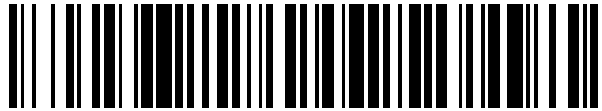


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 194**

51 Int. Cl.:

A61K 35/20 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A23L 33/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2014 PCT/NZ2014/000141**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15005804**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2014 E 14823628 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3019180**

54 Título: **Beta-caseína A2 y reducción o prevención de síntomas de intolerancia a lactosa**

30 Prioridad:

12.07.2013 US 201361845480 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

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 2 743 194 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

Beta-caseína A2 y reducción o prevención de síntomas de intolerancia a lactosa

Campo Técnico

5 La invención se refiere al uso de la proteína de la leche beta-caseína A2 para la reducción o la prevención de los síntomas de intolerancia a la lactosa. En particular, la invención se refiere a la leche y a los productos alimenticios derivados de la leche. El solicitante ha hallado que el consumo de leche y productos lácteos que contienen altos niveles de la proteína beta-caseína A2 y la evitación de la leche y productos lácteos que contienen beta-caseína A1 es beneficiosa para la reducción o la prevención de los síntomas de intolerancia a la lactosa. Se debe destacar que el efecto beneficioso es inmediato (agudo) y, de manera adicional, induce una predisposición continua (posterior a la exposición a beta-caseína A1) a la prevención o la reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa en la exposición futura a la lactosa.

Antecedentes de la invención

15 La intolerancia a la lactosa se refiere por lo general a una capacidad comprometida para digerir la lactosa. La lactosa es un carbohidrato disacárido que comprende monosacáridos de galactosa y glucosa. La lactosa se encuentra en la leche y los productos lácteos derivados de la leche. La leche humana comprende aproximadamente 9% de lactosa, mientras que la leche bovina sin procesar comprende aproximadamente 4,7% de lactosa. La leche de cabras, búfalos y ovejas también contiene lactosa en el intervalo de 4,5 a 5,0%. La digestión de la lactosa es la hidrólisis (o la división) de la lactosa en galactosa y glucosa por una enzima lactasa.

20 Las personas que son intolerantes a la lactosa carecen de suficientes niveles de lactasa en su sistema digestivo. La lactosa no puede ser absorbida a través de la pared del intestino delgado en el torrente sanguíneo y por lo tanto, si no es desglosada por una lactasa, pasa intacta al colon. La fermentación bacteriana de la lactosa en el colon produce una gran cantidad de gas. Además, los hidratos de carbono no absorbidos y los productos de fermentación elevan la presión osmótica del colon, lo que provoca un incremento del flujo de agua en el intestino. Por lo tanto, la intolerancia a la lactosa puede provocar una variedad de síntomas que incluyen hinchazón abdominal y calambres, flatulencias, diarrea, náuseas, ruidos del estómago, o incluso vómitos. Estos síntomas normalmente se producen aproximadamente 30 minutos a 2 horas después del consumo de lactosa.

30 Inicialmente los mamíferos lactantes producen lactasa, pero esta producción normalmente cesa después del destete. Sin embargo, algunas poblaciones humanas han desarrollado persistencia de la lactasa, donde la producción de lactasa continúa en la edad adulta. Se piensa que el grado de persistencia de la lactasa en diferentes poblaciones es el resultado de la selección natural, que favorece aquellas culturas en las que los productos lácteos están disponibles como fuente de alimento.

35 La intolerancia a la lactosa no es un absoluto, es decir, la cantidad de lactosa que puede ser tolerada varía de persona a persona. En general, un individuo intolerante a la lactosa, debe calcular, por medio de ensayo y error, cuánta lactosa pueden tolerar. Esto se hace, por lo general, por medio del control de los niveles de lactosa de la dieta o evitando la lactosa en la dieta por completo. En algunos casos, se pueden utilizar suplementos enzimáticos de lactasa. Las leches derivados de leches a base de plantas se pueden utilizar porque son inherentemente libres de lactosa, por ej., la leche de soja, la leche de arroz, la leche de almendras, la leche de coco, la leche de avena, la leche de cáñamo y la leche de maní. También hay muchos alimentos disponibles que son libres de lactosa o bajos en lactosa. A pesar de la disponibilidad de este tipo de alimentos, la evitación de la leche o productos lácteos en la dieta a menudo es difícil.

40 El vínculo entre el consumo de leche (y otros productos lácteos) y los *síntomas* de la intolerancia a la lactosa es muy conocido. Sin embargo, en ausencia de un diagnóstico médico específico para la intolerancia a la lactosa, muchas personas erróneamente consideran que son intolerantes a la lactosa porque conectan los síntomas que sufren con el consumo de leche u otros productos lácteos. De hecho, los síntomas pueden ser debido a otros componentes de la leche que exacerban efectos que de lo contrario son insignificantes o imperceptibles. Las proteínas son un ejemplo de un componente que puede provocar o exacerbar tales síntomas.

45 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, y las beta-caseínas constituyen aproximadamente el 37% de las caseínas. En las últimas dos décadas, ha ido creciendo el cuerpo de evidencias que implica las proteínas de caseína, en especial beta-caseínas, en una serie de trastornos para la salud.

55 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-casomorfina-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.

5 Otras variantes de beta-caseína, tales como la beta-caseína B y la beta-caseína 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.

10 La BCM-7 es un péptido opioide y puede activar de manera potente los receptores de opioides en todo el organismo. 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 un vínculo entre el consumo de beta-caseína A1 en la leche y los productos lácteos y la incidencia de ciertas enfermedades incluyendo 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).

15 Se ha especulado que la 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, incluyendo 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 163). 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 un vínculo 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). De manera adicional, 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. Más recientemente, se ha informado que la beta-caseína A1 provoca inflamación del tejido en el tracto gastrointestinal (UI Haq, M.R., *et al.*, *Eur. J. Nutr.*, 2013; Barnett, M.P.G., *et al.*, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2014). Se demostró que la inflamación inducida por la BCM-7 derivada de beta-caseína A1 tiene efectos posteriores en la modificación del ADN epigenético y la expresión génica posterior del tejido afectado (Trivedi, M.S., *et al.*, *J. Nut. Bio.*, 2014).

20 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 función gastrointestinal y los síntomas de intolerancia a la lactosa en particular. Además, ha habido informes anecdóticos (en línea y en los medios de comunicación) de los consumidores que tienen afecciones desconocidas o no confirmadas 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 en cuanto a la causa de cualquier mejora en la función. Además, 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 de la motilidad y la consistencia de las heces, 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.

25 El solicitante ahora ha hallado evidencia científica concluyente para un vínculo directo entre el consumo de beta-caseína A1 y los síntomas de la intolerancia a la lactosa. 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 los síntomas de la intolerancia a la lactosa es sorprendente. Es importante destacar que el solicitante ha hallado evidencia, no sólo de una respuesta aguda y no deseable para el consumo de beta-caseína A1, sino también de una respuesta continua (posterior a la exposición a beta-caseína A1 o BCM-7) en que el consumo de beta-caseína A1, y la producción resultante de BCM-7, puede inducir cambios genéticos en un animal que conducen a menores niveles de lactasa y en consecuencia una probabilidad incrementada de provocar síntomas de intolerancia a la lactosa en la exposición futura a la lactosa.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar una composición para su uso en la reducción o la prevención de los síntomas de intolerancia a la lactosa, o al menos proporcionar una alternativa útil a los procedimientos existentes.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso en la prevención o la reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa en un animal, donde la composición contiene beta-caseína, y donde la beta-caseína comprende al menos 75% en peso beta-caseína A2.

