

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 268**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2016 PCT/IB2016/051923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2016 E 16715899 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 3302517**

54 Título: **Composiciones alimenticias para inducir la saciedad y prolongar la saciedad en sujetos que lo necesitan**

30 Prioridad:

05.06.2015 WO PCT/IB2015/001126

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
ROUEN (25.0%);
UNIVERSITE DE ROUEN (25.0%) y
TARGEDYS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**FETISSOV, SERGUEÏ;
DECHELOTTE, PIERRE;
BRETON, JONATHAN;
LAMBERT, GREGORY y
LEGRAND, ROMAIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 835 268 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

Composiciones alimenticias para inducir la saciedad y prolongar la saciedad en sujetos que lo necesitan

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN:

La presente invención se refiere a procedimientos no terapéuticos para inducir la saciedad y prolongar la saciedad en sujetos que lo necesitan.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

La composición de la microbiota intestinal se ha asociado con fenotipos metabólicos del huésped (Ley y col., 2006) y la transferencia de microbiota "obesa" puede inducir adiposidad (Turnbaugh y col., 2006) e hiperfagia (Vijay-Kumar y col., 2010), lo que sugiere que la microbiota intestinal puede influir en el comportamiento de alimentación del huésped.

- 15 Aunque se desconocen los mecanismos subyacentes a los efectos de las bacterias intestinales sobre el apetito del huésped, es probable que utilicen vías moleculares del huésped que controlan la ingesta de alimentos.

- El modelo actual de control de la ingesta de alimentos implica que las hormonas del hambre y la saciedad derivadas del intestino envían señales a varios circuitos cerebrales que regulan los aspectos homeostáticos y hedónicos de la alimentación (Berthoud, 2011; Inui, 1999; Murphy y Bloom, 2006). Entre ellas destacan las vías anorexigénicas y orexigénicas que se originan en el núcleo arqueado hipotalámico (ARC) que incluyen las neuronas proopiomelanocortina (POMC) y neuropéptido Y (NPY)/proteína relacionada con agutí (AgRP), respectivamente, transmitidas en el núcleo paraventricular (PVN) (Atasoy y col., 2012; Cowley y col., 1999; Garfield y col., 2015; Shi y col., 2013). Las vías ARC y PVN convergen en el núcleo parabraquial lateral que envía proyecciones anorexigénicas a la amígdala central (CeA), expresando el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Carter y col., 2013; Garfield y col., 2015).

- Los supuestos mecanismos del efecto de la microbiota intestinal sobre el control del apetito del huésped pueden involucrar sus actividades de recolección de energía (Turnbaugh y col., 2006) y la producción de transmisores neuroactivos y metabolitos (Dinan y col., 2015; Forsythe y Kunze, 2013; Sharon y col., 2014). Los inventores evidenciaron una implicación de proteínas bacterianas que actúan directamente sobre las vías de control del apetito localmente en el intestino o sistémicamente. De hecho, se ha demostrado que varias proteínas bacterianas presentan homología de secuencia con hormonas peptídicas que regulan el apetito (Fetissov y col., 2008), y recientemente se identificó la proteína ClpB producida por *Escherichia coli* (*E.coli*) comensal intestinal como un antígeno-mimético de hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH) (Tennoune y col., 2014). La α -MSH es un neuropéptido derivado de POMC que desempeña un papel clave en la señalización de la saciedad mediante la activación de los receptores de melanocortina 4 (MC4R) (Cone, 2005). Aunque los efectos anorexigénicos de α -MSH mediados por MC4R se han atribuido principalmente a sus sitios centrales de acción (Mul y col., 2013), un estudio reciente mostró que la activación de MC4R en las células enteroendocrinas intestinales estimula la liberación de hormonas de saciedad péptido-1 (GLP-1) y péptido YY (PYY) similares al glucagón (Panaro y col., 2014). Por tanto, las moléculas similares a α -MSH derivadas de bacterias intestinales pueden actuar directamente sobre las células enteroendocrinas sintetizando hormonas de saciedad.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN:

- La presente invención se refiere a un procedimiento no terapéutico cosmético para reducir la relación masa magra a grasa en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar por vía oral al sujeto de una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una cantidad efectiva de una bacteria que exprese la proteína ClpB; donde la proteína ClpB comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con SEQ ID NO:1. En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN:

- Los inventores han demostrado que la proteína ClpB o una bacteria que expresa la proteína ClpB es capaz de inducir la saciedad, prolongar la saciedad, reducir la ingesta de alimentos, controlar el aumento de peso, estimular la pérdida de peso y/o reducir la masa grasa en la relación masa magra a grasa en un sujeto que lo necesite. Los inventores han demostrado sorprendentemente que la proteína ClpB expresada por dicha bacteria tenía una acción directa sobre la saciedad, la saciedad y la ingesta de alimentos, probablemente a través de los receptores MCR, independientemente de cualquier reacción inmunitaria que pudiera ser inducida por la administración de la bacteria.

- La presente invención se refiere al uso no terapéutico cosmético de una proteína ClpB o de una bacteria que expresa la proteína ClpB para reducir la masa grasa en la relación masa magra a grasa en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un peso normal o tiene sobrepeso sin complicaciones.

- Los procedimientos de la presente invención están destinados a seres humanos, mascotas o ganado, mientras que las mascotas o el ganado pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en perros, gatos, cobayas, conejos,

cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos y/o aves de corral. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto de sexo masculino o femenino.

"Obesidad" se refiere en esta invención a una afección médica donde el sujeto preferiblemente tiene un IMC de >30.

- 5 El "IMC" o "índice de masa corporal" se define como la masa corporal del sujeto dividida por el cuadrado de su altura. Las fórmulas utilizadas universalmente en medicina producen una unidad de medida de kg/m².

Un sujeto es moderadamente obeso. Un sujeto "moderadamente obeso" se refiere a un sujeto con un IMC de entre 30 y 35.

10

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un índice de masa corporal de entre 18,5 y 30.

De acuerdo con la invención, el sujeto no es obeso. Normalmente, el sujeto no obeso tiene un peso corporal normal.

"Peso corporal normal" se refiere en esta invención al peso corporal que resulta en un IMC de entre 18,5 y 25.

15

En algunas realizaciones, el sujeto tiene sobrepeso. "Sobrepeso" se refiere en esta invención al peso corporal que resulta en un IMC de entre 25 y 30. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto con un sobrepeso saludable o un sobrepeso sin complicaciones. Por sujeto con "sobrepeso saludable" o "sobrepeso sin complicaciones" se entiende en esta invención un sujeto con sobrepeso que no presenta ninguna enfermedad o afección directamente asociada con su peso.

20

En algunas realizaciones, el sujeto está bajo una dieta hipocalórica y/o quiere perder peso. En otras realizaciones, el sujeto no se encuentra bajo una dieta hipocalórica y/o no quiere perder peso.

25

Como se usa en esta invención, el término "saciedad" pretende referirse a un estado esencialmente homeostático donde un individuo siente que sus antojos están satisfechos o minimizados. Se cree que muchos factores fisiológicos influyen en la saciedad de un individuo. Por ejemplo, la gustación, el gusto, la olfacción o el olfato, así como la sensación de plenitud del estómago, pueden contribuir a que un individuo se sienta "saciado". Más en particular, "saciedad" es el estado en el que se inhibe la ingesta adicional y determina el tiempo entre comidas y la cantidad de comida consumida en la siguiente comida. Una "sensación de saciedad mejorada" o similar, tiene el significado de que la sensación de saciedad es más pronunciada y/o más prolongada en comparación con una situación de control. El término "saciedad", como se usa en esta invención, se refiere al estado que da por terminado seguir comiendo dentro de una comida, que normalmente se produce/observa dentro de un período (por ejemplo, 20-30 minutos) después del inicio de la ingestión de la comida. Así, siempre que se haga referencia en este documento a "inducir la saciedad" o similar, tiene el significado de despertar la tendencia de un sujeto a dejar de consumir alimentos durante una comida. El efecto sobre la saciedad se puede determinar puntuando el momento en que termina la comida. Se observa un efecto de saciedad si la cantidad de calorías consumidas al finalizar la comida es significativamente menor que en los controles, como, por ejemplo, al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, o más. Durante un período de tiempo más largo (como 1, 2, 3, 4, 5 semanas o más), también se puede puntuar la reducción del peso corporal o el cambio de peso corporal en comparación con una dieta de control. El peso corporal de un sujeto al que se administran cantidades regulares de las composiciones de prueba (por ejemplo, una vez al día, dos veces al día o más) se controla preferiblemente de manera significativa (se reduce o aumenta menos) en comparación con los sujetos de control. Como se usa en esta invención, el "sujeto de control" se refiere a los sujetos a los que no se les administró la cepa bacteriana probiótica de la presente invención.

45

Como se usa en esta invención, el término "ClpB" tiene su significado general en la técnica y también se conoce como proteína de choque térmico F84.1 que es un miembro de la familia Hsp100/ClpB de AAA+-ATPasas hexaméricas. La ClpB se ha descrito como un factor esencial para la termotolerancia adquirida y para la virulencia e infectividad de varias bacterias patógenas gramnegativas y grampositivas, como *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella typhimurium*. En *E. coli* K12, la proteína chaperona ClpB también se conoce como proteína de choque térmico F84.1 o htpM y es una proteína de 857 aminoácidos. Normalmente, la proteína chaperona ClpB comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la proteína chaperona ClpB de *E. Coli* K12 con SEQ ID NO: 1 (Número de referencia de NCBI: NP_417083.1, disponible el 6 de noviembre de 2013 y/o UniProtKB/Swiss-Prot Número: P63284, disponible el 6 de noviembre de 2013). Normalmente, la secuencia de aminoácidos de la proteína chaperona ClpB comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos un 96 al 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de ClpB es 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 540-550 (ARWTGIPVSR) de SEQ ID NO: 1. En el contexto de la presente solicitud, el porcentaje de identidad se calcula usando un alineamiento global (es decir, las dos secuencias se comparan sobre su longitud completa). Los procedimientos para comparar la identidad de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. El programa "needle", que utiliza el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para encontrar la alineación óptima (incluidos los huecos) de dos secuencias al considerar su longitud completa, se puede utilizar, por ejemplo. El programa needle está, por ejemplo, disponible en el sitio web ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad según la invención se calcula preferiblemente utilizando el programa EMBOSS: programa needle (global) con un parámetro "Gap Open" igual a 10,0, un parámetro "Gap Extend" igual a 0,5 y una matriz Blosum62. Según la invención, la proteína ClpB imita a la proteína alfa-MSH para inducir la saciedad. Por tanto, en algunas realizaciones, la proteína ClpB de la presente

65

invención es reconocida por un anticuerpo anti-alfa-MSH. Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal como IgG policlonal anti- α -MSH de conejo (1:1000, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, EE. UU.). La secuencia de aminoácidos de α -MSH preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SYSMEHFRWGKPV (SEQ ID NO: 2) (Gen Pept Sequence ID, 5 PRF: 223274, disponible el 2 de diciembre de 2013).

SEQ ID NO:1:

MRLDRLTNKF QLALADAQSL ALGHDNQFIE PHLMSALLN QEGGSVSPLL TSAGINAGQL
 RTDINQALNR LPQVEGTGGD VQPSQDLVRV LNLCDKLAQK RGDNFISSEL FVLAALSERG
 TLADILKAAG ATTANITQAI EQMRGGESVN DQGAEDQRQA LKKYTIDLTE RAEQKGLDPV
 IGRDEEIRRT IQVLQRRTKN NPVLIGEPGV GKTAIVEGLA QRIINGEVPE GLKGRRVLAL
 DMGALVAGAK YRGEFEERLK GVLNDLAKQE GNVILFIDEL HTMVGAGKAD GAMDAGNMLK
 PALARGELHC VGATTLDDEYR QYIEKDAALE RRFQKVFVAE PSVEDTIAL RGLKERYELH
 HHVQITDPAI VAAATLSHRY IADRQLPKA IDLIDEAASS IRMQIDSKPE ELDRLDRRII
 QLKLEQQALM KESDEASKKR LDMLNEELSD KERQYSELEE EWKAEEKASLS GTQTIKAELE
 QAKIAIEQAR RVGDLARMSE LQYGKIPLE KQLEAATQLE GKTMRLLRNK VTDAEIAEVL
 ARWTGIPVSR MMESEREKLL RMEQELHHRV IGQNEAVDAV SNAIRRSRAG LADPNRPIGS
 FLFLGPTGVG KTELCKALAN FMFDSDEAMV RIDMSEFMK HSVSRLVGAP PGYVGYEEGG
 YLTEAVRRRP YSVILLDEVE KAHDPVFNIL LQVLDDGRLT DGQGRTVDFR NTVVIMTSNL
 GSDLIQERFG ELDYAHMKEL VLGVVSHNFR PEFINRIDEV VVFHPLGEQH IASIAQQLK
 RLYKRLEERG YEIHISDEAL KLLSENGYDP VYGARPLKRA IQQIENPLA QQILSGELVP
 GKVIRLEVNE DRIVAVQ

10 Como se usa en esta invención, la expresión "bacteria que expresa ClpB" se refiere a una bacteria que expresa o sobreexpresa la proteína chaperona ClpB como se define anteriormente o un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos un 80 a 100 %, preferiblemente 96 a 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, más preferiblemente 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

15

En algunas realizaciones, la bacteria que expresa ClpB es una bacteria de calidad alimentaria.

En algunas realizaciones, la bacteria que expresa la proteína ClpB es una cepa bacteriana probiótica.

20 Como se usa en esta invención, el término "probiótico" pretende designar microorganismos vivos que, cuando están integrados en una cantidad suficiente, ejercen un efecto positivo sobre la salud, el confort y el bienestar más allá de los efectos nutricionales tradicionales. Los microorganismos probióticos se han definido como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped". (FAO/WHO 2001). Como se usa en esta invención, la expresión "cepa bacteriana probiótica" denota una cepa bacteriana que tiene
 25 un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es una cepa bacteriana viable, en particular una cepa bacteriana probiótica viable. La expresión "cepa bacteriana viable" significa un microorganismo que es metabólicamente activo y que puede colonizar el tracto gastrointestinal del sujeto.

30

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es una cepa bacteriana no viable, en particular una cepa bacteriana probiótica, que consiste en una mezcla de fragmentos bacterianos. En algunas realizaciones, la mezcla de fragmentos bacterianos de la presente invención consiste en proteínas de la cepa bacteriana.

35

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana probiótica de la presente invención se selecciona de entre bacterias de calidad alimentaria. "Bacterias de calidad alimentaria" se refiere a las bacterias que se utilizan y generalmente se consideran seguras para su uso en alimentos.

40 La cepa bacteriana puede ser una cepa bacteriana de origen natural o puede ser una cepa bacteriana modificada genéticamente.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es una bacteria que expresó constitutivamente la proteína ClpB.

En algunas realizaciones, la proteína ClpB se sobreexpresa en la bacteria. Generalmente, la expresión de una proteína se "regula al alza" o una proteína se "sobreexpresa" cuando se expresa o se produce en una cantidad o rendimiento que es mayor que un rendimiento de línea de base dado que se produce en la naturaleza en condiciones estándar. La sobreexpresión de una proteína se puede lograr, por ejemplo, alterando uno cualquiera o más de: (a) el crecimiento o las condiciones de vida de las células huésped; (b) el polinucleótido que codifica la proteína; (c) el promotor utilizado para controlar la expresión del polinucleótido y su número de copias en la célula; y (d) las propias células huésped.

En algunas realizaciones, la bacteria se sometió a condiciones de estrés de modo que la expresión de la proteína ClpB se regula al alza en la bacteria. El estrés se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en una exposición al calor, cambios de temperatura, estrés mecánico o almacenamiento a largo plazo, almacenamiento con baja humedad y/o liofilización o secado por aspersión.

En algunas realizaciones, la bacteria se sometió a un suministro de nutrientes durante al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 veces. Normalmente, los nutrientes se suministran por medio de un medio de cultivo que es conveniente para el crecimiento de la bacteria, por ejemplo Muller-Hinton como se describe en los ejemplos. En algunas realizaciones, la bacteria se aísla en la etapa de la fase estacionaria que sigue a dicho suministro repetido de nutrientes, ya que durante esta fase la concentración de la proteína ClpB es máxima.

