesta dietética de la variante A1 se elimina y la consecuencia de salud adversa de la inflamación del intestino que surge del consumo de beta-caseína A1 por lo tanto también se puede esperar que sea eliminado.

5 Por consiguiente, la invención de esta solicitud se basa en la reducción o la eliminación de beta-caseína A1 en la dieta de los animales (en especial seres humanos) y esto se logra asegurándose de que la beta-caseína en composiciones de alimentos que contienen beta-caseína, en especial leche y productos lácteos, es de manera predominante o exclusiva beta-caseína A2.

10 Idealmente, la beta-caseína en la composición es 100% beta-caseína A2. Por lo tanto, la eliminación completa de beta-caseína A1 maximiza el beneficio para la salud asociado por medio de la reducción o la eliminación por completo del riesgo de inflamación del intestino provocado por la beta-caseína A1 (y BCM-7). Sin embargo, el riesgo se puede reducir en cualquier composición en la que la beta-caseína sea predominantemente beta-caseína A2, es decir, cualquier cantidad entre 50% en peso y 100%, que incluyen, pero no se limitan a, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% y 99% en peso.

15 Dado que la invención se refiere al uso de una composición que contiene beta-caseína en la que el beta-caseína comprende al menos 50% en peso de beta-caseína A2, y de acuerdo con lo explicado con anterioridad la beta-caseína A1 y la beta-caseína A2 son esencialmente las únicas variantes de beta-caseína presentes en la leche consumida por la mayoría de las poblaciones, la invención también se refiere al uso de una composición que contiene beta-caseína en la que el beta-caseína comprende menos de 50% en peso de beta-caseína A1. Con preferencia, la composición contiene menos de 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% en peso de beta-caseína A1, e idealmente no contiene beta-caseína A1 en absoluto.

20 La composición de la invención de manera típica es leche, pero también puede ser cualquier producto derivado de la leche, tales como nata, yogur, queso quark, queso, mantequilla, o helado. La composición también puede ser un producto no lácteo que contiene beta-caseína que se ha obtenido a partir de leche. La composición puede ser beta-caseína en sí misma, o se puede preparar a partir de beta-caseína, dicha beta-caseína puede estar en forma sólida tal como polvo o gránulos o en forma de una torta sólida.

Si bien la leche se puede obtener de cualquier mamífero, que incluyen seres humanos, cabras, cerdos y búfalo, en formas de realización preferentes de la invención, la leche es leche bovina.

30 La leche puede estar en la forma de leche fresca, leche en polvo, leche líquida reconstituida a partir de un polvo, leche desnatada, leche homogeneizada, leche condensada, leche evaporada, leche pasteurizada o leche no pasteurizada, leche UHT o cualquier otra forma de leche.

La composición de la invención es aplicable para su consumo por parte de seres humanos principalmente, pero se debe apreciar que el beneficio para la salud también es relevante para algunos otros animales tales como gatos, perros y otros animales domésticos.

El soporte para la invención se encuentra en los experimentos descritos en los Ejemplos.

35 En particular, el Ejemplo 2 se relaciona con el efecto de las dietas de beta-caseína A1 y beta-caseína A2 en la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en el colon de ratas. La actividad de MPO es un marcador para la inflamación (Krawisz, *et al.*, *Gastroenterology*, 1984, 87(6):1344 a 1350 y Dommels, Y.E.M., *et al.*, *Genes Nutr.*, 2007, 2(2):209 a 223). Se encontró que la actividad de MPO en el colon incrementó en las ratas alimentadas con beta-caseína A1 en comparación con las ratas alimentadas con beta-caseína A2, lo que indica un nivel incrementado de células de neutrófilos en ratas alimentadas con beta-caseína A1, que es a su vez un indicador de la respuesta inflamatoria. El efecto no se observó en ratas tratadas con naloxona (un conocido antagonista del receptor opiáceo), lo cual demuestra que el efecto está mediado a través de la interacción de BCM-7 con los receptores μ -opiáceos.

40 El Ejemplo 3 se refiere a los efectos sobre la actividad de MPO en el yeyuno. Los resultados indican que no hubo un incremento observable en la inflamación del intestino delgado tras el consumo de beta-caseína A1. Esto contrasta con el Ejemplo 2 que mostró una inflamación en el colon. El resultado del Ejemplo 3 confirma que la inflamación inducida por el consumo de beta-caseína A1 se localiza en el colon y no en todo el intestino.

45 El Ejemplo 4 se refiere a concentraciones de amiloide sérico A (SAA), que es una proteína secretada, principalmente en el hígado, durante la fase aguda de la inflamación (Uhlir, C.M. y Whitehead, A.S., *Eur. J. Biochem.*, 1999, 265(2):501 a 523). Los niveles de SAA son un indicador de la inflamación sistémica. El Ejemplo 4 muestra que no hubo diferencias significativas en la concentración de SAA en el plasma entre cualquiera de los grupos de tratamiento. En otras palabras, no hubo una clara evidencia de inflamación sistémica a partir de este estudio.

50 El Ejemplo 5, que se refiere a los estudios histológicos, refleja que la inflamación en el colon es sutil y puede ser subclínica en cómo se presenta. A pesar de los datos de MPO que confirman una respuesta inflamatoria del tejido, esto no era visualmente aparente de acuerdo con lo evidenciado por la falta de significación derivada de conjuntos de datos

de amplio alcance.

La importancia de la SAA y los experimentos de MPO en el intestino delgado es que no se observó evidencia en ninguno de los estudios de la inflamación sistémica. Esto es consistente con una respuesta inflamatoria mediada por BCM-7. Si bien no se desea estar ligado por teoría alguna, esto se puede explicar porque la inflamación del intestino que está mediada por BCM-7 es una respuesta inflamatoria localizada. En otras palabras, la falta de evidencia de inflamación sistémica (SAA y estudios de histología), junto con la evidencia de inflamación localizada (estudios de MPO), es un fuerte indicador de que la BCM-7 derivada de la ingestión de alimentos que contienen beta-caseína A1 provoca inflamación en el intestino, si bien no tiene un efecto sistémico ni un efecto en el intestino delgado.

El hallazgo es aún más sorprendente a la luz de la evidencia publicada de que la BCM-7 puede contrarrestar la inflamación. Por ejemplo, se ha informado que la BCM-7 reduce el estrés oxidativo en los riñones (Zhang, W., *et al.*, [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658831](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658831)). El estrés oxidativo es un efecto inflamatorio. Por lo tanto, el hallazgo informado de que la BCM-7 reduce estos puntos de efecto inflamatorio a la imprevisibilidad de BCM-7 como un factor en los procesos fisiológicos relacionados con la salud.

El Ejemplo 6 describe un ensayo para examinar si la leche que contiene beta-caseína A1 tiene un efecto sobre los síntomas gastrointestinales en relación con la leche que contiene beta-caseína A2. El hallazgo clave es una diferencia estadísticamente significativa en la consistencia de las heces tras el consumo de 100% en peso de beta-caseína de leche A1 y 100% de leche beta-caseína A2 ($p = 0,038$). La evidencia estadística de esto es aún más fuerte cuando sólo se consideran las mujeres ($p = 0,013$). La evidencia sigue siendo fuerte cuando los que se consideraban intolerantes a la leche se excluyen de los análisis ($p = 0,044$). Está claro que el régimen de la leche que contiene beta-caseína A1 en relación con el régimen de la leche que contiene beta-caseína A2 dio lugar a heces más blandas en general. La función de absorción de agua comprometida conduce a heces más blandas es evidencia de un mayor nivel de inflamación del intestino cuando se consume beta-caseína A1 en relación con beta-caseína A2.

El solicitante también investigó y encontró relaciones directas entre la BCM-7 (procedente de beta-caseína A1) y los indicadores de inflamación, tales como los niveles de cisteína y glutatión (GSH).

Una asociación entre Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), que son moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno tales como los iones de oxígeno y peróxidos, y la IBD se puede deducir de la evidencia de que los niveles de ROS incrementados y los niveles de antioxidantes disminuidos son los principales factores que contribuyen a mecanismos patogénicos en la IBD, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Las ROS también pueden potenciar las reacciones inmunes en la IBD por medio de la elevación de los leucocitos inflamatorios. Además, la inflamación y la progresión de la enfermedad inflamatoria también están asociadas con defectos en las defensas antioxidantes de las mucosas, en especial los niveles de GSH en la mucosa. Se ha informado que los fármacos con propiedades antioxidantes muestran efectos beneficiosos en el tratamiento de la IBD.