- 5 La cantidad de beta-caseína A2 puede ser cualquier cantidad en el intervalo de 75% a 100% en peso de beta-caseína, por ejemplo, al menos 90% 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. El producto lácteo puede ser crema, yogur, queso quark, queso, mantequilla, helado o cualquier otro producto lácteo.

- 10 Los síntomas de la intolerancia a la lactosa pueden ser, si bien no se limitan a, hinchazón abdominal y calambres, flatulencias, diarrea, náuseas, ruidos del estómago y vómitos.

La respuesta al consumo de la composición por parte el animal puede ser una respuesta aguda y puede inducir de manera adicional una predisposición en el animal a la prevención o la reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa en la exposición futura a la lactosa.

- 15 En la mayoría de las 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 los tiempos de tránsito gastrointestinal en ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

- 20 La Figura 2 muestra la actividad de lactasa en el duodeno en las ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

La Figura 3 muestra la actividad de mieloperoxidasa en el colon de ratas alimentadas con la dieta del Ejemplo 1.

La Figura 4 muestra la absorción de cisteína dependiente de la concentración de morfina y BCM-7 en las células neuronales y las células epiteliales gastrointestinales.

- 25 La Figura 5 muestra la absorción de cisteína dependiente del tiempo en las células neuronales y las células epiteliales gastrointestinales.

La Figura 6 muestra la implicación del receptor μ -opioides en la mediación de los efectos de BCM-7 y la morfina sobre la absorción de cisteína.

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

- 30 Las Figuras 8 y 9 muestran la influencia de BCM-7 en la metilación de CpG en los genes implicados en el metabolismo de la lactosa y la síntesis de la lactosa.

La Figura 10 muestra los niveles de gen LCT, que codifica la lactasa, en el intestino delgado de ratones NOD alimentados con una dieta de beta-caseína A1 o beta-caseína A2 durante 10 y 20 semanas.

Descripción detallada

- 35 La invención se refiere a una composición que contiene la proteína beta-caseína y su uso para la reducción o la prevención de los síntomas de intolerancia a la lactosa. Es importante destacar que la beta-caseína es la variante A2 de beta-caseína, o constituye al menos 75% 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 los síntomas de intolerancia a la lactosa en los seres humanos. El solicitante también ha demostrado que la presencia de proteína de leche que contiene altos niveles de la variante A2 en el duodeno estimula de manera beneficiosa la actividad de la lactasa. Por lo tanto, se puede esperar una mejora en la salud del intestino si se evita el consumo de la variante A1 y en su lugar se consume la variante A2.
- 40

El término "síntomas de intolerancia a la lactosa" de acuerdo con lo utilizado en esta memoria descriptiva pretende significar uno cualquiera o más de una variedad de síntomas que incluyen la hinchazón abdominal y calambres, las flatulencias, la diarrea, las náuseas, los ruidos del estómago y los vómitos, dichos síntomas pueden ser agudos, transitorios o crónicos.

- 45

Se pretende que el término "agudo", de acuerdo con lo utilizado en esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, signifique durante el período de tiempo de consumo de beta-caseína A1 hasta la salida de la beta-caseína A1 o BCM-7 desde el intestino (de manera típica de 8 a 20 horas después del consumo).

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. Después de esto, 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 los síntomas adversos de intolerancia a la lactosa derivados del consumo de beta-caseína A1 por lo tanto también se puede esperar que sea eliminado.

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

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 de los síntomas de la intolerancia a la lactosa. Sin embargo, los síntomas se pueden reducir en cualquier composición en la que la beta-caseína sea predominantemente beta-caseína A2, por ejemplo, cualquier cantidad entre 75% en peso y 100%, incluyendo, pero sin limitación, 80%, 90%, 95%, 98% y 99% en peso.

La composición de la invención de manera típica es leche, pero también puede ser cualquier producto derivado de la leche, tales como crema, 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, incluyendo seres humanos, cabras, cerdos y búfalo, en formas de realización preferidas de la invención, la leche es leche bovina.

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, 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.

El Ejemplo 1 establece la metodología de alimentación para los estudios en ratas de los Ejemplos 2 a 4. Las dietas se muestran en la Tabla 1. La dieta de leche A1 se basa en una formulación en la que toda la beta-caseína en la dieta es beta-caseína A1. La dieta de leche A2 se basa en una formulación en la que toda la beta-caseína en la dieta es beta-caseína A2. La dieta de control se basa en una formulación en la que el contenido de proteína es la clara de huevo.

El Ejemplo 2 describe una investigación sobre el tiempo de tránsito gastrointestinal (GITT, por su sigla en inglés) en ratas alimentadas con las diversas dietas del Ejemplo 1. El dióxido de titanio (TiO₂), que se utiliza como trazador, se administró por vía oral a los animales después de 12 horas de alimentación. La recuperación del TiO₂ se muestra en la Figura 1 como el % de recuperación frente al tiempo (horas). Las ratas alimentadas con la dieta A1 mostraron un retraso en el tránsito en relación con las ratas alimentadas con la dieta A2, ambos grupos muestran retraso en relación con las ratas alimentadas con la dieta de control. Esto es consistente con la beta-caseína A1 que tiene actividad opioide en general más alta que la beta-caseína A2 debido a la liberación de BCM-7. Los síntomas de la intolerancia a la lactosa están vinculados a la fermentación bacteriana de la lactosa en el intestino. El recuento bacteriano durante la fermentación se incrementa de manera exponencial con GITT. Por lo tanto, si la motilidad se reduce por un factor de dos, habrá un incremento de cuatro veces en la tasa de fermentación y, por lo tanto, la manifestación de los síntomas de intolerancia a la lactosa. Por lo tanto, el Ejemplo 2 es evidencia de que una dieta que contiene beta-caseína A1, en relación con una dieta que contiene beta-caseína A2, es más probable que contribuya a un retraso en GITT y dé lugar a los síntomas de intolerancia a la lactosa.

El Ejemplo 3 muestra que la actividad de la lactasa en el duodeno después de que la alimentación aguda (después de 12 horas) se eleva fuertemente en relación con la alimentación crónica (después de 60 horas) para las ratas alimentadas con la dieta A2 al 100%, pero no la dieta A1 al 100%. Esto significa que la beta-caseína A2, y la leche o los productos lácteos que contienen beta-caseína A2, se pueden utilizar para promover la función gastrointestinal saludable y la digestión de la lactosa en la dieta o para aliviar o eliminar los síntomas de intolerancia a la lactosa experimentados cuando se consumen la leche y los productos lácteos. Se cree que las dietas que contienen beta-caseína A2 estimulan la secreción o actividad de la lactasa, pero las dietas que contienen beta-caseína A1 no lo hacen. Lo más probable es que esto sea debido a un efecto diferencial de los productos de digestión de beta-caseína A1 y beta-caseína A2 que tienen en la inflamación del tejido y la función después de la estimulación de la secreción de enzimas por medio de un bolo de proteína de leche que ingresa en el intestino delgado.

El Ejemplo 4 se refiere al 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 opioide), lo cual demuestra que el efecto está mediado a través de la interacción de BCM-7 con los receptores mu-opiáceos. La inflamación del colon provoca un incremento de la susceptibilidad o la sensibilidad a los síntomas de intolerancia a la lactosa.

El Ejemplo 5 indica que la BCM-7 puede inhibir la absorción de cisteína de una manera dependiente de la concentración. La morfina mostró mayor eficacia que la BCM-7 con valores de IC50 de 0,16 y 1,31 nM (respectivamente) en las células neuronales y 6,38 y 15,95 nM (respectivamente) en las células epiteliales gastrointestinales (Figura 4). La inhibición de la absorción de cisteína se desarrolló por completo después de 30 minutos y se mantuvo durante 48 horas desde la exposición a la morfina o BCM-7 (Figura 5). Esto indica un efecto crónico a largo plazo sobre la absorción de cisteína después de una única exposición a BCM-7. El bloqueo en presencia de un μ -antagonista selectivo y no un receptor opioide delta mostró que estos efectos fueron mediados por el receptor μ -opioide.