En algunas realizaciones, la bacteria comprende al menos una mutación puntual de modo que la expresión de la proteína ClpB se regula positivamente. El término "mutación puntual" como se usa en esta invención significa una sustitución de ácido nucleico y/o supresión. Alternativa o simultáneamente, la al menos una mutación está localizada dentro de las secuencias de ADN reguladoras del gen ClpB, por ejemplo, en las secuencias de control transcripcional y traduccional, se prefiere que esta mutación module la expresión de la proteína. Las mutaciones dentro de las secuencias de ADN reguladoras pueden servir para regular al alza la expresión de la proteína.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es una bacteria que ha sido modificada genéticamente para expresar la proteína ClpB. Normalmente, la cepa bacteriana se transformó con un ácido nucleico que codifica la proteína ClpB. El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "extraño" (es decir, exógeno o extracelular) en una célula huésped, de modo que la célula huésped expresará el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transformado". El ácido nucleico puede permanecer extracromosómico tras la transformación de un microorganismo parental o puede adaptarse para su integración en el genoma del microorganismo. En consecuencia, el ácido nucleico puede incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga y la integración dirigida en el genoma del huésped) o la expresión y replicación estables de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otras secuencias reguladoras). En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una construcción o vector de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la construcción o vector de ácido nucleico es una construcción o vector de expresión, sin embargo, la invención abarca otras construcciones y vectores, tales como los utilizados para la clonación. En algunas realizaciones, la construcción o vector de expresión es un plásmido. Normalmente, la construcción/vector de expresión además comprende un promotor, como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, el promotor permite la expresión constitutiva de los genes bajo su control. Sin embargo, también se pueden emplear promotores inducibles. Se apreciará que una construcción/vector de expresión de la presente invención puede contener cualquier número de elementos reguladores además del promotor así como genes adicionales adecuados para la expresión de la proteína ClpB si se desea. Los procedimientos para transformar células bacterianas con ácidos nucleicos extracelulares son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, es una cepa gramnegativa.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, es un miembro de la familia de *Enterobacteriaceae*. En particular, la cepa bacteriana es un miembro no patógeno de la familia de las *Enterobacteriaceae*.

Curiosamente, los inventores mostraron que la proteína ClpB de todas las bacterias *Enterobacteriaceae* mostraba un 100 % de identidad entre ellas.

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, es una cepa de *E. coli*. En algunas realizaciones, las cepas de *E. coli*, en particular las cepas probióticas de *E. coli*, para su uso de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen cepas de *E. coli* no patógenas que ejercen actividad probiótica. El ejemplo de cepa probiótica de *E. coli* es la cepa probiótica de *Escherichia coli* BU-230-98, ATCC N.º de depósito 202226 (DSM 12799), que es un aislado de la cepa probiótica conocida, comercialmente disponible, de *Escherichia coli* M-17. El ejemplo de una cepa no patógena de *E. coli* es *E. coli* Nissle 1917. Un ejemplo de cepa de *E. coli* que no se conocía como probiótico es la cepa K12 de *E. coli* de laboratorio.

En otras realizaciones, la cepa bacteriana es una cepa de *Hafnia alvei*, como la cepa de *Hafnia alvei* AF036

comercializada por la compañía Bioprox. En otras realizaciones más, la cepa bacteriana es una cepa de *Proteus vulgaris*.

En otras realizaciones más, se usa una combinación de cepas bacterianas que expresan la proteína ClpB.

5 Normalmente, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se produce con cualquier medio de cultivo apropiado bien conocido en la técnica. Varios medios de fermentación son adecuados de acuerdo con la invención, tales como (pero no limitado a), por ejemplo, en primer lugar un medio industrial, en el que la (s) cepa (s) se cultiva (n) y que se usa tal cual o después de la concentración (por ejemplo, secado) o después de la adición a otra base o producto alimenticio. Alternativamente, puede usarse células bacterianas o células bacterianas con medio (por ejemplo, el caldo de fermentación), o fracciones de dicho medio que comprende células (es decir, medio con dicha (s) cepa (s) bacteriana (s)). Las células o el medio que comprende las células comprenden células bacterianas vivas o viables y/o células bacterianas muertas o no viables de la (s) cepa (s). Por tanto, el medio puede tratarse mediante, pero no limitado a, calentamiento o sonicación. También bacterias liofilizadas o congeladas y/o los medios libres de células (que pueden estar concentrados) están incluidos en los procedimientos para preparar la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención.

En una realización particular, la cepa bacteriana de la invención se liofiliza, a continuación se vuelve a suspender antes de administrarse.

20 Normalmente, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se administra al sujeto por ingestión (es decir, vía oral).

En algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se encapsula para protegerla contra el estómago. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se formula en composiciones en forma encapsulada para mejorar significativamente su tiempo de supervivencia. En tal caso, la presencia de una cápsula puede, en particular, retrasar o impedir la degradación del microorganismo en el tracto gastrointestinal. Se apreciará que las composiciones de las presentes realizaciones pueden encapsularse en una cápsula o comprimido de liberación prolongada con recubrimiento entérico. El recubrimiento entérico permite que la cápsula/comprimido permanezca intacto (es decir, sin disolver) a medida que pasa por el tracto gastrointestinal, hasta el momento en que llega al intestino delgado. Los procedimientos de encapsulación de células bacterianas vivas son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. de General Mills Inc., tales como la patente de EE. UU. N.º 6.723.358). Por ejemplo, la microencapsulación con alginato y almidón Hi-Maize™ seguida de liofilización ha demostrado tener éxito en prolongar la vida útil de las células bacterianas en los productos lácteos [véase, por ejemplo, Kailasapathy y col., Curr Issues Intest Microbiol. septiembre de 2002; 3(2):39-48]. Alternativamente, la encapsulación se puede realizar con fibras de glumano como las extraídas de *Amorphophallus konjac*. Alternativamente, también se puede usar el atrapamiento de bacterias viables en emulsiones de aceite de sésamo [véase, por ejemplo, Hou y col., J. Dairy Sci. 86:424-428]. En algunas realizaciones, los agentes para recubrimientos entéricos son preferiblemente copolímeros de ácido metacrílico-acrilato de alquilo, tales como polímeros Eudragit®. Los poli(met)acrilatos han demostrado ser especialmente adecuados como materiales de recubrimiento. EUDRAGIT® es el nombre comercial de los copolímeros derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, cuyas propiedades están determinadas por grupos funcionales. Los grados individuales de EUDRAGIT® difieren en su proporción de grupos neutros, alcalinos o ácidos y, por lo tanto, en términos de propiedades fisicoquímicas. El hábil uso y combinación de diferentes polímeros EUDRAGIT® ofrece soluciones ideales para la liberación controlada de fármacos en diversas aplicaciones farmacéuticas y técnicas. EUDRAGIT® proporciona películas funcionales para recubrimientos de comprimidos y gránulos de liberación sostenida. Los polímeros se describen en farmacopeas internacionales como Ph.Eur., USP/NF, DMF y JPE. Los polímeros EUDRAGIT® pueden proporcionar las siguientes posibilidades para la liberación controlada de fármacos: orientación al tracto gastrointestinal (gastrorresistencia, liberación en el colon), recubrimientos protectores (enmascaramiento del sabor y el olor, protección contra la humedad) y liberación retardada de fármacos (formulaciones de liberación sostenida). Los polímeros EUDRAGIT® están disponibles en un amplio intervalo de diferentes concentraciones y formas físicas, incluidas soluciones acuosas, dispersiones acuosas, soluciones orgánicas y sustancias sólidas. Las propiedades farmacéuticas de los polímeros EUDRAGIT® están determinadas por las propiedades químicas de sus grupos funcionales. Se hace una distinción entre:

55 - poli(met)acrilatos, solubles en fluidos digestivos (por formación de sales), los polímeros EUDRAGIT® L (copolímero de ácido metacrílico), S (copolímero de ácido metacrílico), FS y E (copolímero de metacrilato butilado básico) con grupos ácidos o alcalinos permiten la liberación del ingrediente activo dependiente del pH. Aplicaciones: desde el simple enmascaramiento del sabor a través de la resistencia únicamente al líquido gástrico, hasta la liberación controlada de fármacos en todas las secciones del intestino.

60 - poli(met)acrilatos, insolubles en fluidos digestivos: los polímeros EUDRAGIT® RL y RS (copolímeros de metacrilato de amonio) con alcalinos y los polímeros EUDRAGIT® NE con grupos neutros permiten una liberación una liberación controlada en el tiempo del activo por hinchamiento independiente del pH.

65 Los recubrimientos entéricos de EUDRAGIT® brindan protección contra la liberación de fármacos en el estómago y permiten una liberación controlada en el intestino. El criterio dominante para la liberación es la disolución del

recubrimiento dependiente del pH, que tiene lugar en una determinada sección del intestino (pH 5 a más de 7) en lugar de en el estómago (pH 1-5). Para estas aplicaciones, los grados aniónicos EUDRAGIT® que contienen grupos carboxilo se pueden mezclar entre sí. Esto hace posible ajustar con precisión el pH de la disolución y así definir el sitio de liberación del fármaco en el intestino. Los grados EUDRAGIT® L y S son adecuados para recubrimientos entéricos.

- 5 EUDRAGIT® FS 30 D (dispersión acuosa de un copolímero aniónico a base de acrilato de metilo, metacrilato de metilo y ácido metacrílico) se utiliza específicamente para la liberación controlada en el colon.

Normalmente, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se administra al sujeto en forma de composición alimenticia. Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición alimenticia que comprende una cantidad de la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención.

- 10 En algunas realizaciones, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se selecciona de entre composiciones alimenticias completas, complementos alimenticios, composiciones nutracéuticas y similares. La composición de la presente invención se puede utilizar como ingrediente alimentario y/o ingrediente para pienso.

El ingrediente alimentario puede estar en forma de solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

- 20 La cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se agrega normalmente en cualquier momento durante el procedimiento de producción de la composición, por ejemplo, se pueden agregar a una base alimentaria al comienzo del procedimiento de producción o se pueden agregar al producto alimenticio final.

- 25 "Alimentos" se refiere a composiciones dietéticas líquidas (es decir, bebidas), sólidas o semisólidas, especialmente composiciones alimenticias totales (reemplazo de alimentos), que no requieren una ingesta adicional de nutrientes o composiciones de complementos alimenticios. Las composiciones de complementos alimenticios no reemplazan completamente la ingesta de nutrientes por otros medios. Las composiciones alimenticias y de complementos alimenticios son, por ejemplo, productos lácteos fermentados o productos lácteos, que preferiblemente se administran o ingieren por vía oral una o más veces al día. Los productos lácteos fermentados se pueden preparar directamente usando las bacterias de acuerdo con la invención en el procedimiento de producción, por ejemplo, por adición a la base alimenticia, usando procedimientos conocidos per se. En tales procedimientos, la (s) cepa (s) de la invención se puede (n) utilizar además del microorganismo normalmente utilizado, y/o puede (n) reemplazar uno o más o parte del microorganismo utilizado habitualmente. Por ejemplo, en la preparación de productos lácteos fermentados tales como
- 30 yogur o bebidas a base de yogur, se puede añadir o utilizar una bacteria de la invención como parte de un cultivo iniciador o se puede añadir de forma adecuada durante dicha fermentación. Opcionalmente, las bacterias pueden inactivarse o destruirse posteriormente en el procedimiento de producción. Los productos lácteos fermentados incluyen productos a base de leche, como (entre otros) postres, yogur, bebidas de yogur, quark, kéfir, bebidas a base de leche fermentada, suero de leche, quesos, aderezos, productos para untar bajos en grasa, queso fresco, bebidas a base de soja, helados, etc. Alternativamente, las composiciones alimenticias y/o de complementos alimenticios pueden ser productos no lácteos o lácteos no fermentados (por ejemplo, cepas o medio libre de células en leche no fermentada o en otro medio alimenticio). En algunas realizaciones, la cepa bacteriana probiótica de la presente invención se encapsula y se dispersa en un alimento (por ejemplo, en leche) o en un medio no alimenticio. Los productos lácteos no fermentados pueden incluir helados, barras y aderezos nutritivos y similares. Los productos no lácteos pueden incluir bebidas en polvo y barras nutritivas y similares. Los productos pueden elaborarse utilizando procedimientos conocidos, como añadir una cantidad eficaz de la (s) cepa (s) y/o medio de cultivo libre de células a una base alimentaria, tal como leche desnatada o leche o una composición a base de leche y fermentación como se conoce. Otras bases alimentarias a las que se pueden añadir las (composiciones que comprenden las) células bacterianas y/o medios de cultivo exentos de células son carne, sustitutos de carne o bases vegetales.

- 50 La composición que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención puede ser sólida, semisólida o líquida. Puede estar en forma de producto alimenticio o complemento alimenticio, por ejemplo, en forma de comprimidos, geles, polvos, cápsulas, bebidas, barras, etc. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de polvo envasado en un sobre que se puede disolver en agua, zumo de frutas, leche u otra bebida.

Tal como se usa en esta invención, el término "ingrediente alimentario" o "ingrediente para pienso" incluye una formulación que se añade o puede añadirse a alimentos funcionales o productos alimenticios como complemento nutricional.

- 60 Por "alimento nutricional" o "nutracéutico" o alimento "funcional" se entiende un producto alimenticio que contiene ingredientes que tienen efectos beneficiosos para la salud o que pueden mejorar las funciones fisiológicas.

- 65 Por "complemento alimenticio", se entiende un producto alimenticio que tiene como finalidad completar la dieta alimentaria normal. Un complemento alimenticio es una fuente concentrada de nutrientes u otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, cuando se toman solos o combinados en pequeñas cantidades.

De acuerdo con la invención, "alimento funcional" resume los productos alimenticios y productos correspondientes desarrollados últimamente a los que se les atribuye importancia no solo por su valor nutricional y gustativo, sino también por sus sustancias componentes particulares. De acuerdo con la invención, el mantenimiento y la promoción de la salud a medio o largo plazo son de importancia. En este contexto, se prefieren los usos no terapéuticos. Los términos "nutracéuticos", "productos farmacéuticos" y "alimentos de diseño", que también representan realizaciones de la invención, se utilizan como sinónimos, aunque en parte también de forma diferenciada. Sin embargo, el aspecto preventivo y la promoción de la salud, así como el carácter alimentario de los productos, se aclaran mejor con el término alimento funcional. En muchos casos, estos se refieren a productos acumulados por surtido y selección (como también es el caso en la presente invención), purificación, concentración, cada vez más también por adición. No se incluyen sustancias efectivas aisladas, en particular en forma de comprimidos o píldoras. Si bien no existe una definición legal de alimento funcional, la mayoría de las partes interesadas en esta área coinciden en que son alimentos comercializados que tienen efectos específicos para la salud más allá de los efectos nutricionales básicos. Por consiguiente, los alimentos funcionales son alimentos ordinarios que tienen componentes o ingredientes (como los descritos en esta invención) incorporados que imparten al alimento un beneficio funcional específico, por ejemplo médico o fisiológico, distinto de un efecto puramente nutricional.

En algunas realizaciones, la bebida es una bebida funcional o una bebida terapéutica, un calmante de la sed o una bebida común. A modo de ejemplo, la composición de la presente invención se puede utilizar como ingrediente para refrescos, un zumo de frutas o una bebida que comprenda proteína de suero, téis saludables, bebidas de cacao, bebidas lácteas y bebidas de bacterias del ácido láctico, yogur y yogur para beber, quesos, helados, helados y postres de agua, confitería, pasteles de galletas y mezclas para pasteles, bocadillos, alimentos y bebidas equilibrados, rellenos de frutas, glaseado de cuidado, relleno de chocolate para panadería, relleno con sabor a tarta de queso, relleno de tarta con sabor a fruta, glaseado para pasteles y donuts, cremas de relleno instantáneas para panadería, rellenos para galletas, relleno para panadería listo para usar, relleno reducido en calorías, bebida nutricional para adultos, bebida de soja/zumo acidificada, bebida de chocolate aséptica/esterilizada, mezclas en barra, bebidas en polvo, leche de soja/entera y con chocolate fortificada con calcio, bebida de café fortificada con calcio.

La composición se puede utilizar además como ingrediente en productos alimenticios como salsa de queso americano, agente antiaglomerante para rallar y queso rallado, salsa de chips, queso crema, crema agria sin grasa batida mezclada seca, crema batida láctea congelada/descongelada, crema batida estable congelada/descongelada, queso cheddar natural bajo en grasa y ligero, yogur estilo suizo bajo en grasa, postres helados aireados, helado duro, apto para el etiquetado, economía mejorada e indulgencia de helado duro, helado bajo en grasa: helado suave, salsa barbacoa, salsa de queso, aderezo de requesón, salsa Alfredo de mezcla seca, salsa de queso mezclada, salsa de tomate mezclada seca y otros.

En algunas realizaciones, la composición que comprende la capa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se usa con la producción de yogur, como bebida de yogur fermentado, yogur, yogur para beber, queso, crema fermentada, postres a base de leche y otros. De manera adecuada, la composición se puede usar adicionalmente como ingrediente en una o más aplicaciones de queso, aplicaciones de carne o aplicaciones que comprenden cultivos protectores.