Los niveles sanguíneos de cisteína y selenio son críticos para el soporte y el mantenimiento de la síntesis de GSH, y éstos a su vez dependen de la absorción de los aminoácidos cisteína y metionina que contienen azufre derivados de alimentos a partir del tracto gastrointestinal (GI) a través de los diferentes transportadores en la superficie de frontera del epitelio intestinal.

Una deficiencia en el elemento traza esencial selenio (Se) se considera un factor de riesgo de varias enfermedades crónicas asociadas con el estrés oxidativo y la inflamación en seres humanos, que incluyen la enfermedad de Crohn. Se es esencial para la actividad del peróxido de glutatión GPX2 o GPX1, ambos de los cuales son enzimas clave implicadas en la regulación de los niveles de GSH en el cerebro y la mucosa. El GPX1 es conocido por estar asociado con la IBD, y su actividad depende de la presencia de Se.

Entre los diversos transportadores de aminoácidos en las células epiteliales gastrointestinales, EAAT3 (transportador de aminoácidos excitatorios 3, EAAC1) es selectivo para el transporte de cisteína y se clonó inicialmente a partir de células epiteliales gastrointestinales. EAAT3 se expresa de manera más prominente en el intestino delgado, en especial en el íleon terminal, los niveles más altos son en células de las criptas y regiones de vellosidades inferiores. Este es el sitio principal para las células madre multipotentes que soportan el revestimiento epitelial del intestino. Por lo tanto, hay una disminución de la absorción de cisteína dependiente de EAAT3, con las consecuencias locales y sistémicas de los niveles de GSH inferiores.

Los efectos descritos con anterioridad son los efectos agudos de los cambios mediados por cualquier modulador de EAAT3, en especial en el tracto GI. Sin embargo, el deterioro de la absorción GI de la cisteína, el precursor esencial de GSH, daría como resultado no sólo estrés oxidativo local y sistémico, sino que también induciría la interrupción subsiguiente de regulación epigenética normal de la expresión génica. Esto ocurre a través de actividad de la enzima metionina sintasa y la regulación de los niveles de S-adenosilmetionina (SAM). La SAM actúa como un donante de metilo para el ADN y la metilación de la histona, y se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH). La capacidad de metilación de una célula se conoce como SAM/SAH. Es probable que las respuestas epigenéticas adaptativas a los cambios en el estado redox desempeñen un papel fundamental en diversas enfermedades, en especial aquellos que se pueden rastrear hasta la interferencia con la homeostasis antioxidante, tal como la inflamación del tracto gastrointestinal

en general, y de manera más específica la IBD y la enfermedad de Crohn.

El Ejemplo 7 indica que la BCM-7 puede inhibir la absorción de cisteína de una manera dependiente de la concentración con un orden de eficacia de la morfina mayor que la BCM-7, y los valores de IC50 de 0,16 y 1,31 nM en las células neuronales y 6,38 y 15,95 nM, respectivamente, en células epiteliales gastrointestinales (Figura 5). La inhibición de la absorción de cisteína se desarrolló por completo en 30 minutos y se mantuvo durante 48 horas de la exposición a morfina o BCM-7 (Figura 6), lo que indica un efecto crónico a largo plazo sobre la absorción de cisteína después de una única exposición a BCM-7. Estos efectos fueron mediados por el receptor μ -opiode de acuerdo con lo indicado por el bloqueo en presencia de un μ -antagonista selectivo y no un receptor delta opiode.

El Ejemplo 8 indica que la BCM-7 y la morfina provocaron disminuciones dependientes del tiempo en los niveles de cisteína y GSH. Los niveles intracelulares de cisteína en las células neuronales, el estado redox de las células, que se refleja por la relación GSH/GSSG del glutatión (GSH) a su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG), también se redujeron (Figura 7), lo cual indica potencialmente una condición de estrés oxidativo. Además, la relación de SAM/SAH (capacidad de metilación) también se vio afectada por el tratamiento de BCM-7 en diferentes puntos de tiempo (Figura 7). Por lo tanto, la BCM-7 induce una reducción en los principales niveles de antioxidantes intracelulares, de manera específica los niveles de GSH, y tiene el potencial de conducir a cambios inflamatorios a través de la vía de señalización del estrés oxidativo. Además, los cambios mediados de los niveles de SAM podrían inducir cambios epigenéticos en los genes responsables de las vías inflamatorias.

El Ejemplo 9 ilustra que el tratamiento con la morfina opiode prototípica dio como resultado 7.592 transcritos expresados diferencialmente (DET), mientras que el tratamiento con BCM-7 dio 1.467 DET. 501 DET eran compartidos por ambos la morfina y la BCM-7. De manera adicional, este resultado indica las enfermedades y trastornos que se han hallado que están asociados de manera significativa con los cambios observados en la metilación del ADN global. Los transcritos de promotor diferencialmente metilados de BCM-7 (DMT) se asociaron con la enfermedad inflamatoria (Tabla 5). Por lo tanto, los efectos agudos de BCM-7 en los niveles de antioxidantes de GSH y el estrés oxidativo esencialmente se traducen en cambios de expresión génica de adaptación crónica. Los genes que se alteran epigenéticamente bajo la influencia de BCM-7 están directamente involucrados en la regulación de la función celular, así como también las vías de enfermedad inflamatoria, y los genes regulados transcripcionalmente también están involucrados en las funciones celulares y la homeostasis redox (Tabla 5).

El Ejemplo 10 muestra los cambios de metilación del ADN en los genes responsables de la mediación de la respuesta inflamatoria bajo la influencia de BCM-7. Las citoquinas tales como NFkappaB y las interleucinas tales como IL-1 (Figura 8) se alteran en su estado epigenético después de la exposición a BCM-7. Por lo tanto, los cambios en el estado redox mediaron los cambios a largo plazo en el estado epigenético de las citoquinas. Esto serviría como una memoria de los insultos moleculares, que potencialmente contribuyen a los cambios crónicos a largo plazo y las respuestas inflamatorias en enfermedades tales como la IBD. De manera adicional, el estado epigenético alterado es evidente a partir del Ejemplo 10. Por lo tanto, la BCM-7 no sólo altera la actividad de MPO, de acuerdo con lo evidente a partir de los estudios de alimentación de beta-caseína A1, pero también altera el estado de epigenética del gen MPO (Figura 9).

Estos estudios representan la primera evidencia científica clara de una relación entre el consumo de beta-caseína A1 y la inflamación del intestino. Con anterioridad, informes y estudios anecdóticos no concluyentes y contradictorios relativos a BCM-7 (en lugar de beta-caseína A1 en sí misma) condujeron a confusión entre aquéllos con experiencia en la técnica, muchos creían que no hubo tal enlace. A través de la conclusión del solicitante, ahora se proporciona una posible solución alternativa a los problemas provocados por diversas condiciones inflamatorias del intestino que han sufrido muchas personas en todo el mundo durante muchos años, es decir, la evitación de la beta-caseína A1 en la dieta. Esto se puede lograr por medio de la producción de leche que tiene su contenido de beta-caseína que contiene predominantemente beta-caseína A2 (y con beta-caseína A1 ausente) y la puesta a disposición de dicha leche, y productos derivados de la leche, para el propósito de tratar, evitar o reducir el riesgo de afecciones o síntomas relacionados con la inflamación del intestino. La leche de vacas se puede ensayar para las proporciones relativas de beta-caseína A1 y beta-caseína A2. De manera alternativa, las vacas se pueden probar genéticamente para su capacidad de producir leche que contiene beta-caseína A1 o beta-caseína A2 o una combinación de ambas. Estas técnicas son muy conocidas.

La invención tiene distintas ventajas sobre las composiciones existentes para su uso en técnicas o métodos para el tratamiento o la prevención de afecciones inflamatorias del intestino. La mayoría de las técnicas o métodos existentes se basan en la intervención médica a través de productos farmacéuticos, la gestión del estrés o modificaciones en la dieta, muchas de las cuales a menudo tienen poco o ningún éxito real. La presente invención proporciona una solución que es relativamente fácil de manejar, es decir, la conversión a una dieta sin beta-caseína A1 a través de la sustitución de leche "regular" (que contiene beta-caseína A1) en la dieta con leche que se sabe que es alta en beta-caseína A2, con preferencia cuando toda la beta-caseína presente es beta-caseína A2. La invención es considerablemente menos costosa que la intervención farmacéutica, y también evita cualquier necesidad de modificaciones dietéticas al por mayor, como evitar los productos lácteos u otros productos alimenticios comunes.

Cualquier referencia a los documentos de la técnica anterior en esta memoria descriptiva no es para ser considerada como una admisión de que dicha técnica anterior sea ampliamente conocida o forme parte del conocimiento general

común en el campo.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, las palabras “comprende”, “que comprende”, y palabras similares, no se han de interpretar en un sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, están destinadas a significar “que incluyen, pero no se limitan a”.