Se ha informado que los péptidos derivados de alimentos alteran el metabolismo redox incluyendo los niveles de glutatión que pueden regular los niveles de S-adenosilmetionina (SAM) en las células. SAM es el donante de metilo universal para la mediación de los cambios de metilación del ADN. Estos cambios son parte de la memoria reguladora epigenética y pueden regular los niveles de expresión génica para mantener la homeostasis. Es importante destacar que estos cambios pueden ser muy estables y tienen el potencial de interferir con la expresión/represión de genes y por lo tanto alterar de manera permanente los niveles de genes. Por consiguiente, los niveles de glutatión pueden impactar en las vías en las que los genes desempeñan un papel importante, tales como la síntesis y el metabolismo de las vías de lactosa. Por lo tanto, los cambios epigenéticos inducidos por BCM-7 a través de la vía de señalización basada en redox pueden afectar a los genes reguladores responsables de la síntesis de lactosa y el metabolismo y por lo tanto afectan los niveles de lactosa en el organismo. El organismo está sintonizado para absorber, metabolizar, despejar o almacenar un cierto nivel total de lactosa. Si el nivel es alterado bajo la influencia de BCM-7, la capacidad del organismo para regular los niveles de lactosa puede estar saturada y por lo tanto inducir efectos subclínicos o clínicos fisiopatológicos posteriores.

El Ejemplo 6 muestra que la BCM-7 y la morfina provocan disminuciones en función del tiempo, tanto en los niveles de glutatión (GSH) como de cisteína. Los niveles intracelulares de cisteína en las células neuronales y el estado redox de las células (que se refleja por la relación de GSH a su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG)), también se redujeron (Figura 6), lo que indica la posibilidad de una condición de estrés oxidativo. Además, la capacidad de metilación (indicada por la relación SAM/SAH) también se vio afectada por el tratamiento de BCM7 en diferentes puntos de tiempo (Figura 7). Por lo tanto, BCM-7 induce una reducción en los principales niveles de antioxidantes intracelulares, de manera específica los niveles de GSH. Se sabe que los niveles de GSH reducidos inducen modificaciones de la cromatina a través de la vía de señalización de estrés oxidativo por medio de la regulación de los niveles de SAM.

El Ejemplo 7 investiga los niveles de metilación del ADN inducidos por BCM-7. La Figura 8 muestra los cambios de metilación del ADN en MPO, uno de los genes responsables de la mediación de la respuesta inflamatoria influenciada por BCM-7. Los cambios en el estado redox se muestran para provocar cambios a largo plazo en el estado epigenético de los genes inflamatorios. Esto es equivalente a una memoria de los insultos moleculares, que potencialmente contribuyen a los cambios crónicos a largo plazo y las respuestas inflamatorias a la intolerancia a la lactosa. Por lo tanto, 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, sino que también altera el estado epigenético del gen MPO y por lo tanto tiene un efecto continuo y a largo plazo sobre la síntesis de lactosa y el metabolismo. Los efectos posteriores de niveles de lactosa alterados pueden incluir la disfunción gástrica y problemas digestivos. De acuerdo con lo indicado en la Figura 9, BCM-7 altera el estado epigenético de enzimas tal como la lactasa que está implicada en el metabolismo de la lactosa y la degradación. Esto puede conducir a niveles de lactosa acumulados, y concentraciones reguladas de lactosa que pueden o no puede ser tolerables dependiendo del individuo. Si no son tolerables, se pueden esperar cambios en las funciones digestivas y la inflamación del intestino.

La BCM-7 también afecta a las enzimas implicadas en la función digestiva de acuerdo con lo mostrado en la Tabla 4. B4GALT2, LGALS12 y B4GALT1 son genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de la galactosa. La galactosa es un producto intermedio importante en la síntesis de lactosa. De manera similar, GKN1, GALK2, GALR2, GALT, y GALR1 codifican enzimas que están implicadas en la regulación de los niveles de galactosa y por lo tanto indirectamente regulan los niveles de lactosa. Los cambios en la actividad de estas enzimas pueden conducir de manera indirecta a los cambios en los niveles de lactosa. BCM-7 altera la actividad enzimática de estas enzimas por medio de la regulación del estado epigenético de estos genes. Esta es mediada por la regulación mecánica del estado redox. Estos cambios en última instancia sesgan los niveles de lactosa, no sólo en la etapa aguda, sino que también podrían tener un efecto a largo plazo debido a los cambios epigenéticos que incluso pueden pasar a la próxima generación.

La BCM-7 no sólo media cambios en la síntesis de lactosa y el metabolismo, sino que también puede regular la actividad y los niveles de enzimas que intervienen en los procesos digestivos y la función intestinal. Se demostró que los genes para enzimas tales como la colecistoquinina, la motilina, la secretasa, y la oxitocina tienen un estado de epigenética alterado influenciado por BCM-7. Esto impactaría directamente en las funciones gastrointestinales y las capacidades digestivas de un individuo. Por lo tanto, BCM-7 podría contribuir a los síntomas de la alteración de la motilidad intestinal, las alteraciones digestivas, las flatulencias y la diarrea, todos los cuales son síntomas de la intolerancia a la lactosa.

Los efectos posteriores de cambios epigenéticos en los niveles de enzimas de lactasa se confirmaron posteriormente en investigación sobre los niveles de ARNm en qPCR (Ejemplo 8). Los ratones NOD se alimentaron con dietas enriquecidas con beta-caseína-A1 o beta-caseína A2 posteriormente al destete. Luego de la eutanasia se diseccionaron y se recogieron muestras intestinales. Se aisló el ARN de estas muestras y se llevó a cabo PCR por el uso de cebadores específicos para los niveles de enzimas de lactasa en el intestino delgado. De acuerdo con lo indicado en la Figura 10, los niveles de ARNm de enzimas de lactasa fueron mayores en el intestino delgado de los ratones alimentados con la dieta de beta-caseína A2 durante 10 y 20 semanas en comparación con los niveles de ARNm de lactasa en el intestino delgado de los ratones alimentados con la dieta de beta-caseína A1 durante los mismos períodos de tiempo. Al tener altos niveles de la enzima lactasa, los ratones alimentados con beta-caseína A2 desactivarían la lactosa del sistema digestivo y sólo permitirían que un cierto nivel de lactosa esté disponible. Por lo tanto, se evitan los síntomas asociados con la intolerancia a la lactosa. Por el contrario, al tener niveles más bajos de ARNm de lactasa en el intestino delgado, los ratones alimentados con la dieta de beta-caseína A1 pueden permitir que se acumulen niveles más altos de lactosa y por lo tanto provocar síntomas de intolerancia a la lactosa.

Estos estudios representan la primera evidencia clara científica de una relación entre el consumo de beta-caseína A1 y los síntomas de intolerancia a la lactosa, y, de manera adicional, que el consumo de beta-caseína A2 (en relación con el consumo de beta-caseína A1) induce una predisposición beneficiosa para la prevención o la reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa en una futura exposición a la lactosa. Con anterioridad, los informes y los estudios anecdóticos no concluyentes y contradictorios relacionados con BCM-7 (en lugar de beta-caseína A1 en sí misma) habían llevado a la confusión entre aquéllos con experiencia en la técnica, muchos creyeron que no había tal enlace. A través de la conclusión del solicitante, se proporciona una posible solución alternativa a los problemas que han sufrido muchas personas que se consideraban a sí mismas como intolerantes a la lactosa, es decir, con la evitación de la beta-caseína A1 en la dieta. Esto se puede lograr por medio de la obtención de leche que tiene un contenido de beta-caseína que es predominantemente beta-caseína A2 y la producción de productos derivados de esa leche, y la fabricación de tal leche y tales productos para su disponibilidad para el propósito de la reducción o la prevención de los síntomas de la intolerancia a la lactosa.