En algunas realizaciones, la composición alimentaria que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es adecuada para preparar un producto sustitutivo de comidas. Como se usa en esta invención, el término "producto sustitutivo de comidas" como se usa en esta invención, a menos que se especifique lo contrario, incluye cualquier producto nutricional que contenga proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, cuya combinación sea adecuada como fuente de nutrición única o primaria para una comida. Normalmente, el producto sustitutivo de las comidas comprende al menos una fuente de carbohidratos, al menos una fuente de lípidos y/o al menos una fuente de proteínas. Como fuente de proteínas se puede usar cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo proteínas animales (tales como proteínas de la leche, proteínas de la carne y proteínas del huevo); proteínas vegetales (como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisantes); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de las mismas. Se prefieren particularmente las proteínas de la leche, como la caseína y el suero, y las proteínas de soja. Las proteínas pueden estar intactas o hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede ser deseable suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre 2 y 20 %), por ejemplo, para animales que se cree están en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el procedimiento de hidrólisis se puede llevar a cabo según se desee y como se conoce en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar un hidrolizado de proteína de suero hidrolizando enzimáticamente la fracción de suero en una o más etapas. Si la fracción de suero utilizada como material de partida está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el procedimiento de hidrólisis. Esto permite reducir el grado de bloqueo de la lisina desde aproximadamente el 15 % en peso de lisina total a menos de aproximadamente el 10 % en peso de lisina; por ejemplo sobre 7 % en peso de lisina que mejora en gran medida la calidad nutricional de la fuente de proteína. Si la composición incluye una fuente de grasa, la fuente de grasa preferiblemente proporciona 5 % al 40 % de la energía de la composición; por ejemplo, del 20 % al 30 % de la energía. Puede obtenerse un perfil de grasas adecuado utilizando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico. La fuente de carbohidratos proporciona preferiblemente del 40 % al 80 % de la energía de la composición. Puede usarse cualquier carbohidrato adecuado,

por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de los mismos. Normalmente, la sustitución de una comida diaria por una dieta de restricción energética con un sustituto de una comida contribuye al mantenimiento del peso después de la pérdida de peso.

- 5 La composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención normalmente comprende portadores o vehículos. "Portadores" o "vehículos" significan materiales adecuados para la administración e incluyen cualquier material conocido en la técnica como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante o similar, que no sea tóxico y que no interactúa con ningún componente, en particular con la cepa bacteriana, de la composición de forma perjudicial. Los ejemplos de portadores
- 10 nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones de sal, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.
- 15 En algunas realizaciones, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención comprende una cantidad de fibras dietéticas. La fibra dietética pasa a través del intestino delgado sin ser digerida por las enzimas y funciona como un agente de carga natural y laxante. La fibra dietética puede ser soluble o insoluble y, en general, se prefiere una mezcla de los dos tipos. Las fuentes adecuadas de fibra dietética incluyen soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma arábica, fructooligosacáridos,
- 20 galactooligosacáridos, sialil-lactosa y oligosacáridos derivados de leches animales. En algunas realizaciones, la fibra dietética se selecciona de entre mananos. Los mananos (como los glucomananos y galactomananos), como la goma guar, la goma de algarrobo, el konjac y la goma xantana, están presentes en algunas paredes celulares de las plantas. Los glucananos generalmente están comprendidos por unidades de glucosa y manosa unidas a (1-4)- β , mientras que los galactomananos generalmente están comprendidos por un esqueleto (1-4)- β -manano sustituido con unidades
- 25 individuales de (1-6)- α -galactosa. Muchas leguminosas endospermicas, como la guar y la algarroba, contienen galactomananos en el endospermo durante el desarrollo de la semilla. También se han encontrado glucomananos como un componente menor de los cereales.

- En algunas realizaciones, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa
- 30 bacteriana probiótica, de la presente invención contiene minerales y micronutrientes como oligoelementos y vitaminas de acuerdo con las recomendaciones de organismos gubernamentales como la USRDA. Por ejemplo, la composición puede contener por dosis diaria uno o más de los siguientes micronutrientes en los intervalos dados:- 300 a 500 mg de calcio, 50 a 100 mg de magnesio, 150 a 250 mg de fósforo, 5 a 20 mg de hierro, 1 a 7 mg de zinc, 0,1 a 0,3 mg de cobre, 50 a 200 μ g de yodo, 5 a 15 μ g de selenio, 1000 a 3000 μ g de betacaroteno, 10 a 80 mg de vitamina C, 1 a 2
- 35 mg de vitamina B1, 0,5 a 1,5 mg de vitamina B6, 0,5 a 2 mg de vitamina B2, 5 a 18 mg de niacina, 0,5 a 2,0 μ g de vitamina B12, 100 a 800 μ g de ácido fólico, 30 a 70 μ g de biotina, 1 a 5 μ g de vitamina D, 3 a 10 μ g de vitamina E.

- En algunas realizaciones, la composición que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención contiene emulsionantes. Los ejemplos de emulsionantes de calidad alimentaria
- 40 incluyen normalmente ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico, lecitina y mono y diglicéridos. Se pueden incluir sales y estabilizadores igualmente adecuados.

- En algunas realizaciones, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana probiótica de la presente invención contiene al menos un prebiótico. "Prebiótico" significa sustancias alimenticias destinadas a promover el
- 45 crecimiento de la cepa bacteriana probiótica de la presente invención en los intestinos. El prebiótico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina; y/o fibras dietéticas.

- En algunas realizaciones, la composición que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana
- 50 probiótica, de la presente invención contiene hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de películas, agentes/materiales de encapsulado, materiales de barrera/revestimiento, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de procesamiento (disolventes), agentes de fluidez, agentes
- 55 enmascaradores del sabor, agentes de peso, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos. La composición también puede contener aditivos y coadyuvantes farmacéuticos convencionales, excipientes y diluyentes, que incluyen, entre otros, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, ligninsulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábica, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas y similares.
- 60 En todos los casos, dichos componentes adicionales se seleccionarán teniendo en cuenta su idoneidad para el destinatario previsto.

- En algunas realizaciones, la administración de la proteína ClpB, o de la cepa bacteriana en particular la cepa bacteriana probiótica, que expresa la proteína, se repite, por ejemplo, de 2 a 3 veces al día, durante un día o más y generalmente
- 65 durante un período sostenido de al menos 4 días, o incluso de 4 a 15 semanas, con, en su caso, uno o más períodos de interrupción. En algunas realizaciones, la proteína ClpB o la cepa bacteriana que expresa la proteína

ClpB, se administra simultánea o secuencialmente con una comida del sujeto. En algunas realizaciones, la proteína ClpB o la cepa bacteriana que expresa la proteína ClpB, se administra antes de la comida del sujeto.

Como se usa en esta invención, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente de proteína ClpB o de bacteria que expresa la proteína ClpB, para lograr el efecto beneficioso (reducir la masa grasa en la relación masa grasa a masa magra). En el contexto de la presente invención, la cantidad de una proteína ClpB o de una bacteria que exprese la proteína ClpB, administrada al sujeto dependerá de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal ... El experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas en función de estos y otros factores. Por ejemplo, cuando la proteína ClpB se administra al sujeto en forma de probiótico, la cepa de la presente invención podrá generar una colonia suficiente para generar un efecto beneficioso sobre el sujeto. Si la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, se administra en forma de un producto alimenticio, puede comprender normalmente entre 10^3 y 10^{12} ufc de la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención por g de peso seco de la composición alimenticia.

- 15 La invención se ilustrará adicionalmente por las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS:

- 20 **Figura 1: Efectos de la administración intragástrica diaria de *E. coli* K12 de tipo salvaje (WT) o *E. coli* delecionada para el gen ClpB (Δ ClpB) en ratones adultos C57B16 normales sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos de 24 horas y el patrón de comidas analizados al principio y al final de 3 semanas de alimentación por sonda.** Los ratones de control (Ctr) no recibieron ninguna alimentación por sonda. El patrón de comidas se midió como tamaño de comida, correspondiente a una cantidad promedio de comida ingerida durante una sola comida, y como frecuencia de comida, correspondiente a un número de comidas por 24 h separadas por al menos 5 min. La disminución del tamaño de la comida refleja una saciedad más rápida y la disminución de la frecuencia de las comidas refleja una saciedad más prolongada. **A.** Mediciones repetidas bidireccionales ANOVA, posprueba de Bonferroni * $p < 0,05$. B, D, G, H, ANOVA, pospruebas de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. E. Prueba t de Student: * $p < 0,05$.

- 30 **Figura 2: Efecto de ClpB en la actividad eléctrica de las neuronas del ARC POMC.** Frecuencia del potencial de acción expresada en porcentaje de cambio frente al nivel basal; media $\pm$ EEM. Post-pruebas de Bonferroni * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

- Figura 3: Dinámica del peso corporal en ratones obesos *ob/ob* antes y durante (Días 0-21) alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12, *E. coli* K12 Δ ClpB, ambos en medio Mueller-Hilton (MH), o con medio MH solamente, como control (Ctr).** ANOVA bidireccional, Efecto del tratamiento: $p=0,01$, post-pruebas de Bonferroni Ctr. vs. *E.coli* K12, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 4: Porcentaje de cambio de peso corporal medio (desde el día de la aleatorización = 100 %) en ratones obesos *ob/ob* después de 3 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n=8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n=8), ambos en medio Mueller-Hilton (MH), o con el medio MH solamente, como control (Ctr., n=7).** ANOVA $p=0,01$, post-pruebas de Tukey * $p < 0,05$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 5: Contenido de grasa en ratones obesos *ob/ob* medido por EchoMRI después de 3 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n=8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n=8), ambos en el medio Mueller-Hilton (MH), o con el medio MH solamente, como control (Ctr., n=7).** ANOVA $p=0,005$, post-prueba de Tukey ** $p < 0,01$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 6: Relaciones de masa magra a grasa en ratones obesos *ob/ob* medidas por EchoMRI después de 3 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n=8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n=8), ambos en el medio Mueller-Hilton (MH), o con el medio MH solamente, como control (Ctr., n=7).** ANOVA $p=0,05$, Prueba t de Student * $p < 0,05$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 7: Promedio de la ingesta diaria de alimentos en ratones obesos *ob/ob* durante 3 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n=8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n=8), ambos en el medio Mueller-Hilton (MH), o con el medio MH solamente, como control (Ctr., n=7).** ANOVA $p < 0,0001$, post-prueba de Tukey *** $p < 0,001$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 8: Promedio del número de comidas diarias en ratones obesos *ob/ob* durante 3 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n=8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n=8), ambos en el medio Mueller-Hilton (MH), o con el medio MH solamente, como control (Ctr., n=7).** ANOVA $p < 0,0001$, post-prueba de Tukey *** $p < 0,001$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 9: Ganancia diaria de peso corporal en ratones obesos *ob/ob* durante la alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12, *E. coli* Niessle 1917, *E. coli* Niessle 1917 liofilizada (lio), todos en el medio Mueller-Hilton (MH), o con el medio MH solamente, como control (Ctr).** ANOVA bidireccional, $p=0,02$, post-pruebas de Bonferroni **a**, Ctr. vs. *E.coli* Niessle 1917 lio y **b**, Ctr. vs. *E.coli* Niessle 1917, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Media $\pm$ EEM.

- Figura 10: Porcentaje de cambio en el peso corporal promedio (desde el día de la aleatorización = 100 %) en ratones**

obesos *ob/ob* después de 2 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12, *E. coli* Niessle 1917, *E. coli* Niessle 1917 liofilizada (lio), todos en medio Mueller-Hilton (MH), o con medio MH solamente, como control (Ctr). Kruskal-Wallis $p < 0,01$, post-prueba de Dunn $*p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney $##p < 0,01$. Media $\pm$ EEM.

- 5 **Figura 11:** Contenido de grasa en ratones obesos *ob/ob* medido por EchoMRI después de 2 semanas de alimentación por sonda intragástrica con *E. coli* K12, *E. coli* Niessle 1917, *E. coli* Niessle 1917 liofilizada (lio), todos en medio Mueller-Hilton (MH), o con medio MH solamente, como control (Ctr). Prueba t de Student $**p < 0,01$. Media $\pm$ EEM.

Figura 12: Efecto de una inyección intracerebroventricular directa de diferentes dosis de ClpB en la ingesta de alimentos en ratas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1:

Materiales y Procedimientos

Crecimiento in vitro de *E. coli* después de un suministro regular de nutrientes

- 20 La bacteria *E. coli* K12 fue cultivada a 37 °C en 40 mL de medio MH (Becton, Dickinson, MD) que contenía un 30 % de infusión de carne de vacuno, 1,75 % de hidrolizado de caseína y 0,15 % de almidón con un pH de 7,3 a 25 °C en viales Falcon de 50 ml. Para modelar dos comidas diarias programadas en humanos, las bacterias recibieron un nuevo medio MH cada 12 h durante 5 días consecutivos. El crecimiento bacteriano se midió como una DO en $\lambda = 600$ nm por espectrofotómetro cada 2 h después de la 1ª provisión de medio MH, cada 1 h después de la 3ª y cada 10 min después de la 5ª provisión. Al final de cada ciclo de 12 h, las bacterias fueron centrifugadas durante 5 min a 6000 rpm a temperatura ambiente (TA). Los sobrenadantes se descartaron y se reemplazaron por un volumen equivalente (~40 ml) de un nuevo medio MH. Después de la última suplementación con medio MH, se tomaron muestras de bacterias para extracción de proteínas en la fase exponencial y en la siguiente fase estacionaria.

Extracción de proteínas

- Las bacterias de *E. coli* K12 se centrifugaron a 4 °C durante 30 min a 4000 g. Los residuos bacterianos se disolvieron en 2 ml de tampón trishidroximetilaminometano (TRIS) (pH 7,4) y se homogeneizaron por sonicación durante 3 min a TA. Para separar las proteínas de los fragmentos celulares no disueltos, el homogeneizado bacteriano se centrifugó a 4 °C durante 30 min a 10.000 g. El sobrenadante se recuperó y a continuación se ultracentrifugó a 4 °C durante 45 min a 60.000 g para seguir separando las proteínas en fracciones citoplasmáticas (sobrenadante) y de membrana (residuos). Las proteínas de membrana se disolvieron en tampón TRIS (pH 7,4). Las concentraciones de proteína se midieron usando el kit 2-D Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida

- Para 2D-PAGE, se utilizaron 300 µg de extracto de proteína de *E. coli* para rehidratar tiras de gradiente de pH inmovilizadas (IPG) (pH 4-7; 18 cm; BIO-RAD, Hercules, CA). Las proteínas fueron a continuación resueltas en la primera dimensión por enfoque isoeléctrico para un total de 85.000 V-h usando el sistema de enfoque isoeléctrico IPGphor (GE Healthcare). Después del enfoque, las tiras de IPG se incubaron durante 15 min en el tampón de equilibrio [urea 6 mol/L, 30 % (vol:vol) de glicerol, 2 % (p:vol) de dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,8, y 0,25 % (p:vol) de azul de bromofenol que contenía 2 % (p:vol) de ditiotretol] y a continuación se alquilaron durante 15 min en el tampón de equilibrio que contenía 4 % (p:vol) de yodoacetamida. Las tiras de IPG se fijaron posteriormente sobre geles en gradiente de poliacrilamida al 10 % (20 cm · 18 cm · 1 mm) para SDS-PAGE. La segunda dimensión se realizó durante la noche en el sistema de electroforesis vertical Ettan Dalt six (GE Healthcare) con 12 mA/gel a 25 °C. Después de SDS-PAGE, los geles 2D se fijaron durante 2 h en 2 % (vol:vol) de ácido ortofosfórico y en 50 % (vol:vol) de metanol a TA. A continuación se enjuagaron los geles con agua, y las manchas de proteína se visualizaron mediante la tinción CBB G-250 (BIO-RAD) [34 % (vol:vol) de metanol, 17 % (p:vol) de sulfato de amonio, 2 % (vol:vol) de ácido ortofosfórico, y 0,66 g de CBB G-250/L].

Análisis de la expresión diferencial de proteínas

- Las imágenes de los geles 2D teñidos fueron escaneadas por un ImageScanner II (GE Healthcare) calibrado con un marcador de escala de grises (Kodak, Rochester, NY) y digitalizado con el software Labscan 6.0 (GE Healthcare). El análisis de la expresión diferencial de proteínas, incluyendo la detección de manchas, la cuantificación, el emparejamiento y el análisis comparativo, se realizó con el software ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare). Cada muestra de proteína se sometió a 2D-PAGE al menos 3 veces (proteínas de membrana) y 4 veces (proteínas citoplasmáticas) para minimizar la variación de ejecución a ejecución, y cada conjunto de 3 (o 4) geles se comparó utilizando ImageMaster para confirmar la no aparición de manchas estadísticamente diferenciales dentro del conjunto de geles. El gel más representativo (migración de gel, definición de la mancha y número de la mancha) de cada conjunto se utilizó para comparar las proteínas de *E. coli* entre las fases exponencial y estacionaria. El nivel de

expresión se determinó por el volumen relativo de cada mancha en el gel y se expresó como % del volumen, calculado como volumen/ Σ volumenes de mancha de todas las manchas resueltas en el gel. Este volumen de manchas normalizado tiene en cuenta las variaciones debidas a la carga de proteínas y la tinción al considerar el volumen total de todas las manchas presentes en el gel. Las variaciones en abundancia se calcularon como la relación de los valores promedio de % de volumen para un grupo de manchas entre las 2 fases. Sólo se consideraron pertinentes las manchas con una relación de variación de volumen $>1,5$. La ausencia de una mancha dentro de un gel indicó que no se pudo informar de una expresión detectable para una proteína en la condición experimental seleccionada. Los valores p correspondientes fueron determinados por la prueba t de Student (nivel de significación $p < 0,05$) después de la transformación logarítmica del volumen de mancha.

Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida-ionización por electrospray MS/MS

Las manchas de proteína de interés se escindieron de los geles 2D teñidos con CBB G-250 utilizando Ettan Spot Picker (GE Healthcare), y la digestión automatizada en gel de las proteínas se realizó en el Ettan Digester (GE Healthcare) como se describió anteriormente (Goichon y col., 2011). Los extractos de proteínas se resuspendieron a continuación en 10 μ L de 5 % (vol:vol) acetonitrilo/0,1 % (vol:vol) de ácido fórmico y a continuación se analizaron con un sistema nano-LC1200 acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones 6340 equipado con una fuente de nanopulverización y una interfaz de cubo de chip de HPLC (Agilent Technologies, Courtaboeuf, Francia). Brevemente, los péptidos se enriquecieron y desalaron en una columna trampa RP-C18 de 40 nL y se separaron en una columna C18 Zorbax (tamaño de poro de 30 nm, tamaño de partícula de 5 μ m (43 mm de largo x 75 μ m de diámetro interno; Agilent Technologies). Se utilizó un gradiente lineal de 9 min (3 %-80 % de acetonitrilo en 0,1 % de ácido fórmico) a un caudal de 400 nL/min y se analizó el eluyente con un espectrómetro de masas de trampa de iones.

Para la identificación de proteínas, las listas de picos de MS/MS se extrajeron y se compararon con las bases de datos de proteínas mediante el motor de búsqueda MASCOT Daemon versión 2.2.2 (Matrix Science). Las búsquedas se realizaron con los siguientes parámetros específicos: especificidad de la enzima, tripsina; se permitió una escisión faltante; sin modificaciones fijas; modificaciones variables, oxidación de metionina, carbamidometilación de cisteína, fosforilación de serina, tirosina y treonina; monoisotópico; carga peptídica, 2+ y 3+; tolerancia de masa para iones precursores, 1,5 Da; tolerancia de masa para los iones de fragmentos, 0,6 Da; ESI-TRAP como instrumento; taxonomía, *E. coli*; base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) [NCBI nr 20120531 (18280215 secuencias, 6265275233 residuos)] (Bethesda, MD). Las coincidencias de la proteína se validaban automáticamente si satisfacían uno de los siguientes criterios: identificación con al menos dos péptidos de primera clasificación (negrita y rojo), cada uno con una puntuación MASCOT de más de 54 ($p < 0,01$), o al menos dos péptidos de primera clasificación (negrita y rojo), cada uno con una puntuación MASCOT de más de 47 ($p < 0,05$). Para evaluar las tasas de falsos positivos, todas las búsquedas iniciales en la base de datos se realizaron utilizando la opción "señuelo" de MASCOT. Los resultados se consideraron relevantes si la tasa de falsos positivos nunca excedió 1 %.

Ensayo de ATP

La producción de ATP in vitro se midió utilizando ATP colorimétrico/kit de ensayo fluorométrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioVision, CA). Brevemente, las proteínas bacterianas de las fases exponencial o estacionaria se colocaron en una serie de pocillos por duplicado para cada concentración (1, 10 y 25 μ g/mL en tampón de ensayo de ATP) y se ajustaron a 50 μ L/pocillo con tampón de ensayo de ATP. A continuación se agregaron 10 μ L de solución de diferentes nutrientes, sacarosa al 15 % o medio MH a los pocillos correspondientes y se ajustaron a 50 μ L/pocillo con el tampón de ensayo de ATP; sólo se añadieron 50 μ L/pocillo de tampón de ATP a los pocillos de control. La placa se incubó 2 h a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron en cada uno de los pocillos 50 μ L de mezcla de reacción de ATP (que contenía tampón de ensayo de ATP, sondas de ATP, convertidor de ATP y mezcla de revelador). La DO se midió a 570 nm después de 30 min de incubación a TA, protegida de la luz del día.

Desarrollo y validación del inmunoensayo de ClpB

El diseño del ensayo de detección de ClpB se basó en varios criterios, como una detección específica y sensible en un intervalo de concentración lineal. Una condición particular fue la detección de ClpB sin reactividad cruzada de α -MSH, que puede producirse debido a la presencia de epítopo (s) de tipo α -MSH en la molécula de ClpB. Para simplificar el procedimiento y la detección de la señal, utilizamos una placa ELISA estándar de 96 pocillos y una opción de lectura de DO mediante un espectrofotómetro. Los protocolos detallados de ClpB ELISA y transferencia Western (WB) se presentan en secciones separadas.

Para impedir la unión del anticuerpo de revelación (Ab) al Ab de captura, producimos Ab de captura de ClpB y Ab de detección de ClpB en diferentes especies, conejo y ratón, respectivamente. Para la captura más eficiente de la proteína ClpB de muestras biológicas complejas, recubrimos la placa ELISA con Ab policlonal de conejo que tiene múltiples epítopos anti-ClpB. Para evitar la reactividad cruzada entre ClpB y α -MSH, utilizamos, como el Ab de detección, un Ab anti-ClpB monoclonal de ratón que se ha caracterizado por una alta sensibilidad y especificidad para reconocer ClpB pero no α -MSH preseleccionado mediante cribado ELISA de varios clones de Ab. Se usó Ab de revelación anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina como una herramienta ELISA común para obtener una reacción enzimática cromogénica legible como una DO proporcional a la concentración de analito. Se obtuvo un cambio lineal en la DO

resultante de la detección de 7 diluciones consecutivas de una proteína ClpB de *E. coli* recombinante que variaba de 2 pM a 150 pM sin alcanzar una meseta y sin saturación de la señal de DO.

Para validar la especificidad del ensayo de ClpB desarrollado, medimos las concentraciones de ClpB en muestras de proteínas extraídas de 10 cultivos diferentes de *E. coli* K12 WT y de un cultivo de bacterias de *E. coli* mutantes Δ ClpB. El Dr. Axel Mogk (ZMBH, Universidad de Heidelberg, Alemania) proporcionó amablemente el mutante Δ ClpB y las cepas de tipo salvaje (WT) correspondientes. Además, analizamos la presencia de ClpB en estas muestras de proteínas bacterianas por WB usando Ab policlonal de conejo anti-ClpB y comparamos los valores de intensidad de señal entre las bandas de WB y las concentraciones de ClpB en ELISA. Se detectó ClpB en todos los cultivos de *E. coli* WT, con 7 cultivos que tenían concentraciones de ClpB superiores a 1000 pM, mientras que ClpB no fue detectable en la muestra de proteína extraída de *E. coli* Δ ClpB. WB reveló una banda principal de un tamaño esperado de 96 kDa en WT pero no en *E. coli* Δ ClpB. La intensidad de DO de estas bandas varió entre muestras individuales y se correlacionó positivamente con las concentraciones de ClpB medidas por ELISA en las mismas muestras de cultivos de *E. coli*. Por tanto, la ausencia de detección de ClpB en preparaciones de proteínas de *E. coli* Δ ClpB confirmó la especificidad de los ensayos, y una buena concordancia entre ELISA y WB proporcionó la validación cruzada de ambas técnicas de inmunodetección de ClpB.

Para verificar que el ensayo de plasma de ClpB detecta ClpB derivado de bacterias intestinales, usamos el ELISA de ClpB para medir ClpB en plasma de ratones que habían sido suplementados vía alimentación por sonda intragástrica diariamente durante 3 semanas con *E. coli* WT o con Δ ClpB. Las muestras de plasma estaban disponibles en nuestro estudio publicado anteriormente (Tennoune y col., 2014). Encontramos que ClpB estaba normalmente presente en el plasma de ratón, incluidos los controles y los ratones alimentados por sonda con un caldo de cultivo sin bacterias. Es importante destacar que los niveles plasmáticos de ClpB aumentaron en ratones que recibieron *E. coli* WT pero no cambiaron en ratones suplementados con *E. coli* deficiente en ClpB, lo que confirma el origen bacteriano intestinal de ClpB plasmático.

ELISA ClpB

Los anticuerpos policlonales anti-*E. coli* de ClpB de conejo (fabricados habitualmente por Delphi Genetics, Gosselies, Bélgica), fueron recubiertos en placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY) utilizando 100 μ l y una concentración de 2 μ g/ml en tampón NaHCO₃ 100 mM, pH 9,6 durante 12 h a 4 °C. Las placas se lavaron (5 min x 3) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,05 % de Tween 20, pH 7,4. La proteína ClpB de *E. coli* recombinante (fabricada habitualmente por Delphi Genetics), se diluyó en serie a 5, 10, 25, 50, 70, 100 y 150 pM en el tampón de la muestra (PBS, azida sódica al 0,02 %, pH 7,4) y se añadió a los pocillos en duplicados para realizar un patrón. Las muestras de análisis incluyeron: mucosa colónica y muestras de plasma de ratones y ratas o proteínas extraídas de cultivos de *E. coli* K12. Las muestras de análisis se agregaron a los pocillos restantes por duplicado y se incubaron 2 h a TA. Las placas se lavaron (5 min x 3) en PBS con 0,05 % de Tween 20, pH 7,4. Los anticuerpos monoclonales de ClpB anti-*E. coli* de ratón (1:500 en tampón de muestra, fabricado habitualmente por Delphi Genetics) se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 90 min a TA. Las placas se lavaron (5 min x 3) en PBS con 0,05 % de Tween 20, pH 7,4. IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (1:2000 en tampón de muestra) de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA) se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 90 min a TA. Las placas se lavaron (5 min x 3) en PBS con 0,05 % de Tween 20, pH 7,4 y a continuación se añadieron 100 μ l de solución de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, St. Louis, MO) como sustrato de fosfatasa alcalina. Después de 40 min de incubación a TA, se detuvo la reacción añadiendo 50 μ l de NaOH 3N. La DO se determinó a 405 nm usando un lector de microplacas Metertech 960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwán). Los valores de DO en blanco resultantes de la lectura de placas sin adición de muestras de plasma o diluciones estándar de proteína ClpB se restaron de los valores de DO de la muestra.

Transferencia Western de ClpB

La transferencia Western se realizó utilizando proteínas extraídas de *E. coli* K12. Las muestras de proteína (10 μ g) se separaron en un gel de SDS de acrilamida al 20 % en tampón Tris-Glicina y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Orsay, Francia), que se bloqueó durante al menos 1 h a TA con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) en TBS (10 mmol/L de Tris, pH 8; 150 mmol/L de NaCl) más 0,05 % (p/v) de Tween 20. A continuación, la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con anticuerpos policlonales de ClpB anti-*E. coli* de conejo (1:2000, Delphi Genetics). Después de tres lavados en una solución de bloqueo de 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo en TBS/0,05 % de Tween 20, las membranas se incubaron durante 1 h con IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa (1:3000, SantaCruz Biotechnology). Después de tres lavados, se reveló la reacción de la peroxidasa utilizando el kit de detección ECL (GE Healthcare). Las bandas de proteína se compararon con el patrón de peso molecular (Precision Plus, BioRad) y las películas se escanearon usando ImageScanner III (GE Healthcare) y se analizaron por la densidad de píxeles de la banda usando el software ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare).

Administraciones intestinales de proteínas de *E. coli* en ratas

65 Animales

El cuidado y la experimentación de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. y cumplieron con las regulaciones de la Comunidad Europea y de Francia (Diario Oficial de la Comunidad Europea L 358, 18/12/1986). Se mantuvieron ratas hembra Sprague-Dawley, con un peso corporal de 200-250 g (Janvier, Genest-Saint-Isle, Francia) en jaulas de retención (3 ratas por jaula) en una instalación para animales totalmente equipada bajo condiciones ambientales reguladas (22 ± 1 °C), en un ciclo de luz-5 oscuridad de 12 h con luces encendidas a 7:30 am) durante 1 semana con el fin de aclimatarlos a las condiciones de alojamiento. Se disponía de pienso granulado estándar para roedores (dieta RM1, SDS, Reino Unido) y agua potable *ad libitum*.

10 Experimento n.º 1

Este experimento fue diseñado para evaluar la relevancia de nuestro modelo *in vitro* de crecimiento de *E. coli* en situaciones *in vivo* de crecimiento bacteriano en el intestino. Las ratas fueron anestesiadas con una solución de ketamina (75 mg/kg, Virbac, Carros, Francia)/xilacina (5 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Francia), 3:1 vol., 0,1 mL/100 g de peso corporal I.P. Después de la laparotomía, se movilizó el colon colocando 2 ligaduras: la 1ª en la unión caecocolónica y la 2ª, 4 cm más abajo. Se realizaron infusiones colónicas y muestreo de contenido luminal mediante catéter de polipropileno insertado en el colon ascendente y fijado con la 1ª ligadura. Se infundieron suavemente 2 ml de medio MH o agua en el colon y se retiraron inmediatamente después para medir la DO. Después de la medición de la DO, la muestra completa del contenido colónico se devolvió al colon. Dicho muestreo del contenido colónico, sin 20 agregar nuevo medio MH o agua, se repitió cada 5 min durante los primeros 20 min y a continuación a los 30 min y 60 min. La densidad bacteriana se midió como una DO en $\lambda = 600$ nm mediante un espectrofotómetro. Se tomaron muestras de sangre de la vena porta antes y 30 y 60 min después de la 1ª infusión. Se tomaron muestras fecales del colon al final del experimento para extracción de ADN y PCR de ClpB.

25 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Se realizó PCR cuantitativa (qPCR) para analizar la densidad bacteriana de las bacterias que expresan ADN de ClpB utilizando un instrumento CFX 96 q-PCR (BioRad, CA). El ADN total se extrajo de las heces de rata utilizando el mini kit de heces de ADN QAMP (QIAGEN Venlo, Países Bajos). La mezcla de qPCR incluía 5 µl de SYBR Green Master 30 (QIAGEN, West Sussex, R.U.), 0,5 µM de cada uno de los cebadores directo e inverso, ADN de las muestras y agua para dar un volumen total de 10 µl. Los cebadores se adquirieron de Invitrogen (Cergy-Pontoise, Francia). Se realizó una PCR de tres etapas durante 40 ciclos. Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 min, se recocieron a 60 °C durante 2 min y se extendieron a 95 °C durante 15 s.

35 Experimento n.º 2

Este experimento tuvo como objetivo evaluar los efectos de las proteínas de *E. coli* sobre la liberación de péptidos intestinales (GLP-1 y PYY) en la circulación sistémica. Se anestesiaron ratas y se movilizó el colon como se describe anteriormente, infusiones colónicas de proteínas de *E. coli* (0,1 µg/kg de proteína en 2 ml de PBS) extraídas en el 40 exponencial (n=6) o en la fase estacionaria (n=6) se preformaron una vez durante 20 min. Se tomaron muestras de sangre de la vena porta antes y después de 20 min de infusiones colónicas para los ensayos de GLP-1, PYY y ClpB. Se tomaron muestras de mucosa colónica al final del experimento para el ensayo de ClpB. Los ensayos de GLP-1 y PYY se realizaron usando un kit de inmunoensayo enzimático fluorescente (Phoenix Pharmaceutical inc., CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se midió a 325 nm para la excitación y 420 nm para la 45 emisión usando un lector de microplacas Chameleon (HIDEX Inc., Turku, Finlandia).

Administraciones de proteínas de *E. coli* en ratas, ingesta alimentaria y estudio c-fos cerebral

Animales

Se aclimataron ratas Wistar macho, peso corporal 200-250 g (Janvier, Genest-Saint-Isle, Francia) a las condiciones de alojamiento y se alimentaron como se describe anteriormente. Tres días antes de los experimentos, las ratas fueron transferidas a jaulas de metabolismo individual (Tecniplast, Lyon Francia) donde fueron alimentadas *ad libitum* con la misma dieta RM1 pero en forma de polvo (SDS). Siempre había agua potable disponible. Las ratas se manipularon 55 con cuidado todos los días durante varios minutos durante el período de aclimatación para habituarlas a las manipulaciones. Al final de la aclimatación, las ratas se distribuyeron en tres grupos para lograr un peso corporal medio similar y se utilizaron en los Experimentos 1-3. Se realizaron dos experimentos que incluían la restricción de alimentos en las mismas ratas con un intervalo de 4 días. El 3º experimento en ratas con alimentación libre involucró sus nuevas series.

60 Experimento n.º 1

El 1º experimento tuvo como objetivo comparar los efectos de las proteínas de membrana de *E. coli* extraídas en fases exponenciales y estacionarias. Las ratas fueron privadas de comida durante la noche (entre las 18:00 h y las 65 10:00 h), mientras que el agua estaba disponible *ad libitum*. Al día siguiente de la privación de alimentos, las proteínas de *E. coli* fueron inyectadas I.P. a las 10:00 h y las ratas volvieron inmediatamente a sus jaulas de metabolismo, las

cuales contenían una cantidad de comida pesada previamente. La ingesta de alimentos se midió a las 1, 2 y 4 h. El 1^{er} grupo de ratas (n=6) recibió 0,1 mg/kg de proteínas de membrana extraídas de *E. coli* en fase exponencial en 300 µl de PBS; el 2^o grupo de ratas (n=6) recibió 0,1 mg/kg de proteínas de membrana extraídas de *E. coli* en fase estacionaria y el grupo de control (n=6) recibió 300 µl de PBS.