- 5 La invención se describe de manera adicional con referencia a los siguientes ejemplos. Se apreciará que la invención de acuerdo con lo reivindicado no pretende estar limitada de ninguna manera por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Metodología de Alimentación

- 10 Se utilizaron setenta y dos ratas Wistar machos destetadas (de cuatro semanas de edad). Después de un período de aclimatación de 7 días en una dieta de control, las ratas fueron alimentadas ya sea durante 12 o 60 horas con una de las tres dietas: 100% de la dieta A1, 100% de la dieta A2, dieta de control (n = 6 por tratamiento). El componente proteico de las dietas se obtuvo a partir de leche desnatada (para las dietas A1 y A2) y de la clara de huevo (para la dieta de control de proteína no de leche), y se equilibraron para la composición de energía y macronutrientes (véase la Tabla 1). Quince minutos antes del final del período de tiempo, las ratas recibieron ya sea naloxona o solución salina (control) a través de inyección intraperitoneal, y luego se amordazaron por vía oral con un trazador no digerible, dióxido de titanio. Se recogieron muestras fecales y de orina en 7 puntos de tiempo durante las siguientes 24 horas, y se almacenaron a -20 °C (heces) o -80 °C (orina) hasta que se analizaron.

Tabla 1: Composición de las dietas

Producto	Dieta de leche A1		Dieta de leche A2		Dieta de clara de huevo	
	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
Caseína	0	0	0	0	0	0
Leche en polvo A1	475	1691	0	0	0	0
Leche en polvo A2	0	0	468	1687	0	0
DL-metionina	3	12	3	12	0	0
Claras de huevo (secas)	0	0	0	0	200	800
Almidón de maíz	150	600	150	600	153	612
Sacarosa	288	1152	294	1176	500	2000
Celulosa, BW200	50	0	50	0	50	0
Aceite de maíz	45,2	406,8	43	387	50	450
Mezcla mineral S10001	35	0	35	0	35	0
Biotina, 1%	0	0	0	0	0,4	0
Mezcla de vitamina V10001	10	40	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2	0	2	0	2	0
Total	1058,2	3902	1055	3902	1000,4	3902

20 **Ejemplo 2: Actividad de MPO en el Colon**

- El tejido del colon de las ratas alimentadas de acuerdo con el Ejemplo 1 se cuantificó para la actividad de mieloperoxidasa (MPO), basado en un método establecido (Grisham, M.B., *et al.*, *Methods Enzymol.*, 1990, 186:729 a 742). El tejido del colon (50 mg) se homogeneizó, se separó en partes a través de centrifugación, se rompió por medio de una sonda ultrasónica y se sometió a un ciclo de congelación-descongelación. El MPO endógeno cataliza la oxidación dependiente de H₂O₂ de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina medido colorimétricamente a 562 nm. La actividad se normalizó por medio de una determinación de proteínas de ácido bicinconínico (BCA) (Smith, P.K., *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1985, 150 (1):76 a 85) para el mismo homogeneizado. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 3: Actividad de MPO en el Yeyuno

- 30 En este ejemplo, se analizaron muestras de tejido tomadas del yeyuno. La metodología utilizada fue la misma que para el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y la Figura 2.

Tabla 2: Actividad de MPO en el tejido del colon y el yeyuno

Dieta	Yeyuno	SD
100% de A1	0,458	0,164
75% de A1: 25% de A2	0,497	0,107
50% de A1: 50% de A2	0,476	0,112
25% de A1: 75% de A2	0,557	0,119
100% de A2	0,532	0,254

Ejemplo 4: Niveles de Amiloide Sérico A

Los niveles de SAA se midieron en el plasma tomado de las ratas alimentadas de acuerdo con el Ejemplo 1. Las mediciones se hicieron por el uso de un kit ELISA disponible comercialmente (Tridelta Development Limited, Maynooth, Irlanda). Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 3.

5

Tabla 3: Niveles de SAA en el plasma

	SAA	SD
A1 12	0,0304	0,021
A1 60	0,0129	0,012
A1 12 N	0,0223	0,018
A1 60 N	0,0106	0,008
A2 12	0,0349	0,011
A2 60	0,0085	0,006
A2 12 N	0,0391	0,005
A2 60 N	0,0103	0,007

Ejemplo 5: Histología Intestinal

El procedimiento utilizado para medir el cambio en la morfología en el tracto gastrointestinal de ratas se basa en la evaluación histológica de secciones de tejido teñidas de hematoxilina y eosina con un microscopio de luz (Knoch, B. *et al.*, *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*, 2009, 2(1):9 a 28 y Barnett, M.P., *BMC Immunol.*, 2010, 11:39). Este método se aplicó a las secciones derivadas de tejido del colon de ratas alimentadas con dietas de ya sea 100% de A1 o 100% de A2 para determinar los efectos de las variantes de beta-caseína sobre la inflamación del intestino. Los resultados se muestran en la Figura 4. Los datos (media ± SEM) mostraron que no había una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las ratas alimentadas con beta-caseína A1 y las alimentadas con beta-caseína A2 en el grupo de naloxona de 60 horas, las ratas alimentadas con beta-caseína A2 tuvieron una puntuación significativamente más alta. Sin embargo, la magnitud de estos puntajes histológicos no es indicativa de inflamación, y un análisis general no muestra evidencia de un efecto del tratamiento con dieta, tiempo o naloxona en el puntaje histológico.

10

15

Ejemplo 6: Síntomas Gastrointestinales

En este estudio cruzado y aleatorio de 8 semanas, los participantes ($n = 41$) fueron asignados al azar a uno de dos grupos luego de un lavado de productos lácteos de 2 semanas: 1) leche A1 ($n = 21$); o 2) leche A2 ($n = 20$). Los participantes se sometieron a un segundo lavado de lácteos de 2 semanas y luego se cruzaron al brazo de leche de intervención alternativa, de manera tal que al final del estudio de 8 semanas, todos los participantes ($n = 37$) habían completado ambas intervenciones de leche. Se reclutaron hombres (12) y mujeres (29), de entre 19 y 68 de edad. Los criterios de exclusión fueron: (1) alergia a la leche; 2) intolerancia a la lactosa diagnosticada médicamente; 3) embarazo y la lactancia; 4) eventos cardiovasculares en los últimos 6 meses; 5) consumo de opioides; 6) tratamiento antibiótico en las 8 semanas anteriores; y 7) medicación inmunosupresora o fármacos anti-inflamatorios en las 4 semanas anteriores a la selección. Los participantes comenzaron con un periodo de lavado de productos lácteos de 14 días (en el que la leche de vaca fue reemplazada con leche de arroz suministrada) antes de ser asignados al azar a 2 semanas en cualquiera leche A1 o leche A2. Después de completar la primera parte del estudio, los participantes completaron un segundo lavado de 2 semanas antes de cruzar a la otra intervención leche.

20

25

30

Leche de Arroz Lavada - Los participantes fueron instruidos para reemplazar toda la leche de vaca a la leche de arroz

5 suministrada para los períodos de lavado de 14 días y evitar todos los otros productos lácteos durante la duración del estudio. Se les proporcionó información relativa a las fuentes ocultas de productos lácteos, tales como galletas y chocolate, y se les proporcionó una lista de alternativas libres de lácteos. Los participantes también fueron suministrados con suficiente leche de arroz (Leche de arroz So Natural, Freedom Foods, Australia) para consumir 750 ml de leche de arroz/día, para cada uno de los períodos de lavado de 14 días. La leche de arroz fue suministrada en paquetes de ultra alta temperatura (UHT) de 1 litro y tenía el siguiente perfil nutricional por cada 100 ml: 212kJ de energía, 0,3 g de proteína total, 1,0 g de grasa total y 10,4 g de hidratos de carbono.

10 *Leche A1* - Los participantes fueron instruidos para reemplazar toda la leche de vaca con la leche A1 suministrada y evitar todos los otros productos lácteos y las fuentes ocultas de productos lácteos. Durante las 2 semanas de intervención de leche A1, los participantes fueron instruidos para consumir 750 ml/día (~7,5 g de beta-caseína A1) de leche A1 extendida a lo largo de todo el día. El análisis nano-LC ESI MS de la leche A1 (APAF, Sídney) halló que la proporción de A1 de beta-caseína total era > 99% en la leche A1.

15 *Leche A2* - Los participantes fueron instruidos para reemplazar toda la leche de vaca con la leche A2 suministrada y evitar todos los otros productos lácteos y todas las fuentes ocultas de productos lácteos. Durante las 2 semanas de intervención de leche A2, los participantes fueron instruidos para consumir 750 ml/día (~7,5 g de la beta-caseína A2) de leche A2 extendida a lo largo de todo el día. El análisis nano-LC ESI MS de la leche A2 (APAF, Sídney) halló que la proporción de A1 de beta-caseína total era de 0,1 a 0,5%.