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 los procedimientos existentes para evitar los síntomas de intolerancia a la lactosa. La mayoría de los procedimientos existentes se basan en modificaciones en la dieta, muchas de las cuales a menudo tienen un éxito limitado o ningún éxito real. La presente invención proporciona una solución que es relativamente fácil de manejar, es decir, la evitación de leche o productos lácteos que contienen beta-caseína A1 y la aseguración de que la leche y los productos lácteos en la dieta contengan beta-caseína que es predominantemente beta-caseína A2, con preferencia 100% en peso de beta-caseína A2. La invención evita cualquier necesidad de modificaciones dietéticas al por mayor, tal como la evitación de 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.

De acuerdo con lo utilizado en esta 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”.

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

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.

5

Tabla 1: Composición de las dietas

Producto	Dieta de leche A1		Dieta de leche A2		Dieta de control	
	g	kcal	g	kcal	g	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
Claros de huevo (secadas)	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

Ejemplo 2: Tiempo de Tránsito Gastrointestinal

El tiempo de tránsito gastrointestinal (GIT) se midió en ratas alimentadas de acuerdo con el Ejemplo 1. Se utilizó dióxido de titanio (TiO₂) como un trazador administrado por vía oral a los animales después de 12 horas de la alimentación de la dieta de 100% de A1, la dieta de 100% de A2, o la dieta de control. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1. Los datos de recuperación se representan como el % de recuperación de TiO₂ frente al tiempo (horas). Las ratas alimentadas con la dieta A1 mostraron un retraso en tránsito en relación con las ratas alimentadas con la dieta A2, ambos grupos muestran un retraso en relación con las ratas alimentadas con la dieta de control.

10

Tabla 2: Tiempos de tránsito GI

	Tiempo	Control	SD	A1	SD	A2	SD
1	0,001	0,002	0,171	0,406	0,001	0,002	
2	0,006	0,011	0,514	1,218	0,011	0,024	
3	0,028	0,047	0,522	1,221	0,033	0,043	
4	0,029	0,046	1,189	2,854	0,056	0,036	
5	0,064	0,071	5,624	13,713	2,048	4,162	
6	0,758	1,196	10,343	17,419	22,188	19,698	
7	37,605	28,549	53,530	15,513	61,024	11,983	
8	41,716	28,082	55,296	18,084	62,482	13,170	

15

Ejemplo 3: Actividad de Lactasa

Se homogeneizaron muestras de tejido del duodeno en polvo congeladas en agua desionizada helada (1:5 peso/vol), después se centrifugaron a 2.200g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se diluyó de manera adicional (1:25) con agua desionizada. Las muestras se incubaron con lactosa y la glucosa liberada se determinó por el uso de un kit de glucosa-oxidasa (Sigma) y se midió con un lector de microplacas. La Tabla 3 y la Figura 2 muestran los resultados para la lactasa duodenal tanto para los grupos de ratas alimentados de manera aguda (12 horas) como crónica (60 horas). La actividad de la lactasa duodenal fue elevada en grupos alimentados con A2 aguda, en relación con los grupos alimentados con A2 crónica y a ambos grupos alimentados con A1 aguda y crónica.

20

Tabla 3: Actividad de la lactasa para los grupos alimentados agudos y crónicos

	Lactasa en el duodeno (fkatal/ug de proteína)	Desv. Est.
A1 12	8,94	3,87
A1 60	7,35	2,19
A1 12 N	8,99	3,86
A1 60 N	8,42	2,59
A2 12	35,97	32,23
A2 60	8,45	1,92
A2 12 N	6,55	2,76
A2 60 N	sin datos	sin datos

Ejemplo 4: Actividad de MPO

5 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 procedimiento 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 del sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina medido colorimétricamente a 562 nm. La actividad se normalizó por medio de una determinación de proteínas de ácido bicinonínico (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 3. En relación con los animales alimentados con A1 los animales alimentados con A2 demostraron un nivel significativamente menor de actividad de MPO después de la alimentación aguda. Esto fue persistente e incrementó de manera adicional con la alimentación crónica y fue completamente reversible por la administración oral de naloxona.

Ejemplo 5: Efecto de BCM-7 sobre la Absorción de Cisteína

15 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 beta-caseína A1, y se comparó con los controles no tratados, así como también contra la 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). 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 microcentrífuga, 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 4, 5 y 6. El símbolo * utilizado en estas figuras indica una diferencia estadísticamente significativa (p <0,05) en comparación con el control no tratado, y el símbolo # indica una diferencia estadísticamente significativa (p <0,005) en comparación con el control no tratado.

Ejemplo 6: Efecto de BCM-7 en los Niveles de GSH y SAM

35 Este ejemplo investigó si las disminuciones de la absorción de cisteína de acuerdo con lo observado en el Ejemplo 5 se podrían traducir en cambios del GSH y afectar a los niveles de antioxidantes. Los niveles intracelulares de GSH se midieron con BCM-7, así como también con morfina para diferentes momentos (30 min, 4 h, 24 h) por el uso de HPLC y un procedimiento de detección de gradiente electroquímico (Hodgson *et al.*, *J. Alzh. Dis.* 2013, Trivedi M., *et al.*, *Mol. Pharm.* 2014). 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 microcentrífuga 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 microcentrífuga. Se añadieron 100 µl de cada 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 cada una de estas muestras se inyectaron en el sistema de HPLC.

La separación de redox y la metilación metabolitos de la vía se llevó a cabo por el uso de una columna Agilent Eclipse XDB-C8 analítica (3 X 150 mm; 3,5 µm) y una columna de guarda Agilent Eclipse XDB-C8 (4,6 X 12,5 mm; 5 µm). Se utilizaron dos fases móviles. Fase Móvil A: 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. 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 utilizado es 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 7: Efecto de BCM-7 en los Niveles de Metilación del ADN

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.

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 pb. 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 µg se cargó en 130 µl 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 µg se concentró en un evaporador rotatorio a 25 µl 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 pb +/-50 pb 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, y 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.

El ADN del genoma completo MBD-seq reveló transcriptos de promotor diferencialmente metilados (DMT), de acuerdo con lo definido por la tasa de falso descubrimiento (FDR, por su sigla en inglés) < 0,1 y ANOVA seguido por la prueba t de Student post-hoc (p < 0,05). Los transcriptos incluyen tanto los genes como los ARN no de codificación que eran diferencialmente metilado/transcriptos. 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, por su sigla en inglés) y se identificaron las vías que presentan el más alto impacto. Los resultados se muestran en la Tabla 4. También se informan los cambios en el estado epigenético de genes responsables del metabolismo de la lactosa y la síntesis de la lactosa a ser alterada bajo BCM7, de acuerdo con lo mostrado en la Figura 8 y 9.