Experimento n.º 2

El 2^o experimento tuvo como objetivo comparar los efectos de las proteínas citoplásmicas de *E. coli* extraídas en fases exponenciales y estacionarias. Se utilizó un protocolo experimental similar al del Experimento n.º 1.

Experimento n.º 3

Este experimento fue diseñado para evaluar los efectos de las proteínas totales de *E. coli* sobre la ingesta de alimentos en ratas que se alimentan libremente. Las inyecciones de proteínas de *E. coli* (0,1 mg/kg de proteína en 300 µl de PBS, I.P.) extraídas en la fase exponencial (n=6) o en la fase estacionaria (n=6) o PBS sólo como control (n=6), se llevaron a cabo a las 19:30 h y los animales fueron devueltos a sus jaulas de metabolismo que contenían una cantidad pesada previamente de comida. La ingesta acumulada de alimentos se midió después de 2 h. Inmediatamente después, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0,2 mg/kg, I.P.) y se les administró una perfusión para el estudio inmunohistoquímico de la expresión de c-fos en el cerebro.

Preparación de tejidos e inmunohistoquímica

Los cerebros se fijaron mediante perfusión/inmersión en 4 % de paraformaldehído, se congelaron y se cortaron (14 µm) en un criostato (Leica Microsystems, Nanterre, Francia) y a continuación se procesaron para inmunohistoquímica usando un kit de amplificación de señal de tiramida (TSA) más fluoresceína (NEN, Boston, MA). Para tinción única, se usaron antisueros policlonales de conejo contra c-fos (1:4.000, Ab-5, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para la doble tinción, siguiendo la TSA, se aplicó una técnica de inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales de conejo contra β-endorfina (extremo β) 1:1000 (Life Technologies, Frederick, MD) que fue revelado por anticuerpos anti-conejo cianina-3 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) o IgG monoclonal de ratón contra el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, inc., TX) que fue revelado por anticuerpos conjugados con rojo de rodamina anti-ratón 1:200 (Jackson ImmunoResearch). En los núcleos hipotalámico arqueado y ventromedial y en el núcleo central de la amígdala, se contaron las células positivas con un aumento x20 de seis secciones consecutivas. Se usó el número medio de células positivas por rata para calcular la media del grupo. Las imágenes digitales fueron optimizadas para el brillo y el contraste en el software Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

Administraciones crónicas de proteínas de *E. coli* en ratones

Ratones C57B16 macho de dos meses de edad (n=32) se compraron en Janvier Labs y se aclimataron a la instalación para animales durante 1 semana con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, luces encendidas a las 8:00. A continuación, los ratones se colocaron individualmente en las jaulas para ratones BioDAQ (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ), cada una equipada con un monitor de alimentación automático. Después de 3 días de aclimatación a las jaulas BioDAQ, los ratones se dividieron en tres grupos (n=8), cada uno recibe diferentes tratamientos que consisten en dos inyecciones IP diarias a las 9:00 y a las 18:30 de: (i) PBS, (ii) proteínas bacterianas extraídas en fase exponencial (0,1 mg/kg de peso corporal), (iii) proteínas bacterianas extraídas en fase estacionaria (0,1 mg/kg del peso corporal). Los alimentos (SERLAB, Montataire, Francia) y el agua potable estaban disponibles *ad libitum* y se midió el peso corporal a diario. Los datos de alimentación se controlaron continuamente durante una semana y se analizaron utilizando el visor de datos BioDAQ 2.3.07 (Research Diets). Para el análisis del patrón de comidas, el intervalo entre comidas se estableció en 300 s. Las proporciones de saciedad se calcularon como tiempo (s) del intervalo posterior a la comida dividido por la cantidad de alimento (g) consumido en la comida anterior. Después del experimento, los ratones fueron sacrificados por decapitación; se extrajo el cerebro y se diseccionó el hipotálamo para la micromatriz de ARNm de neuropéptido.

Micromatriz de ARNm de neuropéptido hipotalámico

Se extrajo el ARN total del hipotálamo de ratones, que recibieron administraciones crónicas de proteínas de *E. coli*, utilizando el kit *NucleoSpin® RNA II* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo el protocolo de los fabricantes. El ARN digerido se sometió a transcripción inversa a 42 °C durante 60 min utilizando el kit del sistema de transcripción inversa ImProm-II™ (Promega, Madison, WI). El ADNc obtenido se utilizó en la reacción de PCR en tiempo real. Se diseñó un panel de 9 pares de cebadores con el software Primer express (Life Technologies, Saint-Aubin, Francia) y se validó por su eficacia y especificidad. La reacción de PCR, compuesta por 6 µl de ADNc y 6 µl de mezcla Fast SYBR Green Master (Life Technologies) que contiene cebadores específicos inversos y directos a una concentración de 100 nM, se dispuso en placas de 96 pocillos con un sistema de manipulación de líquidos Bravo (Agilent) y amplificó con QuantStudio 12K Flex (Life Technologies). Las señales generadas por el ADNc para los genes diana se corrigieron internamente con las señales del gen de referencia para las variaciones en las cantidades de ARNm de entrada. A continuación, se comparó el nivel de expresión génica con un grupo de muestra de control correspondiente y se

determinaron las regulaciones con el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Registros electrofisiológicos

- 5 Se prepararon cortes de cerebro (250 μ m) de ratones POMC-eGFP adultos (5-7 semanas de edad; Ref: C57BL/6J-Tg(Pomc-EGFP)1Low/J, The Jackson Laboratory) como se describió anteriormente (Fioramonti y col., 2007). Las rodajas se incubaron a TA, en medio extracelular oxigenado que contenía (en mM): 118 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1,2 NaH₂PO₄, 1,5 CaCl₂, 5 Hepes, 2,5 D-glucosa (osmolaridad ajustada a 310 mOsm con sacarosa, pH 7,4) durante un período de recuperación de al menos 60 min. Una vez en la cámara de registro, los cortes se perfundieron a 2-3 ml/min con el mismo medio extracelular. Los cortes se observaron con un microscopio Nikon EF600 (Nikon France, Champigny sur Marne) equipado para fluorescencia (filtro de fluoresceína) y microscopía de video IR-DIC. Se visualizaron neuronas viables ARC POMC usando un objetivo de inmersión en agua X40 (Nikon) con una cámara de video de fluorescencia (Nikon). Las pipetas de borosilicato (4-6 M Ω ; 1,5 mm de DO, Sutter Instruments, Novato, CA) se llenaron con medio extracelular filtrado. Los registros adjuntos de las células se hicieron con un amplificador Multiclamp 700B, se digitalizaron con la interfaz Digidata 1440A y se adquirieron a 3 kHz con el software pClamp 10.3 (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las pipetas y las capacitancias de las células se compensaron por completo. Una vez establecida una línea de base estable, se perfundió 1 nM de ClpB (Delphi Genetics) durante 5-10 minutos. La tasa de activación de las neuronas POMC se midió durante los últimos 3 minutos de la perfusión de ClpB, 7-10 minutos después de la perfusión y se comparó con la tasa de activación medida 3 minutos antes de la perfusión.

Análisis estadístico

- Los datos fueron analizados y los gráficos fueron mostrados en un gráfico usando el Prisma GraphPad 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). La normalidad se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias de grupo se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (K-W) con las pospruebas de Tukey o Dunn, de acuerdo con los resultados de normalidad. Cuando fue apropiado, los grupos individuales se compararon utilizando la prueba t de Student y las correlaciones de Pearson o la prueba de Mann-Whitney (M-W) de acuerdo con los resultados de normalidad. Los efectos de los experimentos continuos se analizaron utilizando medidas repetidas (RM) ANOVA y las pruebas posteriores de Bonferroni. Los datos mostrados como media $\pm$ error estándar de la media (eem), y para todas las pruebas, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

35 Crecimiento de *E. coli* después de la provisión regular de nutrientes

- Después de la 1ª provisión del medio nutritivo de Mueller-Hinton (MH) al cultivo de *E. coli*, se observaron tres fases de crecimiento bacteriano: 1) fase de retardo de 2 h; 2) fase de crecimiento exponencial de 4 h y 3) fase estacionaria con la densidad óptica (DO) de 0,35 permaneciendo estable durante 6 h. Después de los 3^{er} y 5^o suministros de medio MH, sólo se encontraron dos fases de crecimiento: la exponencial y estacionaria, la 1ª fase comenzando inmediatamente después de la provisión de nutrientes. Cada nuevo ciclo de alimentación se caracterizó por una menor duración de la fase de crecimiento exponencial: 2 h después de la 3ª y 20 min después de la 5ª provisión. Después de la 5ª provisión de nutrientes, las proteínas bacterianas se extrajeron y se separaron en la membrana y las fracciones citoplásmicas se utilizaron para el análisis proteómico y los experimentos *in vivo* en ratas en ayunas. En el nuevo experimento, para verificar si la provisión regular continua de nutrientes puede acelerar aún más la dinámica del crecimiento bacteriano, se suministró nutrientes a *E. coli* K12 9 veces. Hemos encontrado que, después de la 7ª y 9ª provisión de nutrientes, la fase de crecimiento exponencial no hizo más cambios, con una duración de 20 min con el mismo ($\Delta 0.3$) aumento relativo de DO, reflejando un crecimiento bacteriano idéntico después de cada suministro de nutrientes. De acuerdo con las normas de McFarland, un aumento de 0,3 de DO corresponde a un aumento de 10⁸-10⁹ de bacterias. Después de la 9ª provisión de nutrientes, las proteínas bacterianas fueron extraídas en las fases exponenciales y estacionarias, mostrando concentraciones totales de proteínas de 0,088 mg/ml y 0,15 mg/ml, respectivamente. Las proteínas extraídas se analizaron para determinar los niveles de ClpB y se han utilizado en el ensayo de producción de ATP y para experimentos *in vivo* que incluyen infusiones intracolónicas e inyecciones sistémicas en ratones y ratas que se alimentan libremente, seguidas de la detección de c-fos en el cerebro.

55 Análisis proteómico

- Para analizar si los perfiles de expresión de las proteínas varían de acuerdo con las fases de crecimiento bacteriano inducido por nutrientes, se realizó una electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) por separado en las fracciones de membrana y citoplasmáticas de las proteínas de *E. coli* K12 extraídas 10 min y 2,3 h después de la 5ª adición de medio de MH, correspondiente a las fases exponencial y estacionaria, respectivamente. El número total de manchas proteicas detectadas fue 2895 (1367 de membrana y 1528 citoplasmáticas).

- La comparación de la 2D-PAGE de las proteínas de membrana entre las fases exponencial y estacionaria reveló 20 proteínas expresadas de forma diferencial (al menos 1,5 veces). Entre ellas, 17 proteínas mostraron mayor expresión en la fase exponencial y 15 fueron identificadas por espectrometría de masas. La comparación de las 2D-PAGE de

las proteínas citoplasmáticas mostró 20 proteínas expresadas de forma diferencial (al menos 1,5 veces). A diferencia de las proteínas de membrana, la mayoría (19) de las proteínas citoplasmáticas mostraron un aumento de expresión durante la fase estacionaria. Solo una mancha de proteína, correspondiente a la flagelina, tuvo mayor expresión en la fase exponencial. La mayoría de las proteínas identificadas estaban implicadas en procedimientos anabólicos o catabólicos que muestran un perfil metabólico mixto general en ambas fases de crecimiento.

Producción de ATP por proteínas de *E. coli* in vitro

Para estudiar si el cambio del proteoma bacteriano durante las fases de crecimiento puede influir en su capacidad de extracción de energía, se probó *in vitro* la producción de ATP a partir de nutrientes por las proteínas de *E. coli* K12 de las fases exponencial y estacionaria. Descubrimos que las proteínas de ambas fases de crecimiento pudieron aumentar la producción de ATP a partir de diferentes fuentes de energía. Las concentraciones de ATP fueron mayores cuando se usó una fuente de energía mixta que contenía proteínas, como el medio MH, en comparación con una solución de sacarosa. La producción de ATP aumentó de manera dependiente de la dosis con las concentraciones de proteínas bacterianas; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los efectos productores de ATP de las proteínas de las fases exponencial o estacionaria.

Producción de ClpB por *E. coli* in vitro

Desarrollamos y validamos un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de ClpB de *E. coli*, que se ha utilizado en este estudio. Se estudió si la producción de proteína ClpB es diferente entre las fases de crecimiento bacteriano en 4 cultivos de *E. coli* K12 separados. La transferencia Western detectó bandas de 96 kDa correspondientes a ClpB en todas las preparaciones de proteínas con niveles aumentados durante la fase estacionaria. Estos cambios se han confirmado aún más usando el ELISA en ClpB en las mismas preparaciones de proteínas bacterianas, lo que muestra que las concentraciones de ClpB casi se duplicaron en la fase estacionaria.

Infusiones intestinales de nutrientes y proteínas de *E. coli*

Para verificar si nuestro modelo *in vitro* de crecimiento de *E. coli* inducido por nutrientes es relevante para la dinámica de crecimiento bacteriano intestinal *in vivo*, se infundió medio MH o agua en el colon de ratas anestesiadas. Encontramos que las instilaciones de medio MH, pero no agua, inducían la proliferación bacteriana en el intestino con una fase de crecimiento exponencial que duraba 20 minutos, de acuerdo con los datos *in vitro*. Los niveles plasmáticos de ClpB medidos en la vena porta no fueron significativamente diferentes 30 o 60 minutos después de la infusión de MH. No obstante, las concentraciones plasmáticas de ClpB se correlacionaron positivamente con el contenido de ADN de ClpB en las heces.

A continuación, para determinar si los cambios dependientes del crecimiento de los proteomas de *E. coli* pueden influir en los mecanismos de control del apetito del huésped localmente en el intestino, en un experimento separado, ratas anestesiadas recibieron durante 20 min infusiones colónicas de proteínas de *E. coli* de las fases exponencial o estacionaria, ambas a 0,1 mg/kg. Las concentraciones de ClpB en la mucosa colónica medidas 20 min después de la infusión fueron mayores en ratas que recibieron las proteínas de la fase estacionaria, sin embargo, los niveles plasmáticos de ClpB no se vieron afectados por las proteínas bacterianas de las fases exponencial o estacionaria. De acuerdo con nuestra hipótesis de que los efectos de las proteínas de *E. coli* sobre la señalización del apetito del huésped podrían depender de la fase de crecimiento bacteriano, encontramos que las instilaciones colónicas de proteínas de *E. coli* de la fase exponencial pero no estacionaria estimularon los niveles plasmáticos de GLP-1 y, por el contrario, se detectaron niveles plasmáticos elevados de PYY después de la infusión de proteínas de la fase estacionaria pero no exponencial.

Ingesta de alimentos y c-fos cerebral después de la administración aguda de proteínas de *E. coli* en ratas

Debido a que ClpB estaba presente en el plasma en todas las ratas y ratones analizados, es posible que las proteínas plasmáticas de *E. coli* puedan influir en el apetito a través de su acción sistémica y que dichos efectos puedan ser diferentes para las proteínas asociadas con las fases de crecimiento bacteriano. Al probar esta posibilidad en ratas en ayunas durante la noche, encontramos que una sola administración intraperitoneal (I.P.) (0,1 mg/kg de peso corporal) de la fracción de membrana de las proteínas de *E. coli* extraídas en la fase estacionaria, disminuyó la ingesta de alimentos en 1 h y 2 h durante la realimentación en comparación con el grupo de control. Por el contrario, la administración de la fracción citoplasmática de las proteínas de *E. coli* (0,1 mg/kg de peso corporal, I.P.) extraídas en la fase exponencial aumentó la ingesta de alimentos en 4 h durante la realimentación.

Para investigar más a fondo si las proteínas totales de *E. coli* pueden influir en la ingesta espontánea de alimentos de forma dependiente de la fase de crecimiento, y para activar sitios centrales como el ARC, a las ratas de alimentación libre se les inyectó antes del comienzo de la fase oscura proteínas bacterianas (0,1 mg/kg de peso corporal, I.P.). Se midió la ingesta de alimentos durante 2 h después de las inyecciones y a continuación se sacrificaron las ratas para el análisis de la expresión de c-fos en el cerebro. Descubrimos que las ratas inyectadas con proteínas bacterianas de la fase estacionaria comieron menos que los controles, mientras que la ingesta de alimentos no se vio significativamente afectada por las inyecciones de proteínas bacterianas de la fase exponencial.