20 Tanto la leche A1 como la leche A2 se suministraron a los participantes en paquetes UHT de 1 litro y tenían el siguiente perfil nutricional por cada 100 ml: 189kJ de energía, 3,1 g de proteína total, 2,5 g de grasa total y 5,2 g de hidratos de carbono (que incluyen lactosa). Los participantes registraron el volumen de leche que se consume por día en los calendarios de cumplimiento. El cumplimiento se calcula como un porcentaje por medio de la división del volumen de leche consumida por el consumo de volumen de leche esperado cada día y multiplicado por 100. La leche A1 y la leche A2 se proporcionaron en un paquete sencillo idéntico para que los participantes estuvieran cegados a la intervención de leche que estaban recibiendo.

25 Se utilizó la Escala de Heces de Bristol (Lewis S.J. y Heaton K.W., *Scand. J. Gastroenterol.* 1997, 32(9):920 a 924) como una medida sustituta del tiempo de tránsito en el colon. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Análisis de la escala de heces de Bristol de consistencia de las heces

	Todos los participantes (n = 36)		Sólo mujeres (n = 25)		Sólo hombres (n = 11)		Descritos a sí mismos como intolerantes a la leche (n = 8)		Descritos a sí mismos como tolerantes a la leche (n = 28)	
Media para A1 (± SE)	3,87 (0,11)		3,94 (0,15)		3,72 (0,15)		4,02 (0,28)		3,82 (0,12)	
Media para A2 (± SE)	3,56 (0,15)		3,50 (0,16)		3,70 (0,31)		3,86 (0,33)		3,47 (0,16)	
Diferencia A1-A2 (± SE)	0,31 (0,14)		0,44 (0,16)		0,02 (0,28)		0,16 (0,29)		0,35 (0,17)	
Valor de p para la prueba t pareada	0,038		0,013		0,156		0,592		0,044	
Mediana (A1, A2)	4,0	3,8	4,0	3,8	3,7	3,8	0,0	4,0	3,95	3,7
25 percentil A1	3,35	3,02	3,25	2,9	3,5	3,1	3,67	2,9	3,22	3,02
75 percentil	4,2	4,07	4,3	4,0	4,2	4,3	4,6	4,7	4,2	4,0
valor de p para la prueba de puntajes con signo de Wilcoxon	0,085		0,028		0,824		0,598		0,115	

Ejemplo 7: Efecto de BCM-7 sobre la Absorción de Cisteína

30 Se llevó a cabo un ensayo de absorción de cisteína-[³⁵S] radiomarcada en las células epiteliales de Caco-2-GI y células neuronales, en presencia de BCM-7 liberado de leche A1, y se comparó con los controles no tratados, así como también morfina; un agonista del receptor opioide prototípico. El pretratamiento de las células se llevó a cabo para diferentes puntos de tiempo durante 30 min, 4, 24 y 48 h de acuerdo con lo descrito previamente (Trivedi M., *et al.*; *Mol. Pharm.*, 2014). De manera breve, se sembraron células neuronales humanas SH-SY5Y y células epiteliales intestinales Caco-2 en placas de seis pocillos y se trataron previamente con fármacos y se incubaron durante diversos tiempos antes de medir la absorción. Los medios se aspiraron y las células se lavaron con 600 µl de HBSS a 37 °C. Se aspiró el HBSS no

radiactivo, se reemplazó con 600 µl de HBSS a 37 °C que contiene cisteína-[³⁵S], (1 µCi/1 ml), 10 µM de cisteína no marcada y 100 µM de DTT, y se incubaron las células durante 5 min. La mezcla de [³⁵S]-cisteína/HBSS se aspiró y el tratamiento se terminó por medio de dos lavados con HBSS enfriado con hielo. Las células se lisaron entonces con 600 µl de dH₂O, se rasparon, se recogieron en tubos de 1,5 ml de microcentrifuga, y se sonicaron durante 10 s. 100 µl de cada muestra se dividió en alícuotas para el ensayo de proteína. 200 µl de cada muestra (por triplicado) se dividió en alícuotas en viales de centelleo con 4 ml de fluido de centelleo, se agitó en vórtex, y se contó la radiactividad, normalizada contra el contenido de proteína. De manera adicional, los efectos de absorción de cisteína de la morfina y BCM-7 también se caracterizaron en presencia de D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr (CTAP), un µ-antagonista selectivo, y el antagonista delta naltrindol (NTI). Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. Cada símbolo * en estas Figuras indica una diferencia estadísticamente significativa (p <0,05) en comparación con el control no tratado, y cada símbolo # indica una diferencia estadísticamente significativa (p <0,005) en comparación con el control no tratado.

Ejemplo 8: Efecto de BCM-7 en los Niveles de GSH

Este ejemplo investigó si las disminuciones de la absorción de cisteína de acuerdo con lo observado en el Ejemplo 7 se podrían traducir potencialmente en cambios del GSH y afectar a los niveles de antioxidantes. Los niveles intracelulares de GSH se midieron con BCM-7, así como también la morfina para diferentes momentos (30 min, 4 h, y 24 h) con el uso de HPLC y un método de detección de gradiente electroquímico utilizado con anterioridad (Hodgson *et al.*, *J. Alzh. Dis.* 2013, Trivedi M., *et al.*, *Mol. Pharm.* 2014). De manera breve, se cultivaron las células neuronales SHSY5Y hasta la confluencia en α-MEM. El medio se aspiró y las células se lavaron dos veces con 1 ml de HBSS helado. El HBSS se aspiró y se añadieron 0,6 ml de dH₂O helado a las células. Las células se rasparon del matraz/placa y se suspendieron en dH₂O. La suspensión celular se sometió a ultrasonidos durante 15 s en hielo y 100 µl de la suspensión se utilizó para determinar el contenido de proteína. El lisado restante se añadió a un tubo de microcentrifuga y se añadió un volumen igual de ácido perclórico 0,4 N, seguido por incubación en hielo durante 5 min. Las muestras se centrifugaron a 5000 x g y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de microcentrifuga. Se añadieron 100 µl de muestra a un vial de micro-automuestreador cónico y se mantuvo a 4 °C en la bandeja de enfriamiento del inyector automático. 10 µl de esta muestra se inyectó en el sistema de HPLC.

La separación de redox y la metilación de metabolitos de la vía se llevó a cabo por el uso de una columna Agilent Eclipse XDBC8 analítica (3 X 150 mm; 3,5 µm) y una columna de guarda Agilent Eclipse XDBC8 (4,6 X 12,5 mm; 5 µm). Se utilizaron dos fases móviles: la Fase Móvil A era de 0% de acetonitrilo, 25 mM de fosfato de sodio, 1,4 mM de ácido 1-octanosulfónico, se ajustó a pH 2,65 con ácido fosfórico. La Fase Móvil B era 50% de acetonitrilo. La velocidad de flujo se estableció inicialmente en 0,6 ml/min y se utilizó un gradiente en pasos: de 0 a 9 min 0% de B, de 9 a 19 min 50% de B, de 19 a 30 min 50% de B. A continuación, la columna se equilibró con 5% de B durante 12 min antes de la siguiente ejecución. La temperatura se mantuvo a 27 °C. El detector electroquímico era un CoulArray ESA con BDD Modelo analítico celular 5040 y el potencial de funcionamiento se fijó en 1500 mV. Las concentraciones de muestra se determinaron a partir de las áreas de los picos de los metabolitos por el uso de curvas de calibración estándar y software de HPLC suministrado por ESA. Las concentraciones de muestra se normalizaron contra el contenido de proteína. En algunos casos se diluyeron las muestras en la fase móvil, de acuerdo con lo necesario o se inyectaron hasta 50 µl de la muestra para asegurar que los niveles de tiol estuvieran dentro del intervalo de la curva estándar. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 9: Efecto de BCM-7 en la Metilación del ADN y Niveles de Expresión Génica

Los cambios en SAM/SAH podrían afectar potencialmente la metilación del ADN global, que influye en los genes implicados en diversas funciones. Los niveles de metilación del ADN global inducido por BCM-7 fueron investigados por el uso del dominio de unión de metil-CpG (MBD) la secuenciación del genoma enriquecida en proteínas (MBD-seq) de acuerdo con lo descrito previamente (Trivedi M., *et al.*, *Mol. Pharm.* 2014), mientras que se obtuvieron datos de micromatrices de traducción de ARNm por el uso de chip de micromatriz Agilent V3, de células SH-SY5Y de control no tratado y células tratadas durante 4 horas con 1 µM de BCM-7.