Tabla 4: Lista de Transcriptos Diferencialmente Metilados bajo la influencia de BCM-7

Ontología Funcional / Ontología de Genes					
	Digestión	Metabolismo de lactosa	Vía biosintética de Lactosa	Secreción de Ácido Gástrico	Metabolismo de galactosa
1	AKR1C1	LCT	B4GALT2	PGC	GKN1
2	AKR1C2		LGALS12	SCTR	GALK2
3	Cckbr		B4GALT1	OXTR	GALR2
4	HTR3A			VIPR1	GALT
5	MLNR			SST	GALR1
6	SLC15A1			PPARGC1A	CHST1
7	CTRB2				NPY
8	CTRB1				PYY
9	MEP1B				
10	SULT2A1				
11	CELA3A				
12	AMY1C				
13	CTSE				
14	CCKAR				
15	CAPN9				

Ejemplo 8: Efecto de BCM-7 en los niveles de lactasa en el intestino delgado

5 Se iniciaron ratones NOD (macho y hembra) en una dieta enriquecida en proteína de la leche beta-caseína A1 o A2 desde el destete. Estas dietas fueron hechas por Specialty Feeds Pty. Ltd. (Australia) para asegurar una composición y una nutrición adecuada. Las cohortes de ratones (n = 10) de cada género y la dieta fueron sacrificados a las 10 semanas o 20 semanas. En el momento las muestras de tejido de disección se recogieron y almacenaron a -80 °C en RNAlater™. 40 ratones NOD fueron seguidos en este estudio: 10 por grupo (macho/hembra: A1/A2).

10 El ARN a partir del cultivo de células para el análisis de la transcripción del ARN se aisló por el uso del kit RNAqueous®-4PCR de Ambion (Austin, TX). El procedimiento fue mismo que el descrito por el protocolo del fabricante. El ARN aislado se trató con DNasa para purificar el ARN seguido por la cuantificación de ARN por el uso de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. El ADNc se sintetizó de acuerdo con lo descrito previamente por el uso de la síntesis de ADNc de primera cadena de Roche (Indianápolis, IN). ARN (1 mg), mezcla de dNTP (1 mM), cebadores aleatorios de hexámero (60 mM), con suficiente H₂O de grado de biología molecular, se añadieron para lograr un volumen de muestra final de 13 ml. Cada muestra se desnaturalizó a 65 °C durante 5 minutos y después se colocó en hielo. Se añadieron Transcriptor RT (20 unidades/ml) (Roche), inhibidor de RNasa Protector (40 U/μl) (Roche), 5

15 Tampón de Reacción de Transcriptasa Inversa Transcriptor (Roche), y H₂O de calidad de biología molecular, y el volumen final se ajustó a 20 ml. Esto fue seguido por la incubación en un PTC termociclador (MJ Research, St. Bruno, QC, Canadá) a 25 °C durante 10 minutos y 55 °C durante 30 minutos. Por último, la enzima transcriptasa inversa fue

20 inhibida por la incubación a 85 °C durante 5 minutos.

El ensayo de qRT-PCR se llevó a cabo en muestras por triplicado por el uso de una máquina de qRT-PCR LightCycler 480 de Roche (Trivedi *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2014). qRT-PCR se llevó a cabo con 5 ml de plantilla de ADNc, 10 mM de cebadores sentido y antisentido, 10 ml de SYBR Green I Master de Roche, así como también dH₂O en un volumen final de 20 ml. Los cebadores utilizados para este fin fueron 5'-GGAGTGTACCCACAGACAG-3' directo y 5'-GAACACAAGCTACACG-GGA-3' inverso. Las muestras se pusieron a través del siguiente protocolo: incubación durante 5 minutos a 95 °C, y luego 45 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 20 segundos, y 72 °C durante 30 segundos, seguido por un único ciclo de 95 °C durante 5 segundos, 1 minuto a 65 °C, y 97 °C para la curva de fusión, seguido por enfriamiento a 40 °C durante 90 segundos. No se llevaron a cabo controles de plantilla (NTC, por su sigla en inglés) en la placa, y se generaron las curvas de disociación para determinar los productos no específicos y esto se normalizó para evitar cualquier amplificación no específica. Los datos se analizaron por el uso del procedimiento de cuantificación Roche D(DCt) y se normalizaron a los niveles de beta-actina. Los resultados se muestran en la Figura 10.

25

30

Si bien la invención se ha descrito a modo de ejemplo, se debe apreciar que se pueden hacer variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención de acuerdo con lo definido en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención o la reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa en un animal, en la que la composición contiene beta-caseína, y en la que la beta-caseína comprende al menos un 75% 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 un 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 el 100% en peso de beta-caseína A2.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es leche o un producto lácteo.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la leche es 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.
- 15 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el producto lácteo es crema, yogur, queso quark, queso, mantequilla o helado.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que los síntomas de intolerancia a la lactosa incluyen uno o más de hinchazón abdominal y calambres, flatulencias, diarrea, náuseas, ruidos del estómago y vómitos.
- 20 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la prevención o la reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa es una respuesta aguda al consumo de la composición por parte del animal.
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición predispone al animal a la prevención o la reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa en la exposición futura a la lactosa.
- 25 10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el animal es un ser humano, un perro o un gato.