Dos horas después de las inyecciones I.P. de proteínas de *E. coli* a ratas que se alimentaban libremente, se analizó inmunohistoquímicamente la expresión de c-fos en el ARC y el núcleo ventromedial (VMN) del hipotálamo y en el CeA. El mayor número de células positivas para c-fos se encontró en el ARC y VMN de ratones que recibieron proteínas bacterianas de la fase estacionaria. La mayoría de las células que expresan c-fos en el ARC contenían β -endorfina (Controles, $71,31 \pm 12,81$ %, fase exp. *E. coli* , $73,56 \pm 10,45$ %, fase estat. de *E. coli* , $80,50 \pm 9,68$ %, ANOVA $p=0,36$), es decir, fueron identificadas como neuronas POMC anorexigénicas. Por consiguiente, el porcentaje de neuronas de c-fos restantes en el ARC no difirió significativamente entre los grupos (Controles, $28,69 \pm 12,81$ %, fase exp. *E. coli* , $26,44 \pm 10,45$ %, fase estat. de *E. coli* , $19,5 \pm 9,68$ %, ANOVA $p=0,36$). Aunque el número total de células positivas para β -endorfina no fue significativamente diferente entre los grupos (Controles, $54,82 \pm 10,67$ células, fase exp. de *E. coli* , $66,03 \pm 11,43$ células, fase estat. de *E. coli* , $66,03 \pm 5,06$ células, ANOVA $p=0,09$), el número relativo de neuronas de β -endorfina activadas fue mayor en ratas que recibieron proteínas de fase estacionaria en comparación con los controles y con ratas que recibieron proteínas de fase exponencial. Además, el número de neuronas de β -endorfina activadas se correlacionó inversamente con la ingesta de alimentos (r de Pearson = $-0,57$, $p=0,018$).

En el CeA, el número de células positivas a c-fos aumentó en ratas inyectadas con proteínas de la fase estacionaria, en comparación con los otros dos grupos. Casi todas las células positivas a c-fos en el CeA fueron fenotipadas como neuronas que expresan CGRP (Controles, $100 \pm 0,01$ %, fase de exp. de *E. coli* , $100 \pm 0,01$ %, fase estat. de *E. coli* , $100 \pm 0,01$ %, ANOVA $p=0,92$). Aunque el número total de neuronas positivas a CGRP en el CeA fue similar entre los grupos (Controles, $123,8 \pm 13,15$ células, fase exp. de *E. coli* , $118,3 \pm 25,59$ células, fase estat. de *E. coli* , $126,1 \pm 6,64$ células, ANOVA $p=0,85$), el porcentaje de neuronas de CGRP activadas de c-fos sólo aumentó en las ratas que recibieron proteínas de fase estacionaria. La activación de las neuronas de CGRP se correlacionó inversamente con la ingesta de alimentos (r de Pearson = $-0,89$, $p=0,001$).

25 Patrón de alimentación y neuropéptidos hipotalámicos después de inyecciones crónicas de proteína de *E. coli* en ratones

Para determinar si las proteínas bacterianas pueden influir en el patrón de alimentación, se administraron dos inyecciones diarias de proteínas totales de *E. coli* ($0,1$ mg/kg de peso corporal, I.P.) durante una semana a ratones con alimentación libre. El primer día después de las inyecciones se caracterizó por un peso corporal y una ingesta de alimentos significativamente más bajos en ratones que recibieron proteínas bacterianas de la fase estacionaria pero no exponencial en comparación con los controles. Aunque el tamaño de la comida diaria no fue significativamente diferente entre los grupos, su disminución en relación con el día antes de las inyecciones se observó una semana después en ratones que recibieron proteínas de fase estacionaria. La frecuencia de las comidas no fue significativamente diferente entre los grupos, aunque se observó una tendencia hacia un aumento en los ratones que recibieron proteínas bacterianas de la fase estacionaria. Aunque la ingesta total de alimentos entre los 3 grupos no fue significativamente diferente durante los 6 días de inyecciones, el análisis por separado para los períodos de luz y oscuridad mostró que los ratones inyectados con las proteínas de la fase exponencial habían aumentado la ingesta de alimentos durante el período de luz, pero disminuyó durante el período de oscuridad. Por el contrario, los ratones que recibieron las proteínas de la fase estacionaria mostraron una ingesta de alimentos más baja que los controles en el período de oscuridad sin ningún efecto en el período de luz. Durante el primer día después de las inyecciones, la proporción de saciedad aumentó en los ratones que recibieron proteínas de la fase estacionaria, y el mismo grupo mostró una tendencia a la disminución, una semana después.

Para tener una idea de los cambios moleculares subyacentes al patrón de alimentación alterado observado después de 6 días de inyecciones de proteínas bacterianas, analizamos los niveles de expresión del ARNm hipotalámico de varios neuropéptidos involucrados en el control del apetito. Encontramos que los ratones que recibieron las proteínas de la fase estacionaria mostraron niveles elevados de ARNm precursor de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y orexina en comparación con los controles, y de hormona liberadora de corticotropina (CRH) en comparación con los ratones inyectados con proteínas en la fase exponencial, que también mostraron niveles elevados de BDNF pero QRFP disminuido.

Activación electrofisiológica de neuronas POMC hipotalámicas por ClpB

Para determinar si ClpB, como marcador de proteínas de *E. coli* reguladas positivamente en la fase de crecimiento estacionaria y mimético de α -MSH, activa las neuronas ARC POMC, se examinó el efecto de ClpB en cortes de cerebro de ratones POMC-eGFP utilizando electrofisiología de fijación de voltaje en parches de membrana en modo de células adheridas. La aplicación en baño de ClpB (1 nM) aumentó la frecuencia del potencial de acción de ~ 50 % de las neuronas ARC POMC ($n=7/13$), en 229 ± 109 % (basal: $2,02 \pm 0,78$ Hz vs. ClpB: $3,82 \pm 1,36$ Hz), como se muestra en a Figura 2. En general, las neuronas POMC no regresaron completamente a sus tasas de activación basales hasta al menos 10 minutos después de la aplicación de ClpB.

Estos resultados sugieren de este modo un efecto directo de la proteína ClpB sobre la saciedad y la repleción.

65 Discusión

Nuestro estudio revela que las proteínas bacterianas pueden vincularse fisiológicamente a las bacterias intestinales con el control del apetito del huésped, incluidos sus mecanismos a corto y largo plazo asociados con el crecimiento bacteriano inducido por nutrientes en el intestino y sus efectos sistémicos, respectivamente. Los siguientes resultados principales apoyan esta conclusión: 1) la provisión regular de nutrientes acelera y estabiliza el crecimiento exponencial de *E. coli* durante 20 min, de acuerdo con los datos *in vivo*; 2) la fase de crecimiento estacionario de *E. coli* se caracterizó por un mayor contenido de proteína bacteriana total y un perfil de proteoma diferente, incluido un aumento de ClpB; 3) proteínas de *E. coli* de ambas fases de crecimiento estimuladas de forma dependiente de la dosis en la producción de ATP *in vitro*; 4) los niveles plasmáticos de ClpB no cambiaron después del crecimiento bacteriano inducido por nutrientes en el intestino, pero se correlacionaron con el ADN de ClpB en la microbiota intestinal; 5) la infusión intestinal de proteínas de *E. coli* de las fases de crecimiento exponencial y estacionaria estimuló GLP-1 y PYY plasmáticos, respectivamente. 6) Las inyecciones sistémicas de proteínas de *E. coli* disminuyeron significativamente la ingesta de alimentos solo por las proteínas de la fase estacionaria, acompañadas de activación de c-fos en neuronas anorexigénicas ARC y CeA, y finalmente 7) ClpB estimuló la tasa de activación de las neuronas ARC POMC.

15 Provisión regular de nutrientes y crecimiento bacteriano

Entre la amplia variedad de bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal de los humanos, *E. coli* es el anaerobio facultativo más abundante, lo que lo justifica como organismo modelo para las bacterias intestinales comensales (Foucault y col., 2009). Aquí, se encontró que *E. coli* cambian su dinámica de crecimiento durante el suministro de nutrientes regular, resultante después del 5° ciclo de alimentación, en un crecimiento exponencial inmediato con una duración de 20 min seguido de la fase estacionaria. A continuación, el ciclo de crecimiento se reproduce de manera idéntica después de la siguiente provisión de nutrientes, lo que sugiere que puede desempeñar un papel de marcapasos establecido por mecanismos intrínsecos a las bacterias. Se observó una dinámica similar de crecimiento bacteriano en respuesta a la infusión de nutrientes en el colon de la rata, lo que respalda que nuestros datos *in vitro* pueden ser relevantes para situaciones *in vivo*, por ejemplo, en humanos que toman comidas regulares. El incremento de 10^8 - 10^9 de número de bacterias se mantuvo estable después de cada nueva provisión, lo que sugiere que la correspondiente producción estable de la biomasa bacteriana, incluyendo el aumento de contenido de proteína en el intestino, puede jugar un papel de un factor regulador inducido por la comida para el huésped. Dado que la fase prandial promedio en humanos es similar a la duración del crecimiento exponencial de las bacterias alimentadas regularmente, es tentador especular que la saciedad del huésped puede ser provocada por bacterias intestinales que alcanzan la fase estacionaria, 20 minutos después de un contacto con los nutrientes ingeridos. Sin embargo, el contenido de bacterias en el tracto gastrointestinal varía de 10^3 en el estómago a 10^{12} en el colon. Además, se necesitan aproximadamente 2 h para el avance de los nutrientes ingeridos a través del estómago y el intestino delgado y aproximadamente 10 h a través del intestino grueso. Debido a tal retraso en la entrega de nutrientes a la mayoría de las bacterias intestinales, es probable que, además del contacto directo con el bolo de nutrientes, el crecimiento bacteriano durante la fase prandial también pueda ser iniciado por los nutrientes liberados en la luz intestinal por el reflejo cefálico pavloviano a la ingestión.

Expresión de proteínas bacterianas durante las fases de crecimiento y detección intestinal

Debido a que la dinámica de crecimiento de *E. coli* alimentada regularmente puede asociarse con las fases prandial y posprandial del huésped, hemos estudiado si la expresión de proteínas bacterianas puede potencialmente vincular las bacterias intestinales y el control del apetito del huésped. En primer lugar, comparamos los proteomas de *E. coli* en las fases de crecimiento exponencial frente a estacionario. Para este análisis, las proteínas de *E. coli* se extrajeron en la mitad de la fase exponencial, es decir, 10 min después de la provisión de nutrientes, y en la fase estacionaria 2 h después, un tiempo que normalmente se caracteriza por la sensación de saciedad. El hallazgo de al menos 40 proteínas expresadas diferencialmente entre dos fases de crecimiento confirmó que difieren no solo cuantitativamente, por el contenido de proteínas, que casi se duplicó después de la proliferación bacteriana, sino también cualitativamente. A continuación se estudió la posible relevancia del perfil de expresión de proteínas modificadas para el control del apetito del huésped: i) comparando la capacidad de las proteínas bacterianas para generar sustrato energético, y ii) determinando los posibles efectos directos de las proteínas bacterianas en las vías reguladoras del apetito. La posibilidad tardía está respaldada por la identificación proteómica reciente de ClpB de *E. coli* como un mimético de proteína conformacional de α -MSH (Tennoune y col., 2014); los datos que validaron nuestra hipótesis anterior de que las proteínas bacterianas intestinales, que presentan epítopos homólogos a péptidos anorexigénicos u orexigénicos, pueden ser responsables de la producción de autoanticuerpos de reacción cruzada (Fetissov y col., 2008). Por tanto, es concebible que una combinación de tales proteínas miméticas bacterianas pueda influir directamente en el apetito, dependiendo del perfil de expresión de proteínas asociado con la fase de crecimiento bacteriano. Al analizar los cultivos de *E. coli* y la mucosa intestinal, encontramos un aumento de los niveles de ClpB asociados con la fase de crecimiento estacionario. El aumento de ClpB puede, por tanto, contribuir a la activación de vías anorexigénicas después de la proliferación de *E. coli* inducida por nutrientes y el aumento de la producción de proteínas bacterianas. Una cuestión importante es dónde pueden actuar las proteínas bacterianas, como ClpB, sobre las vías reguladoras del apetito.

Aunque las proteínas bacterianas están presentes en la mucosa intestinal (Haange y col., 2012), su paso a través de la barrera intestinal no se ha estudiado extensamente (Lim y Rowley, 1985). En teoría, después de lisis bacterianas espontáneas e inducidas en el intestino (Rice y Bayles, 2008), los componentes bacterianos pueden atravesar la

barrera epitelial de la mucosa por absorción en los enterocitos y por difusión paracelular, regulada por el sistema nervioso entérico (Neunlist y col., 2012). Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS), que se libera tras la lisis de bacterias gramnegativas, está presente de forma natural en el plasma de humanos sanos y ratones con niveles basales más altos después de consumir dietas altas en grasas (Cani y col., 2007). Los niveles plasmáticos de LPS también aumentan posprandialmente (Harte y col., 2012), pero no existen tales datos sobre proteínas bacterianas. Aquí mostramos que los niveles plasmáticos de ClpB permanecen estables en ratas después de la proliferación bacteriana en el intestino o después de la infusión intestinal de proteínas bacterianas. Indica que la ClpB plasmática, y muy probablemente otras proteínas bacterianas presentes en el plasma, no están muy influenciadas por la proliferación bacteriana inducida por nutrientes y, por lo tanto, no pueden participar en la señalización de saciedad a corto plazo al cerebro.

Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de ClpB se correlacionaron con el ADN de ClpB en la microbiota intestinal, lo que sugiere que el número de bacterias productoras de ClpB, que a largo plazo debería ser relativamente independiente de sus fluctuaciones relacionadas con el crecimiento bacteriano impulsado por nutrientes, puede ser el principal factor responsable para el mantenimiento a largo plazo de los niveles plasmáticos de ClpB. Esta conclusión está respaldada además por nuestros datos, obtenidos para la validación de ClpB en ELISA, que muestran un aumento de las concentraciones plasmáticas de ClpB en ratones crónicamente alimentados por sonda con *E. coli*, pero no en ratones que recibieron ClpB de *E. coli* mutante. Por tanto, es posible que las proteínas bacterianas intestinales presentes en el plasma, incluida la ClpB, actúen de forma sistémica vinculando la composición de la microbiota intestinal con el control a largo plazo del metabolismo energético.

Efectos de las proteínas de *E. coli* en la producción de ATP *in vitro*

El intercambio de energía a través de las cadenas alimentarias representa un vínculo universal entre todos los organismos (Yun y col., 2006). El ATP, derivado del catabolismo de nutrientes tanto en bacterias como en animales, sirve como principal sustrato energético para los procedimientos anabólicos. Los animales pueden sentir cambios en el ATP a través de la actividad de la proteína quinasa activada por adenosina-5'-monofosfato (AMPK), lo que resulta en una mayor ingesta de alimentos cuando los niveles de ATP son bajos y *viceversa* (Dzamko y Steinberg, 2009). Por lo tanto, en el presente trabajo, comparamos la capacidad de las proteínas de *E. coli* en fases exponenciales y estacionarias para generar ATP *in vitro*. De hecho, muchas de las proteínas identificadas mostraron propiedades anabólicas o catabólicas. Encontramos que las proteínas de *E. coli* pueden estimular la producción de ATP *in vitro*, lo que sugiere que pueden continuar catalizando la producción de ATP después de la lisis bacteriana en el intestino. Aunque no se encontraron diferencias en la capacidad de producir ATP entre las proteínas de las fases exponencial y estacionaria, la producción de ATP dependiente de la concentración de proteína bacteriana indica que un mayor contenido de proteína bacteriana, después de la proliferación bacteriana inducida por nutrientes, debería resultar en una mayor síntesis de ATP. La relevancia de la eficiencia de la microbiota intestinal para recolectar energía para el metabolismo del huésped se estableció previamente comparando ratones y humanos obesos y delgados (Turnbaugh y col., 2006). Nuestros datos corroboran aún más estos resultados al mostrar la capacidad de las proteínas de *E. coli* para generar ATP. También sugiere que la proliferación bacteriana inducida por la comida puede conducir a un aumento de ATP intestinal, lo que debería contribuir a la detección luminal de la disponibilidad de energía y la relajación intestinal (Glasgow y col., 1998).