De manera breve, el ADN genómico fue extraído de las muestras con el kit de ADN Easy (Invitrogen K1800-01) por el uso del protocolo apropiado para líneas celulares. La fragmentación se llevó a cabo en Covaris S2 con los siguientes ajustes: el ciclo de trabajo 10%, la intensidad 5, 200 ciclos por ráfaga durante 200 s. Se obtuvieron fragmentos que tenían una longitud promedio de 200 bp. El modo de alimentación es la frecuencia de barrido, la temperatura de 6 a 8 °C, el nivel de agua 12. Un máximo de 5 mg se cargó en 130 ml de TrisEDTA en un microtubo con intensificador AFA. Para muestras con menos entrada de ADN (hasta 500 ng) el ADN se diluyó 1:5 en TrisEDTA. El ADN con una entrada de 5 a 3 µg se analizó en el Agilent 2100 por el uso de un chip de ADN 1000. El ADN con una entrada inferior a 3 mg se concentró en un evaporador rotatorio a 25 ml y la distribución de fragmentos se comprobó en un chip de ADN de alta sensibilidad. El ADN metilado se capturó por el uso del kit MethylCap (Diagenode, Bélgica). El rendimiento de manera típica fue entre 0,5 y 8 ng del ADN total capturado. Los fragmentos se secuenciaron posteriormente por el uso de un Illumina Genome Analyzer II. Las concentraciones de ADN fragmentado y capturado se determinaron en un lector de placas Fluostar Optima con el Quant-iT PicoGreen ADNbc Assay Kit (Invitrogen P7589) a 480/520 nm.

Para preparar la biblioteca de ADN, se utilizó una muestra de ADN Prep Master Mix Set 1 (NEB E6040) en combinación con un Kit Oligo de Preparación de Muestras de Multiplexación (96 muestras, Illumina PE-400-1001). Todo el ADN

fragmentado se utilizó y siguió a los protocolos de NEB, por el uso de los adaptadores de secuenciación de multiplexación proporcionados en el Kit Oligo de Preparación de Muestras de Multiplexación. La selección de tamaño de la biblioteca se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% (Biorad Agarosa Ultra de Intervalo Bajo 161-3107). Se utilizó una escala de 1 Kb Plus (Invitrogen 10787-018) y un gel se hizo funcionar a 120 V durante 2 horas. Un fragmento de 300 bps +/-50 bp se escindió y se eluyó en una columna Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen 28704) y se eluyó en 23 µl de EB.

El protocolo de índice de amplificación de biblioteca Illumina se utilizó con las siguientes alteraciones: se utilizaron 22 µl de ADN y se llevaron a cabo 21 ciclos de ejecución. La muestra se purificó en una columna de purificación Qiaquick PCR (Qiagen 28101) y se eluyó en 50 µl de EB, diluido 1:5, se concentró en un evaporador rotatorio a 10 µl. Se aplicó 1 µl de un chip de ADN SA Agilent 2100 y la concentración se determinó por medio de análisis de mancha en el Agilent 2100. Las muestras se diluyeron a 10 nM. Después de la desnaturalización con NaOH se diluyeron las muestras a 16 pM. La celda de flujo de Extremo emparejado se preparó de acuerdo con la Guía de Usuario de la Estación de Clústeres. La secuenciación se llevó a cabo de acuerdo con la guía del usuario HiSeq (por medio de la realización de un PE Run multiplexado), con 2 x 51 ciclos para las ejecuciones finales emparejados.

Para hibridaciones de micromatrices de genoma enteras, se marcaron 500 ng de ARN total de cada muestra con colorante fluorescente (Cy3; Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) por el uso del kit de Etiquetado de Amplificación Lineal de entrada de ARN Bajo (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad y la calidad del ARNc marcado con fluorescencia se evaluaron por el uso de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y un Bioanalyzer Agilent. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, 1,6 mg de ARNc marcado con Cy3 se hibridó a la Micromatriz Oligo del Genoma Completo Humano de Agilent (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) durante 17 horas antes del lavado y el escaneo. Los datos se obtuvieron a partir de imágenes por el uso de Software de Extracción de Características (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA).

El ADN del genoma completo MBD-seq reveló transcritos de promotor diferencialmente metilados (DMT), de acuerdo con lo definido por la tasa de falso descubrimiento (FDR) < 0,1 y los datos de micromatrices de ARNm, revelaron transcritos expresados diferencialmente (DET), definidos por una FDR < 0,1. Los transcritos incluyen tanto los genes como los ARN no de codificación que eran diferencialmente metilado/transcritos. Los cambios epigenéticos, así como también los cambios de transcripción inducidos por BCM-7 en las vías biológicas o funcionalmente relevantes específicas se evaluaron por el uso de la herramienta de Análisis de la Vía Ingenuity (IPA) y se identificaron las vías que presentan el más alto impacto. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Enfermedades Inflamatorias y Transcritos Expresados Diferencialmente de BCM-7

Enfermedad o Trastorno	Valor de p para DMT
Enfermedad Inflamatoria	3,96 x 10 ⁻³ a 4,51 x 10 ⁻²
Enfermedad de Trastorno	Valor de p para DET
Homeostasis celular	1,27 x 10 ⁻⁴ a 3,28 x 10 ⁻²
Modificaciones Posteriores a la Traducción	2,41 x 10 ⁻⁶ a 1,84 x 10 ⁻²

Ejemplo 10: Efecto de BCM-7 en el Estado Epigenético de Citoquinas

Se informó que varias citoquinas individuales están involucradas en la mediación de la respuesta inflamatoria en enfermedades tales como la IBD y la enfermedad de Crohn. NFkappaB es un ejemplo. Del mismo modo, también se informó de interleucinas tales como IL-1, IL-10, IL33 etc. que están involucradas en la mediación de la respuesta inflamatoria en la IBD. Los efectos epigenéticos de BCM-7 sobre interleucinas y NFkappaB se investigaron por el uso del método descrito con anterioridad en el Ejemplo 9. Las Figuras 8 y 9 muestran el efecto de BCM-7 en los cambios de metilación del ADN intragénico o cerca de la región del promotor de estos genes, a saber MPO, IL1R, IL10 y la proteína de activación de NFkappaB. "CpG" indica el nivel normal de las islas de CpG (alta frecuencia de sitios de citosina-guanina) señaladas en ese locus gen específico. El término "control" indica los controles no tratados.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención o la reducción del riesgo de inflamación del intestino en un animal, en la que la composición contiene beta-caseína y en la que la beta-caseína comprende al menos 50% en peso de beta-caseína A2.
- 5 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la beta-caseína comprende al menos 90% en peso de beta-caseína A2.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o la reivindicación 2, en la que la beta-caseína comprende al menos 99% en peso de beta-caseína A2.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la beta-caseína comprende menos de 50% en peso de beta-caseína A1.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la beta-caseína comprende menos de 10% en peso de beta-caseína A1.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en la que la beta-caseína comprende menos de 1% en peso de beta-caseína A1.
- 15 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición es leche o un producto lácteo.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la leche es leche fresca, leche en polvo, leche líquida reconstituida a partir de polvo, leche desnatada, leche homogeneizada, leche condensada, leche evaporada, leche pasteurizada, leche no pasteurizada o leche UHT.
- 20 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el producto lácteo es nata, yogur, queso quark, queso, mantequilla o helado.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la inflamación del intestino es una enfermedad inflamatoria del intestino.
- 25 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la inflamación del intestino es el síndrome del intestino irritable.
13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el animal es un ser humano, un perro o un gato.