Figura 1

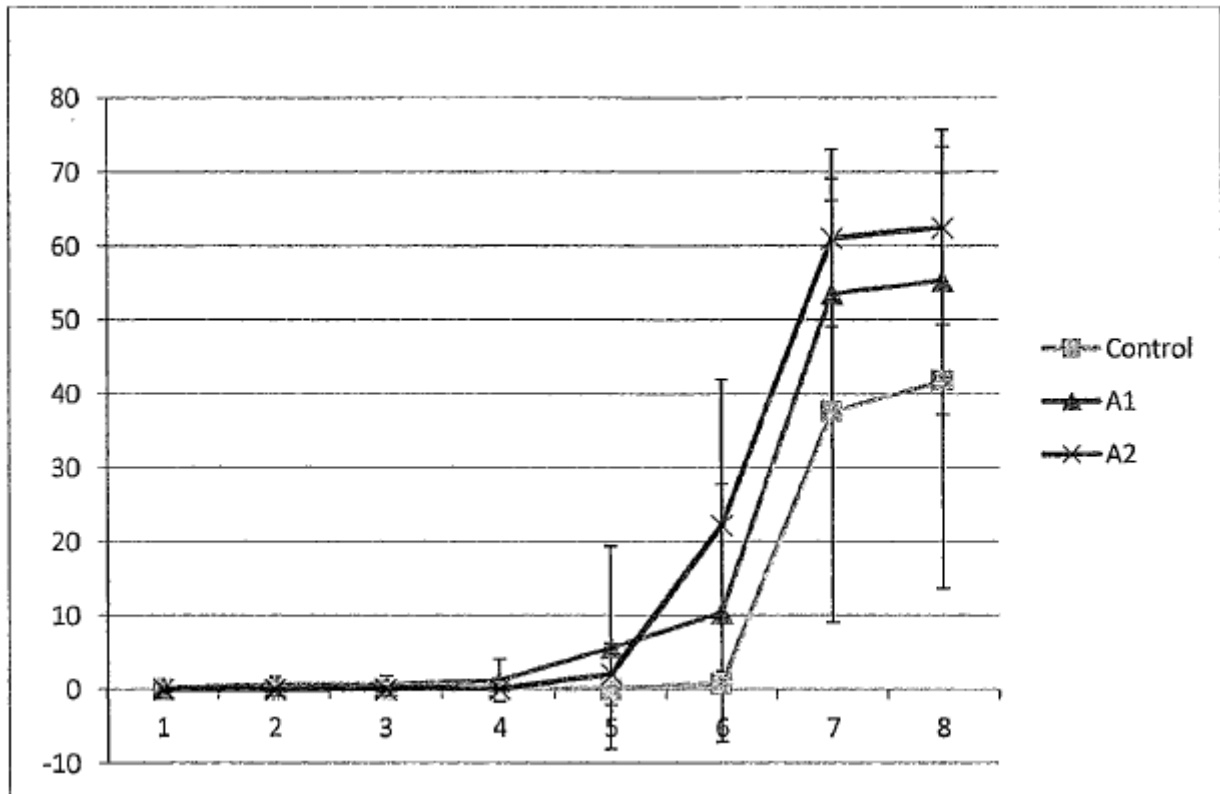


Figura 2

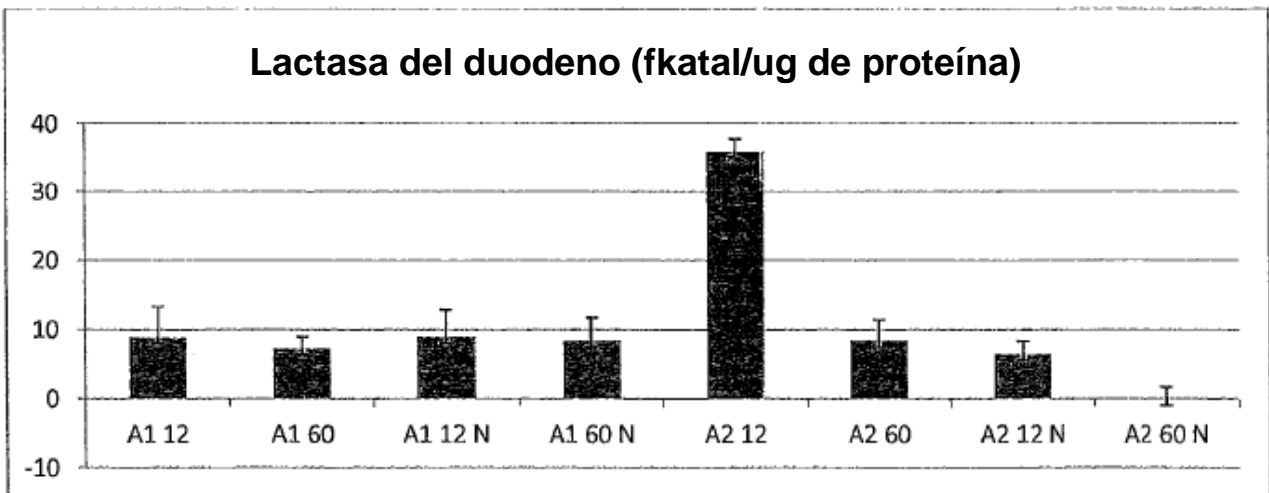


Figura 3

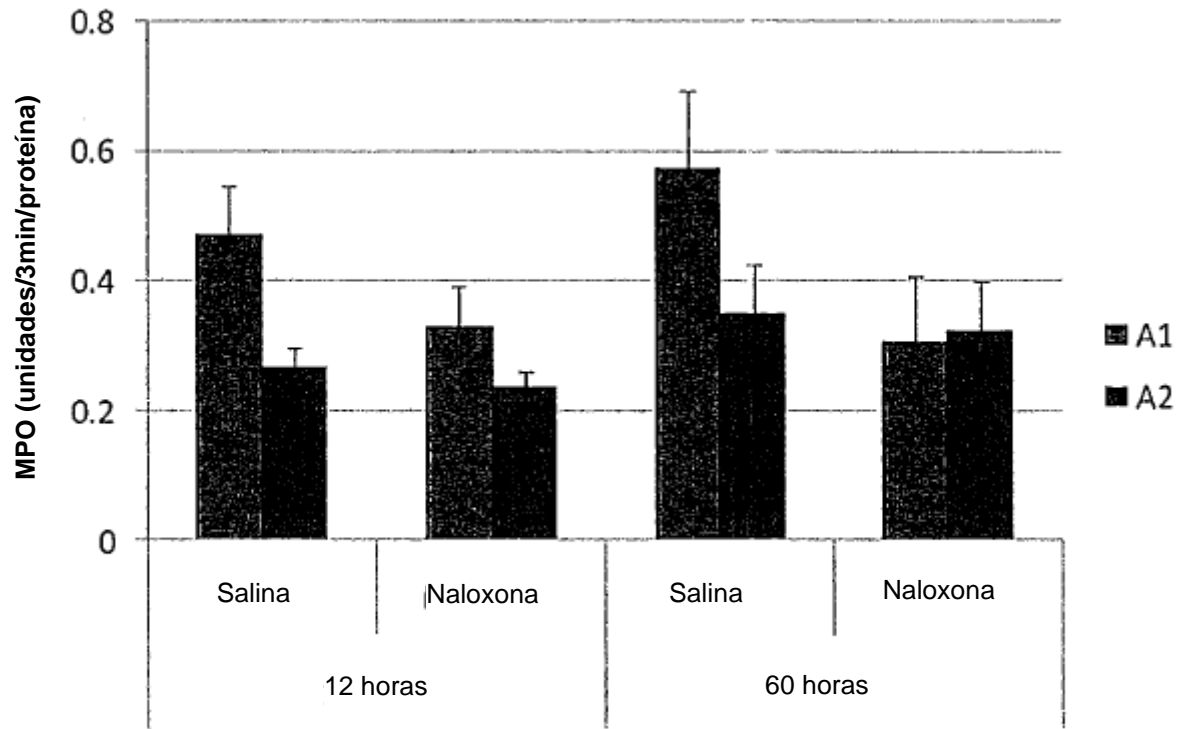
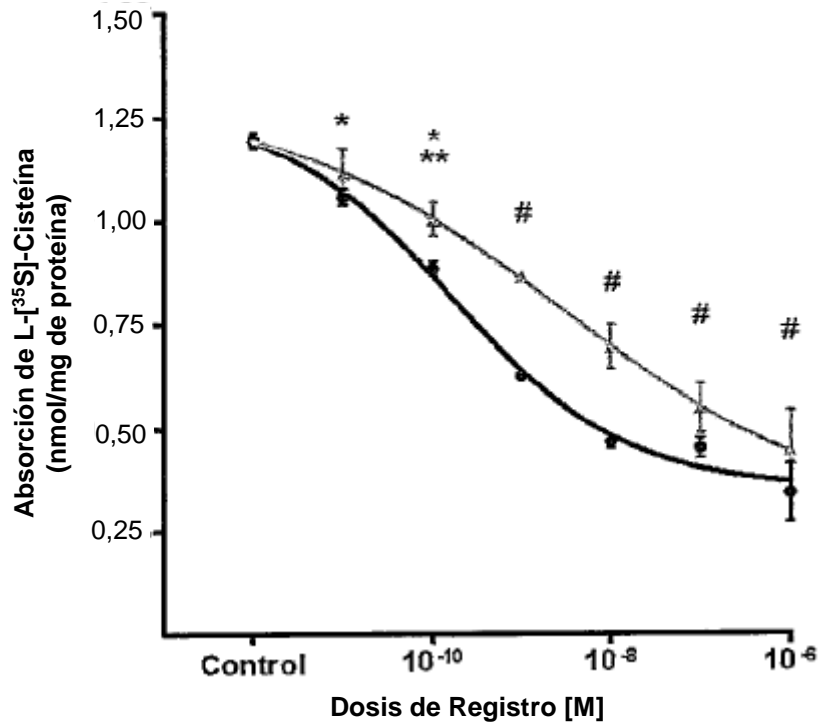


Figura 4

Células neuronales;