Efectos intestinales de las proteínas de *E. coli* sobre las hormonas de la saciedad

A continuación, estudiamos si las proteínas de *E. coli* en el intestino pueden estimular la liberación sistémica de hormonas de saciedad intestinal como GLP-1 y PYY (Adrian y col., 1985; Batterham y col., 2002; Beglinger y Degen, 2006; Flint y col., 1998). De hecho, ambas hormonas son producidas por las mismas o distintas células L enteroendocrinas presentes en todo el intestino y abundantes en el colon (Eissele y col., 1992), y por tanto, las células L están directamente expuestas a proteínas bacterianas. Encontramos efectos diferenciales de las proteínas de *E. coli* sobre la liberación de GLP-1 y PYY, mostrando la estimulación de GLP-1 por las proteínas de la fase exponencial y de PYY de las fases de crecimiento estacionarias. Estos resultados apuntan a algunas similitudes entre el crecimiento bacteriano inducido por nutrientes y la dinámica conocida de la liberación de GLP-1 y PYY inducida por la comida. De hecho, como se demostró en humanos, un pico agudo de GLP-1 plasmático se produce 15 minutos después de una infusión intragástrica de una comida líquida, mientras que un PYY plasmático elevado de mayor duración comienza entre 15 y 30 minutos después de una comida (Edwards y col., 1999; Gerspach y col., 2011). La liberación más prolongada de GLP-1 se asoció con la ingesta de grasas (van der Klaauw y col., 2013). Por lo tanto, la dinámica de crecimiento de las bacterias intestinales alimentadas con regularidad encaja temporalmente en la dinámica de la liberación de GLP-1 y PYY, lo que sugiere un papel inductor de las bacterias intestinales, y específicamente de las proteínas de *E. coli*, en la señalización de saciedad intestinal inducida por la comida. Un efecto diferencial de las proteínas de *E. coli* de la fase exponencial para estimular el GLP-1, posiblemente refleje un papel incretínico del GLP-1 en el control glucémico (Edwards y col., 1999; Steinert y col., 2014). Una demostración reciente de MC4R funcional expresada por células L (Panaro y col., 2014), proporciona un trasfondo para su posible activación por proteínas bacterianas miméticas de α -MSH. Una producción aumentada de ClpB durante la fase estacionaria de *E. coli*, así como niveles elevados de ClpB en la mucosa intestinal, asociados con niveles aumentados de PYY en plasma, sugieren un papel directo de ClpB en la activación de células L productoras de PYY en el colon. Por otro lado, las proteínas de *E. coli* no identificadas hasta ahora, posiblemente reguladas positivamente durante la fase de crecimiento

exponencial, pueden estimular preferentemente la secreción de GLP-1.

Efectos sistémicos de las proteínas de *E. coli* sobre la ingesta de alimentos y las vías cerebrales que regulan el apetito

5

Mostramos aquí que las inyecciones periféricas de proteínas de *E. coli* a ratas hambrientas o que se alimentan libremente y a ratones que se alimentan libremente cambiaron su ingesta de alimentos según la fase de crecimiento de *E. coli*. Teniendo en cuenta que la ClpB plasmática no se vio afectada por la infusión intestinal de nutrientes, pero se mantuvo estable durante un tiempo breve, la acción sistémica de las proteínas bacterianas debe interpretarse como relevante para sus efectos moduladores a largo plazo sobre el apetito. Además, debido a la corta duración de la fase exponencial, las proteínas bacterianas reguladas positivamente durante la fase estacionaria de larga duración deberían dominar en el plasma y, por tanto, sus administraciones sistémicas pueden representar mejor las situaciones fisiológicas. Las concentraciones de 0,1 mg/kg de proteínas de *E. coli* utilizadas en estos experimentos fueron similares a las dosis satietogénicas efectivas de hormonas peptídicas como la leptina o el PYY tras administraciones periféricas en humanos o roedores (Batterham y col., 2002; Halaas y col., 1995; Heymsfield y col., 1999).

Se observó un aumento de la ingesta de alimentos en ratas hambrientas durante la realimentación en fase de luz tras la administración de proteínas citoplasmáticas de la fase exponencial y una disminución de las proteínas de membrana de la fase estacionaria. Este experimento confirmó que diferentes mezclas de proteínas de la misma bacteria pueden aumentar o disminuir la ingesta de alimentos por su acción sistémica. Sin embargo, en un entorno más fisiológico, al probar el efecto de las proteínas totales de *E. coli* en ratas que se alimentan libremente en la fase de oscuridad, solo se observó una disminución en la ingesta de alimentos que fue inducida por proteínas de la fase estacionaria.

Los resultados de inyecciones repetidas en ratones que se alimentan libremente apoyan aún más el papel de las proteínas de *E. coli* para promover el balance energético negativo. De hecho, el primer día de inyecciones de proteínas bacterianas se acompañó de una disminución de la ingesta de alimentos y del peso corporal, lo que fue significativo en los ratones que recibieron proteínas de la fase estacionaria y que también se caracterizaron por una mayor proporción de saciedad. Aunque la ingesta de alimentos en estos ratones se normalizó a partir de entonces, una disminución progresiva del tamaño de la comida se acompañó de un aumento de la frecuencia de las comidas, muy probablemente como un mecanismo compensatorio para mantener la ingesta de alimentos (Meguid y col., 1998). Además, se observaron efectos diferenciales de las proteínas de *E. coli* durante las fases de luz y oscuridad. En consecuencia, el patrón de expresión del ARNm de los neuropéptidos que regulan el apetito en el hipotálamo mostró una respuesta mixta con la activación de las vías anorexigénicas y orexigénicas. Es de destacar que ambos grupos de ratones que recibieron proteínas de *E. coli* mostraron un aumento similar de ARNm de BDNF, una vía anorexigénica aguas abajo de MC4R en el VMN (Xu y col., 2003). Esta vía puede ser la base de una disminución de la ingesta de alimentos durante la fase de oscuridad observada en ambos grupos, y que se acentuó aún más en los ratones inyectados con las proteínas de la fase exponencial que muestran niveles más bajos de QRFP orexigénico (Chartrel y col., 2003) y NPY (Herzog, 2003). Por el contrario, los ratones que recibieron proteínas bacterianas de la fase estacionaria, mostraron un perfil anorexigénico mejorado con niveles elevados de ARNm de CRH, lo que probablemente implica a neuronas PVN que expresan MC4R (Lu y col., 2003). Estos cambios, combinados con una mayor expresión del precursor de ARNm de orexina A que estimula la frecuencia de las comidas (Baird y col., 2009), pueden contribuir a una disminución del tamaño de la comida y la proporción de saciedad, respectivamente, en estos ratones después de 6 días de inyecciones.

De acuerdo con nuestra hipótesis de que las proteínas bacterianas producidas durante la fase estacionaria pueden activar algunas vías anorexigénicas centrales clave, encontramos en ratas que se alimentan libremente un aumento de la expresión de c-fos en las neuronas anorexigénicas ARC POMC, así como en el VMN, que se conoce desde hace mucho tiempo como centro de saciedad y está interconectado con las neuronas ARC POMC (Sternson y col., 2005). El patrón de c-fos obtenido se asemeja al de una respuesta satietogénica durante la ingestión de alimentos (Johnstone y col., 2006) o se induce por hormonas de saciedad como PYY o polipéptido pancreático (Batterham y col., 2002; Challis y col., 2004; Lin y col., 2009). Un número relativamente pequeño (~10 %) de neuronas POMC activadas por c-fos sugiere que las proteínas de *E. coli* circulantes podrían tener un efecto modulador sobre el apetito y el peso corporal actuando a través de estas vías hipotalámicas. Aunque no fue factible determinar la activación de c-fos por las neuronas NPY/AgRP, no se puede excluir su contribución a la señalización por proteínas bacterianas; estas neuronas también expresan MC3R y MC4R (Mounien y col., 2005). Además, una activación más fuerte que en las ARC POMC de c-fos en las neuronas CeA CGRP (~40 %) puede significar una acción convergente corriente debajo de neuronas ARC POMC y NPY/AgRP y posiblemente de otras áreas del cerebro que regulan el apetito, que no se han analizado aquí, como el núcleo del tracto solitario.

Finalmente, para determinar si la activación de sitios cerebrales que regulan el apetito, como las neuronas ARC POMC, por proteínas bacterianas puede ser causada por su acción local, estudiamos si la aplicación de ClpB en estas neuronas puede activar su actividad eléctrica. Nuestros resultados mostraron que aproximadamente la mitad de las neuronas estudiadas aumentaron su frecuencia de potencial de acción, permaneciendo activadas durante al menos 10 min. El efecto sostenido de ClpB es consistente con el efecto de α -MSH en neuronas POMC que expresan MC3R y MC4R funcionales (Smith y col., 2007), lo que sugiere que ClpB puede ser un activador fisiológico de las neuronas POMC hipotalámicas, algo similar al PYY satietogénico y leptina (Batterham y col., 2002; Cowley y col., 2001). Sin

embargo, no sabemos si ClpB pudo activar las neuronas POMC directamente o mediante una red local.

En conjunto, estos datos apoyan el papel de las proteínas de *E. coli* presentes sistémicamente, cuya expresión aumenta en la fase de crecimiento estacionario, como ClpB, en la promoción del equilibrio energético negativo a través de la activación de las vías anorexígenas del cerebro. También sugiere que los cambios en la composición de la microbiota que dan como resultado una abundancia baja o alta de *E. coli*, y posiblemente de otras bacterias de la familia de las *Enterobacteriaceae*, pueden influir en el balance energético del huésped de forma positiva o negativa, respectivamente.

10 EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra el efecto de bacterias que expresan ClpB sobre la ingesta alimentaria.

Se aclimataron ratones C57B16 macho de un mes de edad (Laboratorios Janvier) a las instalaciones para animales durante 1 semana y se mantuvieron como se describe anteriormente. Los ratones se distribuyeron en 3 grupos de la siguiente manera: (i) alimentados por sonda con 10^8 bacterias de *E. coli* K12 (que expresan ClpB); (ii) alimentados por sonda con 10^8 bacterias de *E. coli* K12 deficiente para ClpB; (iii) y controles que no recibieron ningún tratamiento. La cepa mutante ClpB se generó en el laboratorio de Bernd Bukau (ZMBH, Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania) y el Dr. Axel Mogk la proporcionó amablemente junto con la bacteria de *E. coli* de tipo salvaje (WT) correspondiente. Los ratones fueron colocados individualmente en las jaulas de BioDAQ (Research Diets) y se les aplicó una alimentación por sonda de manera intragástrica diariamente antes del comienzo de la fase de oscuridad durante 21 días con 0,5 ml de medio LB con la bacteria. Los primeros días de alimentación por sonda estuvieron acompañados de una disminución del peso corporal y de la ingesta de alimentos en ratones que recibieron *E. coli* WT, al contrario de las bacterias que no expresan la proteína ClpB (figura 1).

25 EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra el efecto de las bacterias que expresan ClpB en ratones obesos ObOb.

Los ratones ObOb genéticamente obesos fueron aclimatados a la instalación de animales durante 1 semana y mantenidos como se ha descrito anteriormente. Los ratones fueron sometidos a alimentación por sonda intragástrica con (i) 10^8 bacterias de *E. coli* K12 (que expresan ClpB); (ii) 10^8 bacterias de *E. coli* K12 deficientes para ClpB; ambas en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iii) medio MH solamente, como control. La cepa mutante de ClpB fue generada en el Laboratorio de Bernd Bukau (ZMBH, Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania) y fue amablemente suministrada junto con las correspondientes bacterias de *E. coli* de tipo silvestre (WT) por el Dr. Axel Mogk. Los ratones fueron colocados individualmente en las jaulas de BioDAQ (Research Diets) y se les aplicó una alimentación por sonda intragástrica diaria durante 21 días como se indica.

Los inventores demostraron que la alimentación por sonda con la bacteria de *E. coli* K12 WT indujo una reducción del 56 % en el aumento de peso (Figuras 3 y 4), una reducción de la relación masa grasa/masa magra (Figuras 5 y 6) y una reducción del 20 % de la ingesta total de alimentos (Figuras 7 y 8), lo que no se observó con la bacteria de *E. coli* K12 deficiente para ClpB.

45 EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra el efecto de otras cepas de bacterias que expresan ClpB en ratones ObOb obesos.

Los ratones ObOb genéticamente obesos fueron aclimatados a la instalación de animales durante 1 semana y mantenidos como se ha descrito anteriormente. Los ratones fueron alimentados por sonda intragástrica con (i) 10^8 bacterias de *E. coli* K12 (que expresan ClpB); (ii) 10^8 bacterias de *E. coli* Niessle 1917 (que expresan ClpB) (iii) 10^8 bacterias de *E. coli* Niessle 1917 (que expresan ClpB) en forma liofilizada; todas en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iv) medio MH solamente, como control. Los ratones fueron sometidos a una alimentación por sonda intragástrica diaria durante 14 días, como se indica.

Los inventores demostraron que la alimentación por sonda con cualquier cepa de bacterias que expresan ClpB de *E. coli* inducía una reducción en el aumento de peso (Figuras 9 y 10) y una reducción del contenido de grasa (Figura 11).

EJEMPLO 5

Este ejemplo confirma la acción sacietogénica directa de ClpB.

El probable efecto de ClpB sobre el comportamiento alimentario a través de la familia de receptores MCR hipotalámicos se demostró en un estudio en ratas, que recibieron inyecciones intracerebroventriculares (ICV) de ClpB.

Se mantuvieron ratas macho Sprague-Dawley de 200 a 250 g (Janvier, L'Arbresle, Francia) a 24 °C con un ciclo luz-oscuridad de 12:12 h (período de luz de 7 a 19 h) en una instalación animal especializada con aire acondicionado. Las

ratas fueron alimentadas con un alimento balanceado granulado estándar (RM1 diet, SDS, Essex, Reino Unido). El agua potable siempre estuvo disponible *ad libitum*.

Para la implantación de las cánulas de acero inoxidable (C311 GA, diámetro externo 0,9 mm, interno 0,58 mm, Plastics One, Roanoke, VA), se anestesió a las ratas mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (75 mg/kg)/xilasa (5 mg/kg) (3:1 vol - 0,1 mL/100 g de peso corporal) y se les colocó en un nuevo instrumento estereotáxico estándar para ratas y ratones (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). Las cánulas se implantaron bajo un microscopio operativo (Carl Zeiss, Jena, Alemania) en el núcleo paraventricular hipotalámico (Bregma: +2,8 mm, lateral: -0,4 mm desde la línea media, y ventral: 8,2 mm desde la duramadre), con la barra de incisivos fijada en -3,3 mm. Las cánulas se fijaron al cráneo con cemento dental apoyado en los tornillos de anclaje. Tras el despertar, las ratas se mantenían individualmente en las jaulas de metabolismo (Techniplast, Lyon, Francia) durante 1 semana y se les alimentaba *ad libitum* con el mismo alimento balanceado granulado estándar para roedores (RM1, SDS) con agua siempre disponible. Las condiciones físicas y el aumento de peso corporal se vigilaron diariamente en el período postoperatorio para asegurar una buena recuperación.

A continuación, las ratas fueron colocadas individualmente en las jaulas de ratas BioDAQ (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ), cada una equipada con un monitor de alimentación automático. Después de 3 días de aclimatación a las jaulas BioDAQ, las ratas fueron privadas de alimento durante 12 h antes de la inyección y divididas en 3 grupos (n=3), cada uno recibiendo diferentes dosis de una sola inyección de ClpB: 10 ng, 100 ng y 1 mg, diluidas en 2 ml de solución cerebroespinal artificial estéril. Las inyecciones se realizaron 15 minutos antes del comienzo de la fase de oscuridad y del suministro de alimentos. La ingesta de alimentos se midió durante la fase de oscuridad.

Los animales mostraron una disminución de la ingesta de alimentos dependiente de la dosis (véase la Figura 12).

25

BIBLIOGRAFÍA

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan aquí como bibliografía en la presente descripción.

30

Adrian, T.E., Ferri, G.L., Bacarese-Hamilton, A.J., Fuessl, H.S., Polak, J.M., y Bloom, S.R. (1985). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* 89, 1070-1077.

Atasoy, D., Betley, J.N., Su, H.H., y Sternson, S.M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172-177.

35

Baird, J.-P., Choe, A., Loveland, J.L., Beck, J., Mahoney, C.E., Lord, J.S., y Grigg, L.A. (2009). Orexin-A hyperphagia: hindbrain participation in consummatory feeding responses. *Endocrinology* 150, 1202-1216.

Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., y col. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650-654.

Beglinger, C., y Degen, L. (2006). Gastrointestinal satiety signals in humans - Physiologic roles for GLP-1 and PYY? *Physiology & Behavior* 89, 460-464.

40

Berthoud, H.-R. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Current Opinion in Neurobiology* 21, 888-896.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., y col. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.

45

Carter, M.E., Soden, M.E., Zweifel, L.S., y Palmiter, R.D. (2013). Genetic identification of a neural circuit that suppresses appetite. *Nature* 503, 111-114.

Challis, B.G., Coll, A.P., Yeo, G.S.H., Pinnock, S.B., Dickson, S.L., Thresher, R.R., Dixon, J., Zahn, D., Rochford, J.J., White, A., y col. (2004). Mice lacking proopiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY3-36. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4695-4700.

50

Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Rego, J.C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., y col. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15247-15252.

Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8, 571-578.

Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F., y Cone, R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24, 155-163.

55

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., y Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.

Dinan, T.G., Stilling, R.M., Stanton, C., y Cryan, J.F. (2015). Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. *Journal of Psychiatric Research* 63, 1-9.

60

Dzamko, N.L., y Steinberg, G.R. (2009). AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiologica* 196, 115-127.

Edwards, C.M., Todd, J.F., Mahmoudi, M., Wang, Z., Wang, R.M., Ghatei, M.A., y Bloom, S.R. (1999). Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* 48, 86-93.