Figura 1

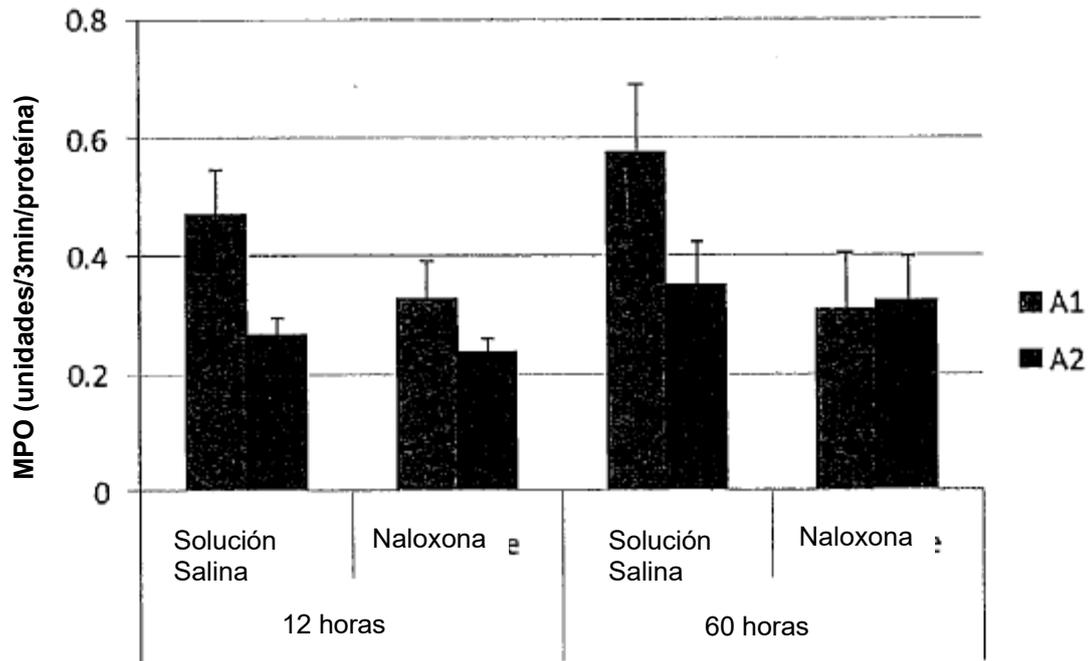


Figura 2

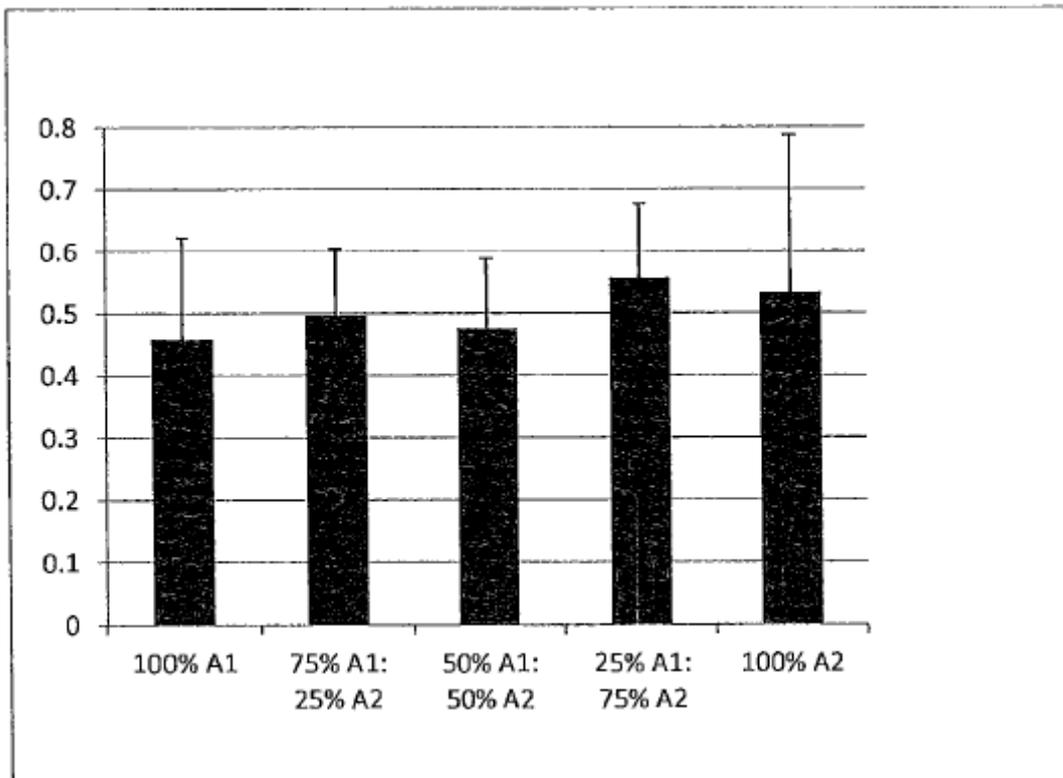


Figura 3

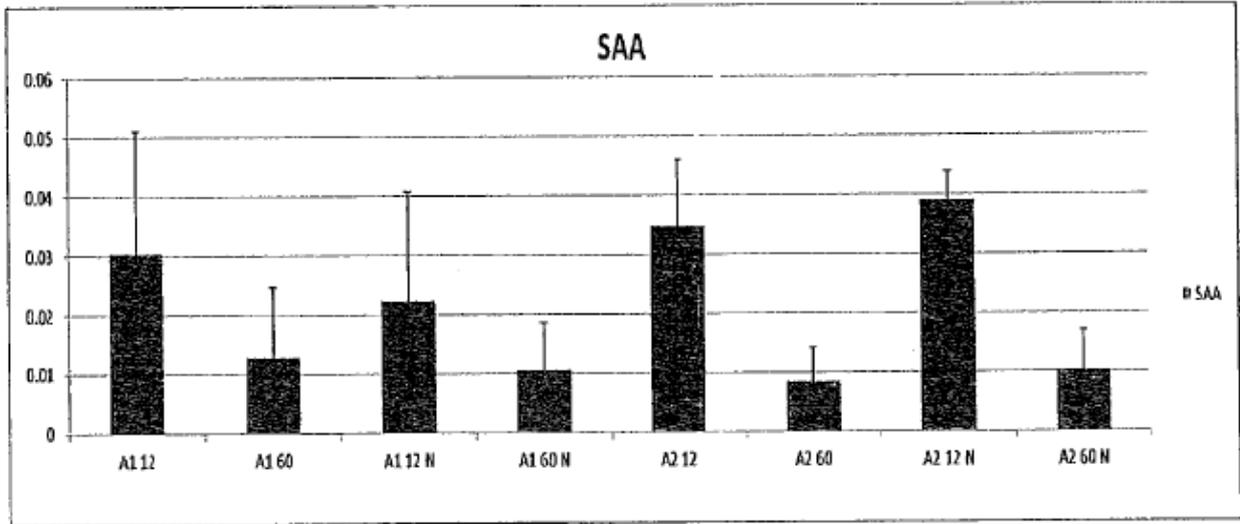


Figura 4

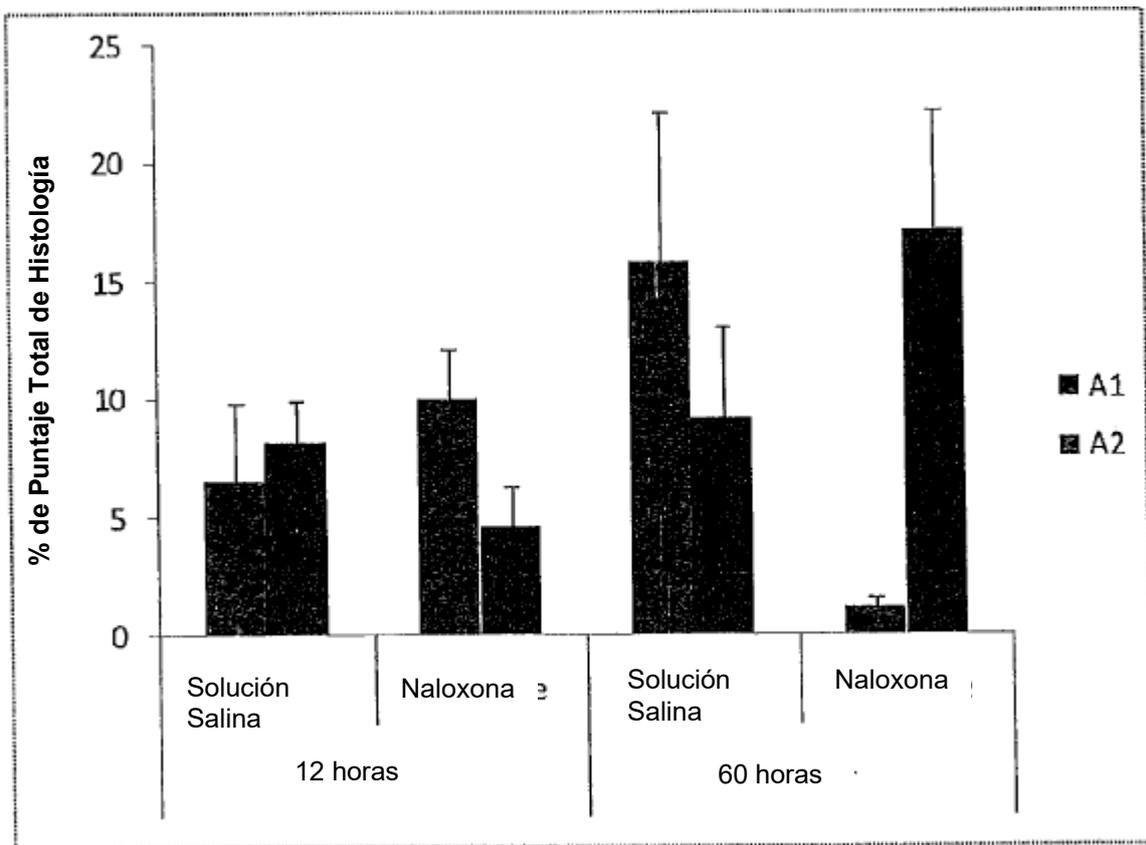
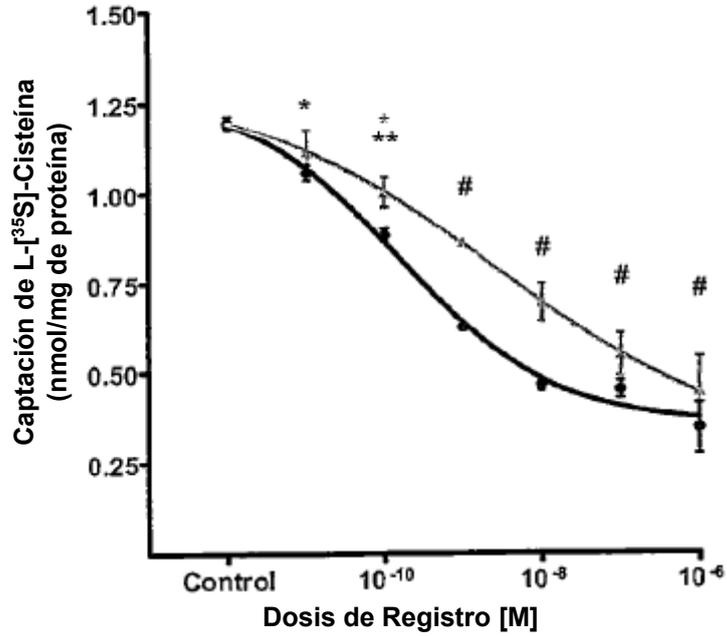