Células epiteliales gastrointestinales

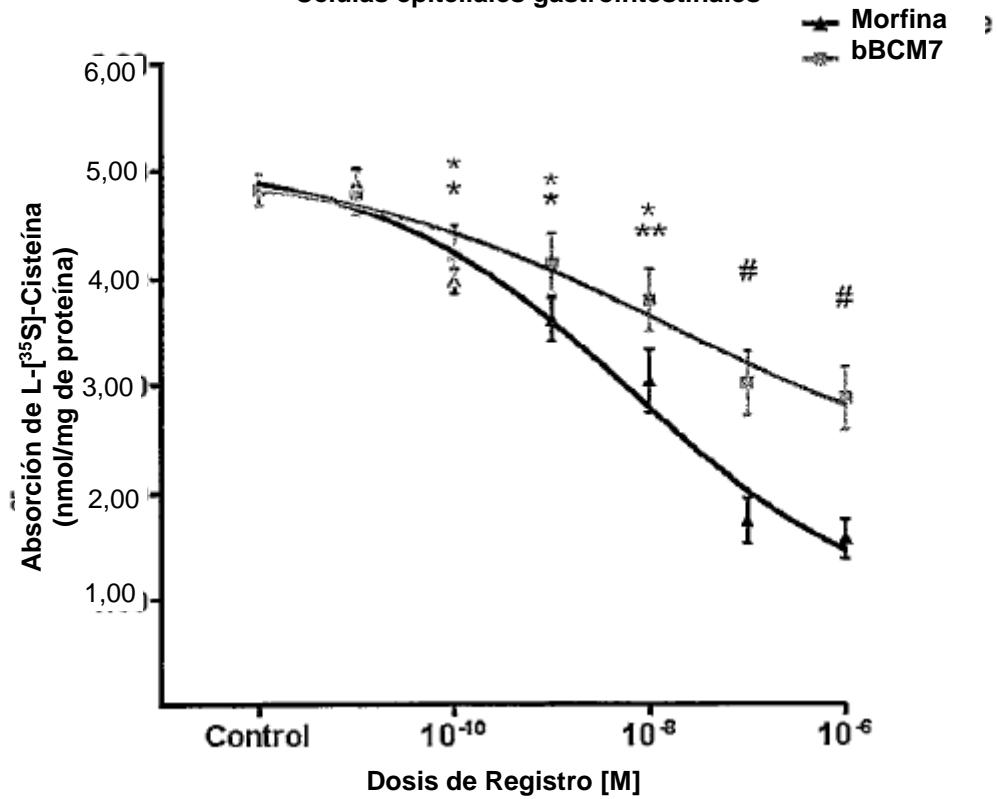


Figura 5

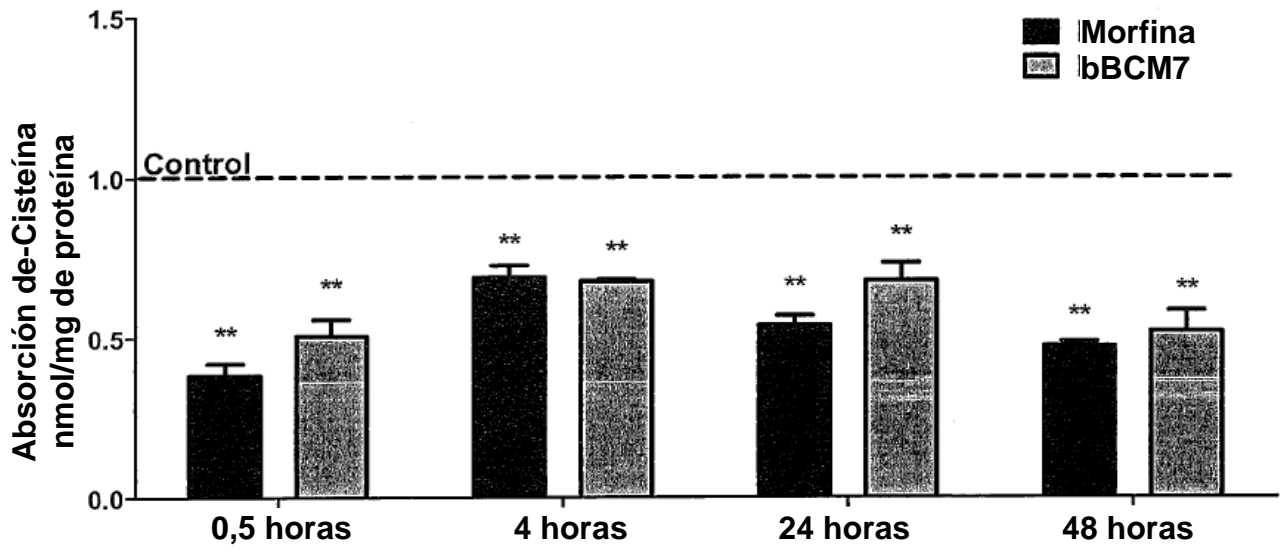


Figura 6

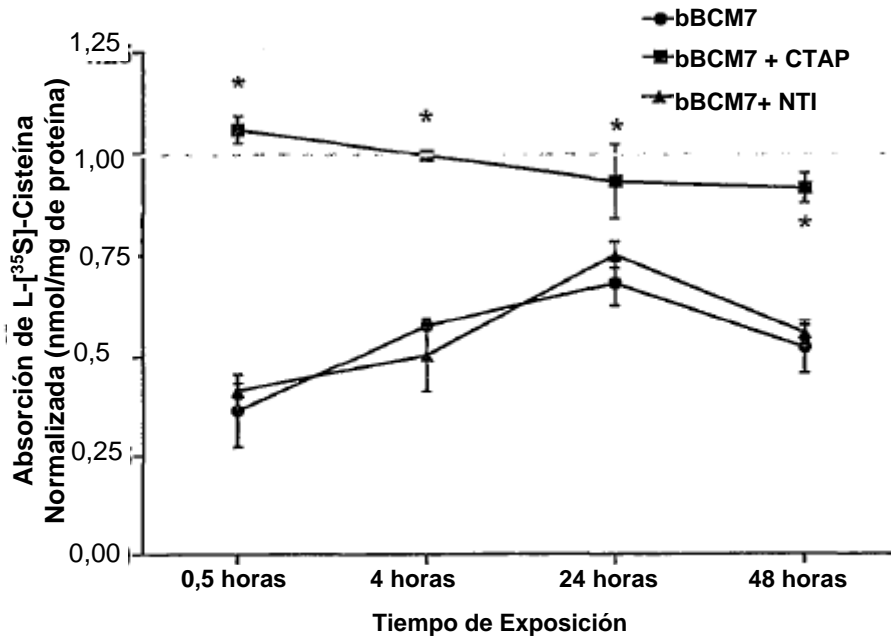
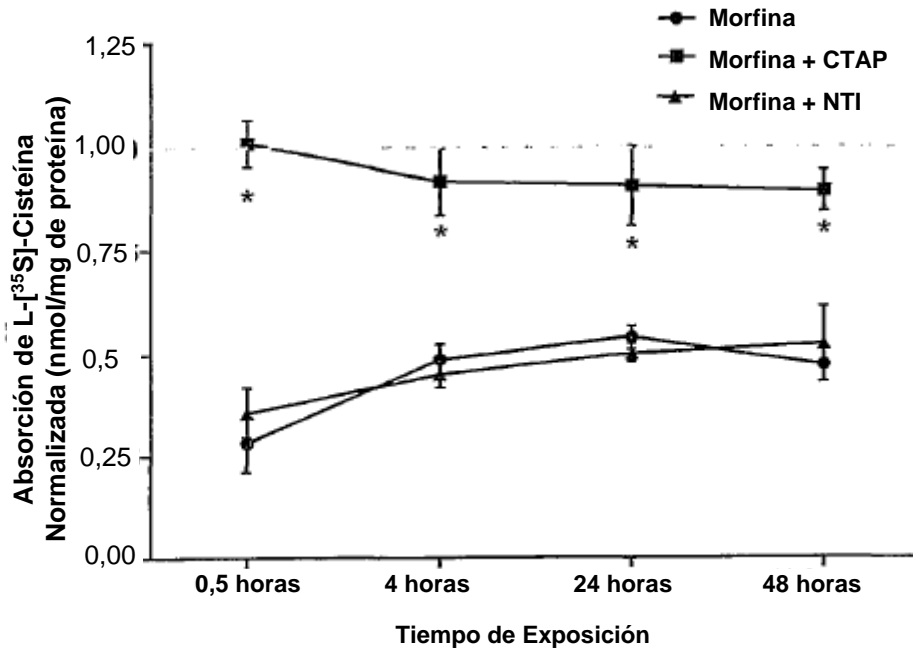
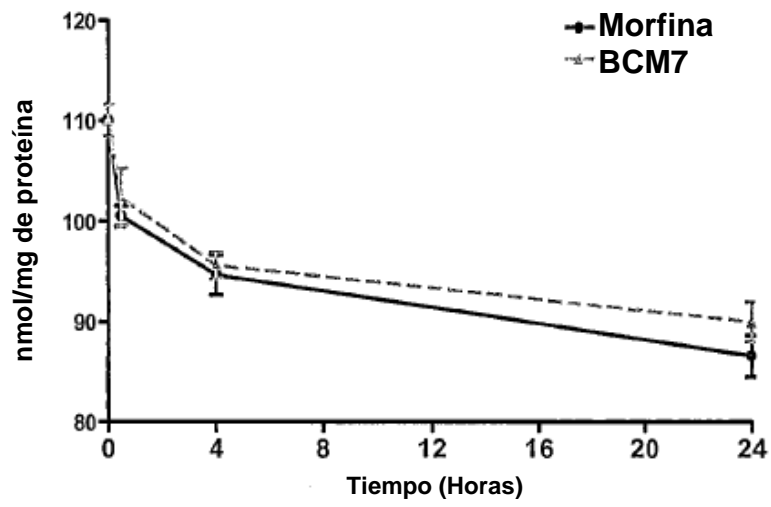
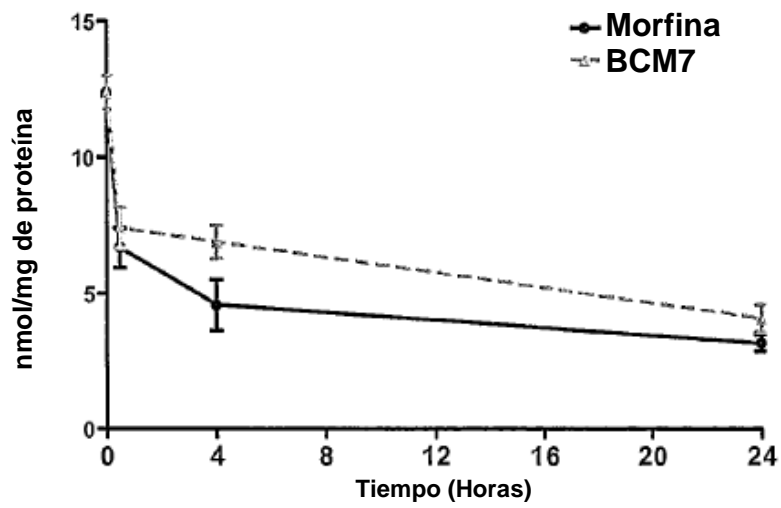