Figura 5

Células neuronales



Células epiteliales gastrointestinales

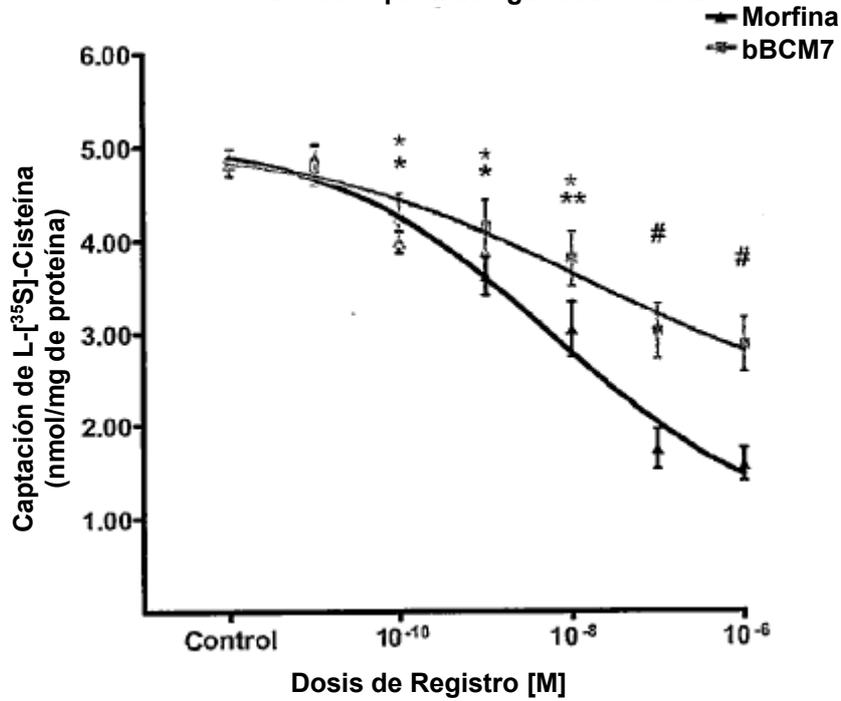


Figura 6

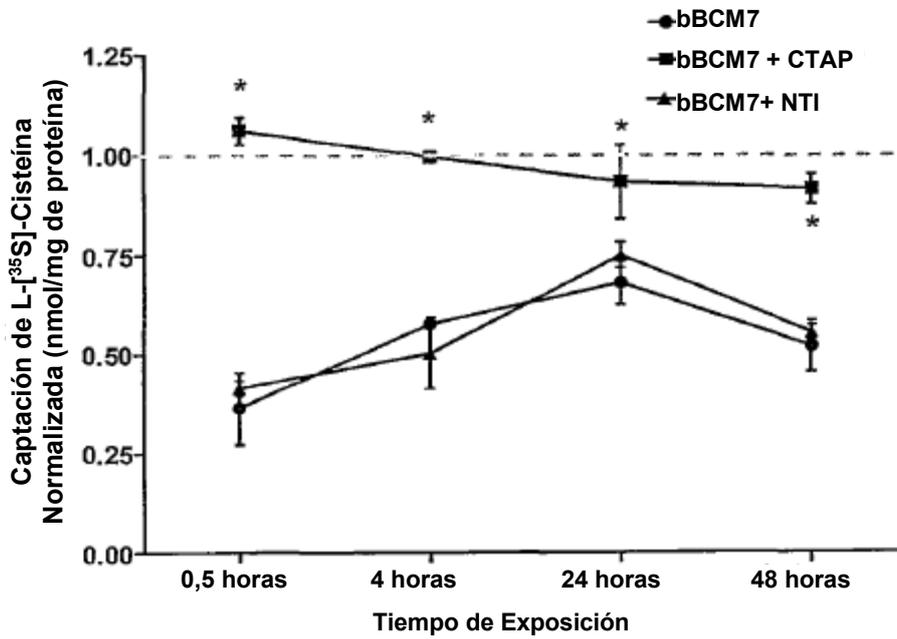
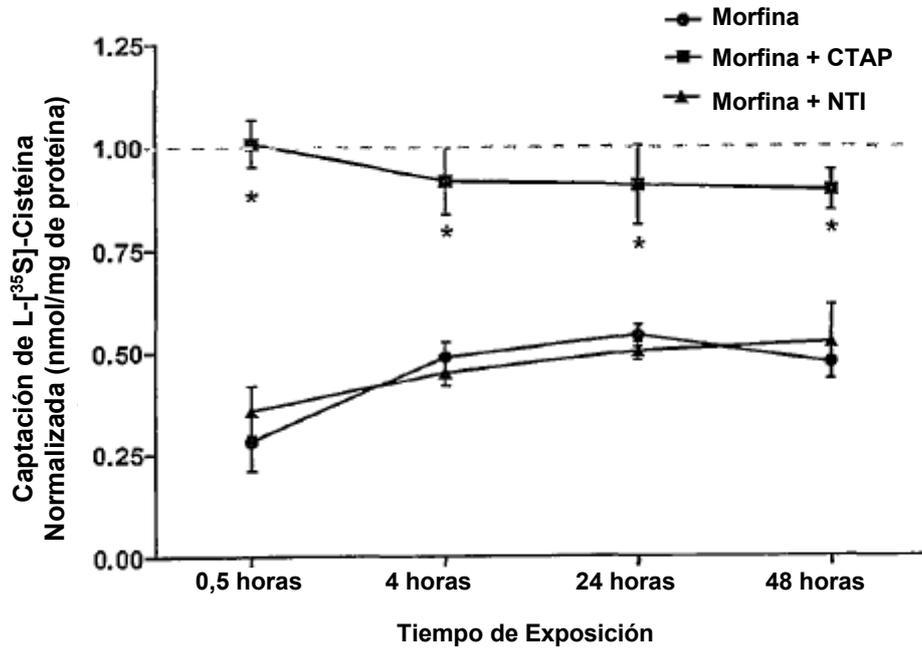
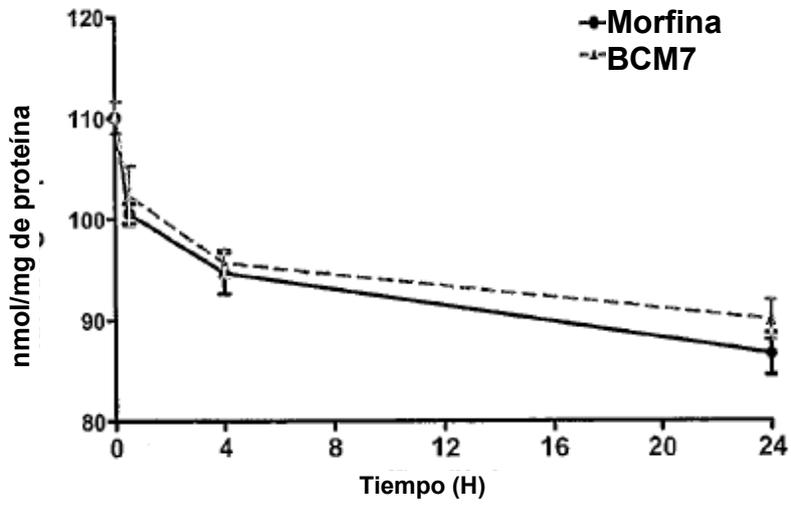
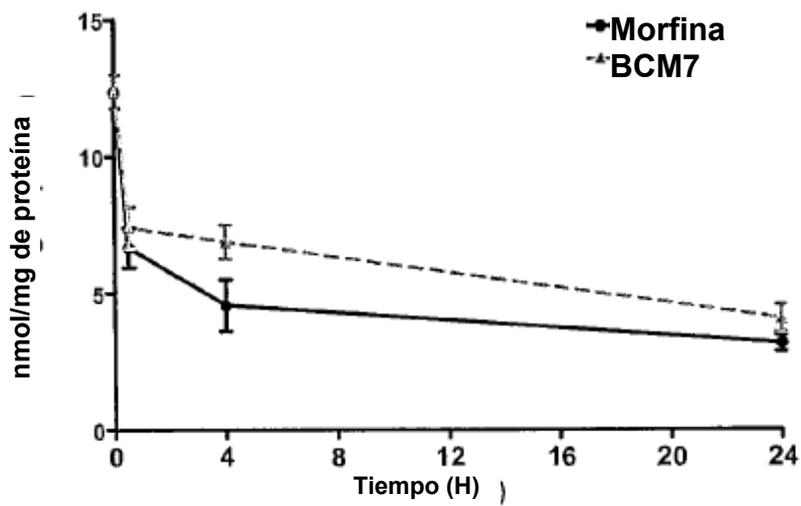


Figura 7

Cisteína



GSH/GSSG



SAM/SAH

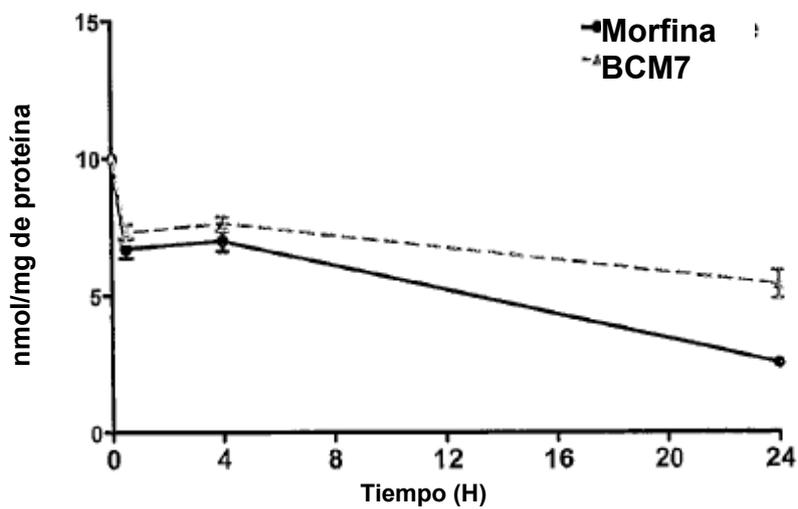


Figura 8

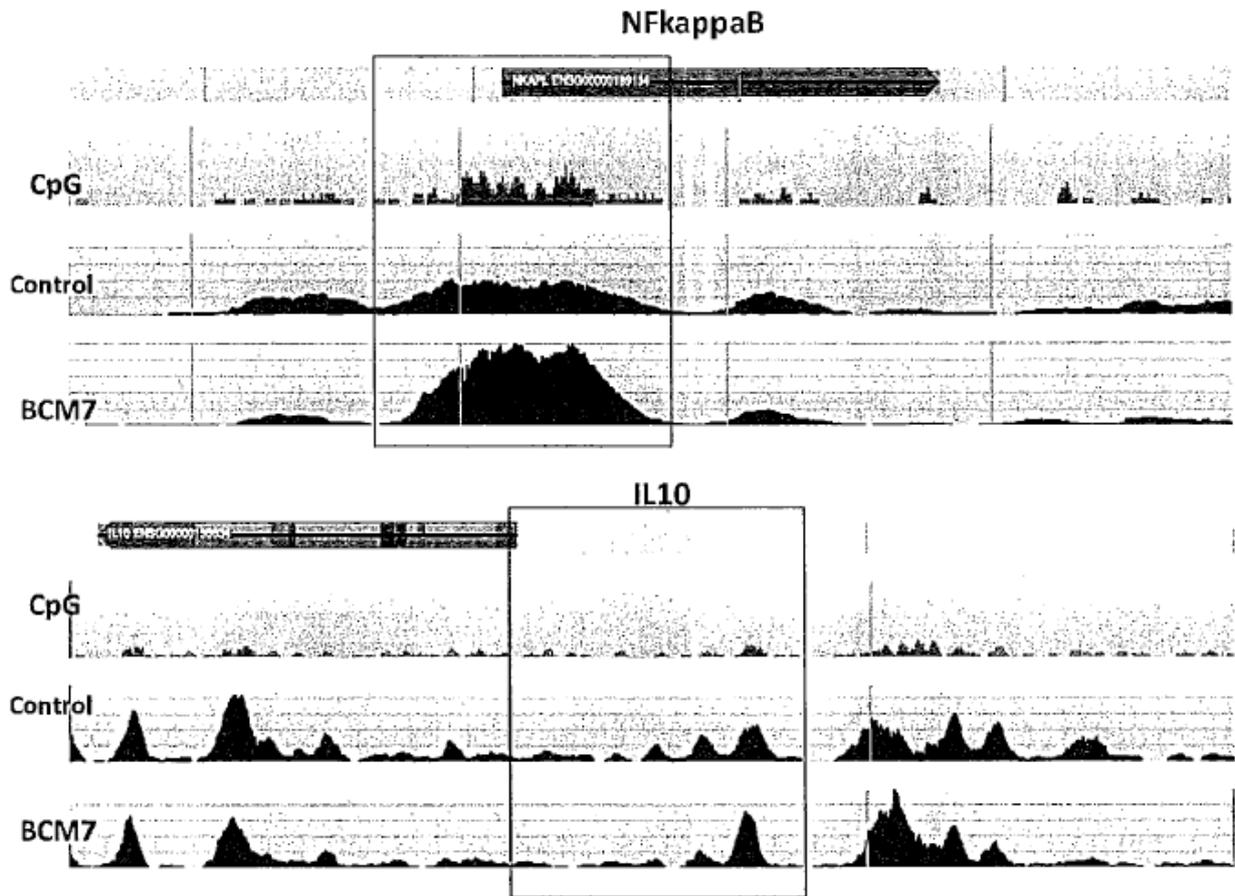
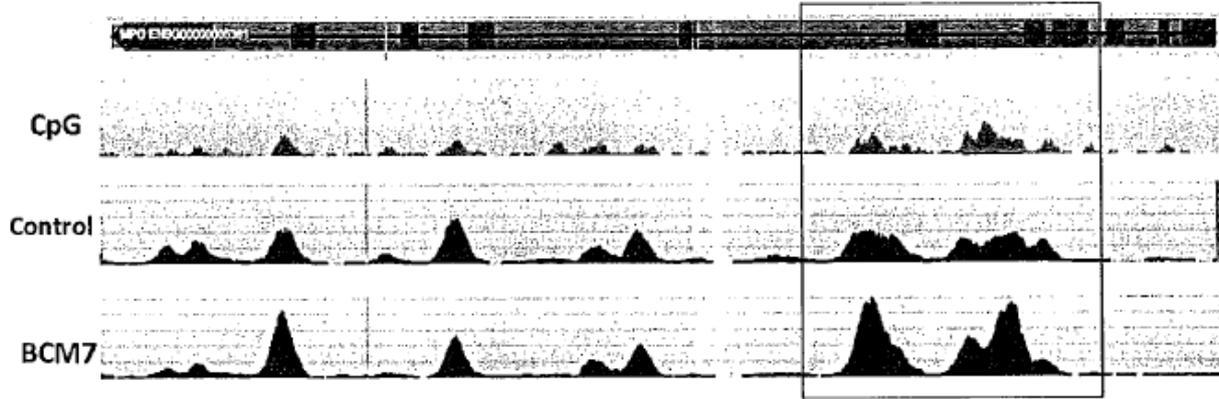


Figura 9

Mieloperoxidasa (MPO)



IL1R