Figura 7

Cisteína



GSH/GSSG



SAM/SAH

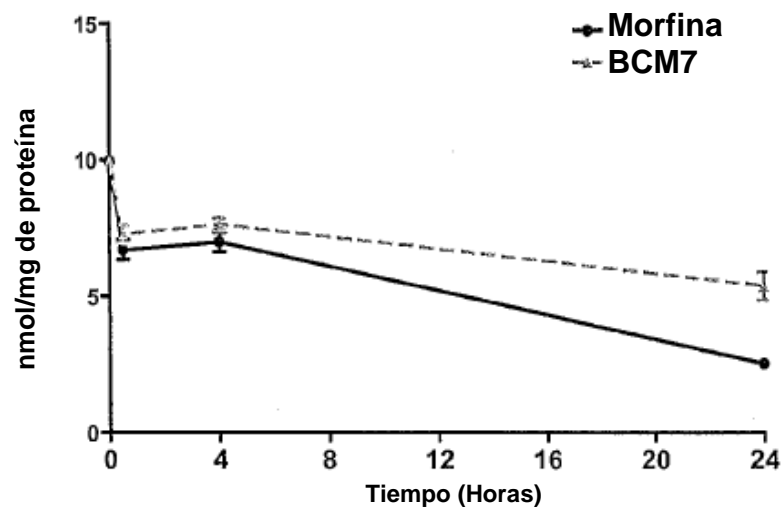


Figura 8

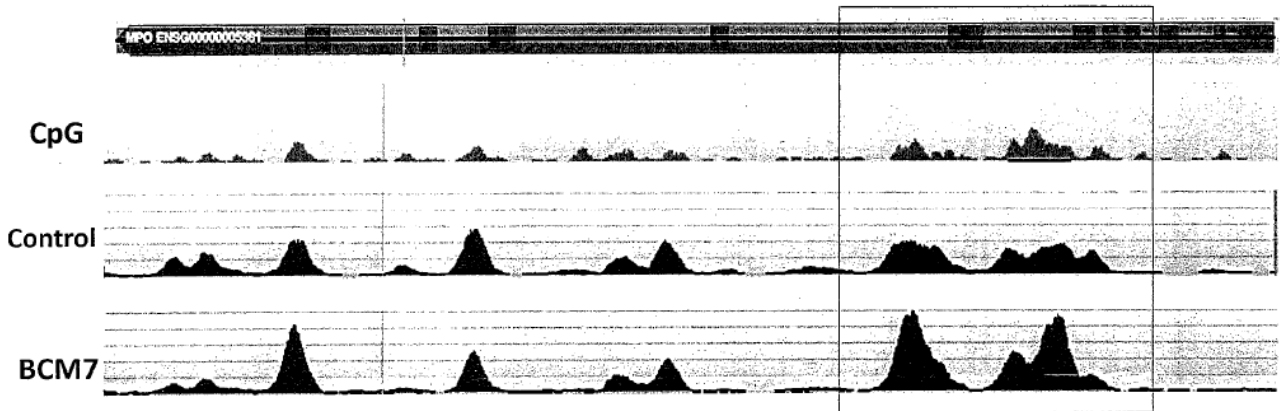


Figura 9

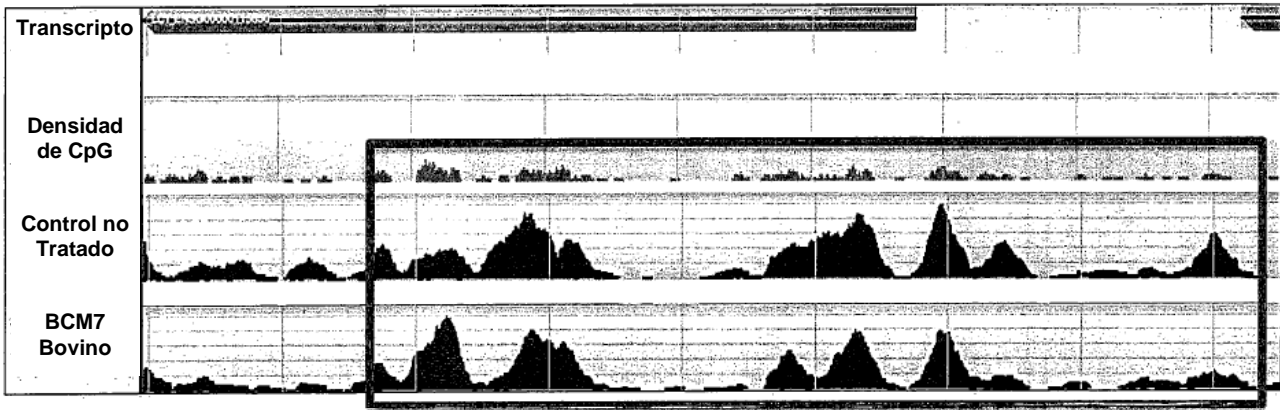


Figura 10