65

Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H.P., Vermeer, H., Arnold, R., y Goke, B. (1992). Glucagon-like peptide-

- 1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European journal of clinical investigation* 22, 283-291.
- Fetissov, S.O., y Déchelotte, P. (2011). The new link between gut-brain axis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14, 477-482.
- 5 Fetissov, S.O., Hamze Sinno, M., Coëffier, M., Bole-Feysot, C., Ducrotté, P., Hökfelt, T., y Déchelotte, P. (2008). Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition* 24, 348-359.
- Fioramonti, X., Contie, S., Song, Z., Routh, V.H., Lorsignol, A., y Penicaud, L. (2007). Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56, 1219-1227.
- 10 Flint, A., Raben, A., Astrup, A., y Holst, J.J. (1998). Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of Clinical Investigation* 101, 515-520.
- Forsythe, P., y Kunze, W. (2013). Voices from within: gut microbes and the CNS. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 55-69.
- 15 Foucault, M.-L., Thomas, L., Goussard, S., Branchini, B.R., y Grillot-Courvalin, C. (2009). In vivo bioluminescence imaging for the study of intestinal colonization by *Escherichia coli* in mice. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 264-274.
- Garfield, A.S., Li, C., Madara, J.C., Shah, B.P., Webber, E., Steger, J.S., Campbell, J.N., Gavrilova, O., Lee, C.E., Olson, D.P., y col. (2015). A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. *Nat Neurosci* doi:10.1038/nn.4011.
- 20 Gerspach, A.C., Steinert, R.E., Schönenberger, L., Graber-Maier, A., y Beglinger, C. (2011). The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E317-E325.
- Glasgow, I., Mattar, K., y Krantis, A. (1998). Rat gastroduodenal motility in vivo: involvement of NO and ATP in spontaneous motor activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 275, G889-G896.
- 25 Goichon, A., Coëffier, M., Claeysens, S., Léclicre, S., Cailleux, A.-F., Bole-Feysot, C., Chan, P., Donnadieu, N., Lerebours, E., Lavoinne, A., y col. (2011). Effects of an enteral glucose supply on protein synthesis, proteolytic pathways, and proteome in human duodenal mucosa. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94, 784-794.
- Haange, S.B., Oberbach, A., Schlichting, N., Hugenholtz, F., Smidt, H., von Bergen, M., Till, H., y Seifert, J. (2012). Metaproteome analysis and molecular genetics of rat intestinal microbiota reveals section and localization resolved species distribution and enzymatic functionalities. *J Proteome Res* 11, 5406-5417.
- 30 Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., y Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546.
- Harte, A.L., Varma, M.C., Tripathi, G., McGee, K.C., Al-Daghri, N.M., Al-Attas, O.S., Sabico, S., O'Hare, J.P., Ceriello, A., Saravanan, P., y col. (2012). High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 35, 375-382.
- 35 Herzog, H. (2003). Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. *Eur J Pharmacol* 480, 21-29.
- Heymsfield, S.B., Greenberg, A.S., Fujioka, K., Dixon, R.M., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J.A., Patane, J., Self, B., Hunt, P., y col. (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: A randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568-1575.
- 40 Inui, A. (1999). Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides: mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci* 22, 62-67.
- Johnstone, L.E., Fong, T.M., y Leng, G. (2006). Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats. *Cell Metabolism* 4, 313-321.
- 45 Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., y Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- Lim, P.L., y Rowley, D. (1985). Intestinal absorption of bacterial antigens in normal adult mice. II. A comparative study of techniques. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 76, 30-36.
- 50 Lin, S., Shi, Y.-C., Yulyaningsih, E., Aljanova, A., Zhang, L., Macia, L., Nguyen, A.D., Lin, E.-J.D., During, M.J., Herzog, H., y col. (2009). Critical role of arcuate Y4 receptors and the melanocortin system in pancreatic polypeptide-induced reduction in food intake in mice. *PLoS One* 4, e8488.
- Lu, X.Y., Barsh, G.S., Akil, H., y Watson, S.J. (2003). Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 23, 7863-7872.
- 55 Manning, S., y Batterham, Rachel L. (2014). Enteroendocrine MC4R and energy balance: linking the long and the short of it. *Cell Metabolism* 20, 929-931.
- Meguid, M.M., Laviano, A., y Rossi-Fanelli, F. (1998). Food intake equals meal size times mean number. *Appetite* 31, 404.
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, I., Vaudry, H., y Jégou, S. (2005). Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82, 164-170.
- 60 Mul, J.D., Spruijt, B.M., Brakkee, J.H., y Adan, R.A.H. (2013). Melanocortin MC4 receptor-mediated feeding and grooming in rodents. *European Journal of Pharmacology* 719, 192-201.
- Murphy, K.G., y Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444, 854-859.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahe, M.M., Derkinderen, P., Bruley des Varannes, S.B., y Rolli-Derkinderen, M. (2012). The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 90-100.

- Panaro, B.L., Tough, I.R., Engelstoft, M.S., Matthews, R.T., Digby, G.J., Moller, C.L., Svendsen, B., Gribble, F., Reimann, F., Holst, J.J., y col. (2014). The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metab* 20, 1018-1029.
- Parks, B.W., Nam, E., Org, E., Kostem, E., Norheim, F., Hui, S.T., Pan, C., Civelek, M., Rau, C.D., Bennett, B.J., y col. (2013). Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metabolism* 17, 141-152.
- Power, M.L., and Schulkin, J. (2008). Anticipatory physiological regulation in feeding biology: Cephalic phase responses. *Appetite* 50, 194-206.
- Rice, K.C., y Bayles, K.W. (2008). Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 85-109.
- Sharon, G., Garg, N., Debelius, J., Knight, R., Dorrestein, Pieter C., y Mazmanian, Sarkis K. (2014). Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metabolism* 20, 719-730.
- Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S., Huang, X.-F., y col. (2013). Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metabolism* 17, 236-248.
- Smith, M.A., Hisadome, K., Al-Qassab, H., Heffron, H., Withers, D.J., y Ashford, M.L. (2007). Melanocortins and agouti-related protein modulate the excitability of two arcuate nucleus neuron populations by alteration of resting potassium conductances. *J Physiol* 578, 425-438.
- Steinert, R.E., Schirra, J., Meyer-Gerspach, A.C., Kienle, P., Fischer, H., Schulte, F., Goeke, B., y Beglinger, C. (2014). Effect of glucagon-like peptide-1 receptor antagonism on appetite and food intake in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 100, 514-523.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., y Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH - arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8, 1356-1363.
- Takagi, K., Legrand, R., Asakawa, A., Amitani, H., François, M., Tennoune, N., Coëffier, M., Claeysens, S., do Rego, J.-C., Déchelotte, P., y col. (2013). Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans. *Nat Commun* 4:2685.
- Tennoune, N., Chan, P., Breton, J., Legrand, R., Chabane, Y.N., Akkermann, K., Jarv, A., Ouelaa, W., Takagi, K., Ghoulali, I., y col. (2014). Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide [alpha]-MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry* 4, e458.
- Tennoune, N., Legrand, R., Ouelaa, W., Breton, J., Lucas, N., Bole-Feysot, C., Rego, J.-C.d., Déchelotte, P., y Fetissov, S.O. (2015). Sex-related effects of nutritional supplementation of *Escherichia coli*: Relevance to eating disorders. *Nutrition* 31, 498-507.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., y Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1131.
- van der Klaauw, A.A., Keogh, J.M., Henning, E., Trowse, V.M., Dhillon, W.S., Ghatei, M.A., y Farooqi, I.S. (2013). High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release. *Obesity* 21, 1602-1607.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E., y Gewirtz, A.T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science* 328, 228-231.
- Wick, L.M., Quadroni, M., y Egli, T. (2001). Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environ Microbiol* 3, 588-599.
- Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., y Reichardt, L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6, 736-742.
- Yun, A.J., Lee, P.Y., Doux, J.D., y Conley, B.R. (2006). A general theory of evolution based on energy efficiency: its implications for diseases. *Medical Hypotheses* 66, 664-670.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM
Centro Hospitalario Universitario de Rouen
5 Universidad de Rouen
TargEDys

<120> Composiciones farmacéuticas y alimenticias para inducir la saciedad y prolongar la saciedad en sujetos que lo necesitan

10 <130> BET16P0657

<150> PCT/IB2015/001126

<151> 05-06-2015

15 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 857

<212> PRT

<213> Escherichia coli

25 <400> 1

Met Arg Leu Asp Arg Leu Thr Asn Lys Phe Gln Leu Ala Leu Ala Asp
1 5 10 15

Ala Gln Ser Leu Ala Leu Gly His Asp Asn Gln Phe Ile Glu Pro Leu
20 25 30

His Leu Met Ser Ala Leu Leu Asn Gln Glu Gly Gly Ser Val Ser Pro
35 40 45

Leu Leu Thr Ser Ala Gly Ile Asn Ala Gly Gln Leu Arg Thr Asp Ile
50 55 60

Asn Gln Ala Leu Asn Arg Leu Pro Gln Val Glu Gly Thr Gly Gly Asp
65 70 75 80

Val Gln Pro Ser Gln Asp Leu Val Arg Val Leu Asn Leu Cys Asp Lys
85 90 95

Leu Ala Gln Lys Arg Gly Asp Asn Phe Ile Ser Ser Glu Leu Phe Val
100 105 110

Leu Ala Ala Leu Glu Ser Arg Gly Thr Leu Ala Asp Ile Leu Lys Ala
115 120 125

Ala Gly Ala Thr Thr Ala Asn Ile Thr Gln Ala Ile Glu Gln Met Arg
130 135 140

Gly Gly Glu Ser Val Asn Asp Gln Gly Ala Glu Asp Gln Arg Gln Ala

ES 2 835 268 T3

145					150					155				160
Leu	Lys	Lys	Tyr	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Glu	Gln	Gly
			165						170					175
Leu	Asp	Pro	Val	Ile	Gly	Arg	Asp	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Thr	Ile
			180					185					190	Gln
Val	Leu	Gln	Arg	Arg	Thr	Lys	Asn	Asn	Pro	Val	Leu	Ile	Gly	Glu
		195					200					205		Pro
Gly	Val	Gly	Lys	Thr	Ala	Ile	Val	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile
	210					215					220			Ile
Asn	Gly	Glu	Val	Pro	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Arg	Arg	Val	Leu	Ala
225					230					235				Leu
Asp	Met	Gly	Ala	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu	Phe
			245						250					255
Glu	Arg	Leu	Lys	Gly	Val	Leu	Asn	Asp	Leu	Ala	Lys	Gln	Glu	Gly
			260					265					270	Asn
Val	Ile	Leu	Phe	Ile	Asp	Glu	Leu	His	Thr	Met	Val	Gly	Ala	Gly
		275					280					285		Lys
Ala	Asp	Gly	Ala	Met	Asp	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	Lys	Pro	Ala	Leu
290						295					300			Ala
Arg	Gly	Glu	Leu	His	Cys	Val	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Tyr
305					310					315				Arg
Gln	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Phe	Gln	Lys
				325					330					335
Phe	Val	Ala	Glu	Pro	Ser	Val	Glu	Asp	Thr	Ile	Ala	Ile	Leu	Arg
			340					345					350	Gly
Leu	Lys	Glu	Arg	Tyr	Glu	Leu	His	His	His	Val	Gln	Ile	Thr	Asp
		355					360					365		Pro
Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	His	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp
370						375					380			Arg
Gln	Leu	Pro	Asp	Lys	Ala	Ile	Asp	Leu	Ile	Asp	Glu	Ala	Ala	Ser
385					390					395				Ser
Ile	Arg	Met	Gln	Ile	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu	Asp	Arg	Leu
				405					410					415
Arg	Arg	Ile	Ile	Gln	Leu	Lys	Leu	Glu	Gln	Gln	Ala	Leu	Met	Lys
			420					425					430	Glu
Ser	Asp	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Arg	Leu	Asp	Met	Leu	Asn	Glu	Glu
		435					440					445		Leu
Ser	Asp	Lys	Glu	Arg	Gln	Tyr	Ser	Glu	Leu	Glu	Glu	Glu	Trp	Lys
450						455					460			Ala
Glu	Lys	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Thr	Gln	Thr	Ile	Lys	Ala	Glu	Leu
465					470					475				Glu
Gln	Ala	Lys	Ile	Ala	Ile	Glu	Gln	Ala	Arg	Arg	Val	Gly	Asp	Leu
				485					490					495
Arg	Met	Ser	Glu	Leu	Gln	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Glu	Leu	Glu	Lys
			500					505					510	Gln
Leu	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln	Leu	Glu	Gly	Lys	Thr	Met	Arg	Leu	Leu
		515					520					525		Arg
Asn	Lys	Val	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Arg	Trp
530					535						540			Thr
Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Met	Met	Glu	Ser	Glu	Arg	Glu	Lys	Leu
545					550					555				560
Arg	Met	Glu	Gln	Glu	Leu	His	His	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Asn	Glu
				565					570					575
Val	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Ile	Arg	Arg	Ser	Arg	Ala	Gly	Leu
			580					585					590	Ala
Asp	Pro	Asn	Arg	Pro	Ile	Gly	Ser	Phe	Leu	Phe	Leu	Gly	Pro	Thr
		595					600					605		Gly
Val	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	Ala	Leu	Ala	Asn	Phe	Met	Phe
	610					615					620			Asp
Ser	Asp	Glu	Ala	Met	Val	Arg	Ile	Asp	Met	Ser	Glu	Phe	Met	Glu
625					630					635				Lys
His	Ser	Val	Ser	Arg	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Val	Gly
				645					650					655
														Tyr

ES 2 835 268 T3

Glu Glu Gly Gly Tyr Leu Thr Glu Ala Val Arg Arg Arg Pro Tyr Ser
 660 665 670
 Val Ile Leu Leu Asp Glu Val Glu Lys Ala His Pro Asp Val Phe Asn
 675 680 685
 Ile Leu Leu Gln Val Leu Asp Asp Gly Arg Leu Thr Asp Gly Gln Gly
 690 695 700
 Arg Thr Val Asp Phe Arg Asn Thr Val Val Ile Met Thr Ser Asn Leu
 705 710 715
 Gly Ser Asp Leu Ile Gln Glu Arg Phe Gly Glu Leu Asp Tyr Ala His
 725 730 735
 Met Lys Glu Leu Val Leu Gly Val Val Ser His Asn Phe Arg Pro Glu
 740 745 750
 Phe Ile Asn Arg Ile Asp Glu Val Val Val Phe His Pro Leu Gly Glu
 755 760 765
 Gln His Ile Ala Ser Ile Ala Gln Ile Gln Leu Lys Arg Leu Tyr Lys
 770 775 780
 Arg Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Glu Ile His Ile Ser Asp Glu Ala Leu
 785 790 795
 Lys Leu Leu Ser Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Val Tyr Gly Ala Arg Pro
 805 810 815
 Leu Lys Arg Ala Ile Gln Gln Gln Ile Glu Asn Pro Leu Ala Gln Gln
 820 825 830
 Ile Leu Ser Gly Glu Leu Val Pro Gly Lys Val Ile Arg Leu Glu Val
 835 840 845
 Asn Glu Asp Arg Ile Val Ala Val Gln
 850 855

5 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2
 Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento no terapéutico cosmético para reducir la masa grasa en una relación masa magra a masa en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar oralmente al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB; donde la proteína ClpB comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con SEQ ID NO: 1.
2. El procedimiento según la reivindicación **1**, donde la bacteria que expresa la proteína ClpB es una cepa bacteriana probiótica.
3. El procedimiento según la reivindicación **1** o **2**, donde la bacteria que expresa la proteína ClpB es una cepa bacteriana de origen natural.
4. El procedimiento según la reivindicación **1** o **2**, donde la bacteria que expresa la proteína ClpB es modificada por ingeniería genética para expresar la proteína ClpB.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1** a **4**, donde la bacteria que expresa la proteína ClpB es una cepa de *E. coli*.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1** a **5**, donde la bacteria que expresa la proteína ClpB se somete a condiciones de estrés para regular positivamente la expresión de la proteína ClpB en la bacteria.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1** a **6**, donde la proteína ClpB o la bacteria que expresa la proteína ClpB se administra al sujeto en forma de una composición cosmética.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1** a **6**, donde la proteína ClpB o la bacteria que expresa la proteína ClpB se administra al sujeto en forma de una composición alimenticia.
9. El procedimiento según la reivindicación **8**, donde la bacteria que expresa la proteína ClpB se usa como un ingrediente alimentario o un ingrediente para pienso en dicha composición alimenticia.
10. El procedimiento según la reivindicación **8** o **9**, donde la composición alimenticia comprende al menos un prebiótico.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1** a **10**, donde la proteína ClpB o la bacteria que expresa la proteína ClpB se administra de manera simultánea o de manera secuencial con una comida del sujeto.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1** a **10**, donde la proteína ClpB o la bacteria que expresa la proteína ClpB se administra antes de la comida del sujeto.

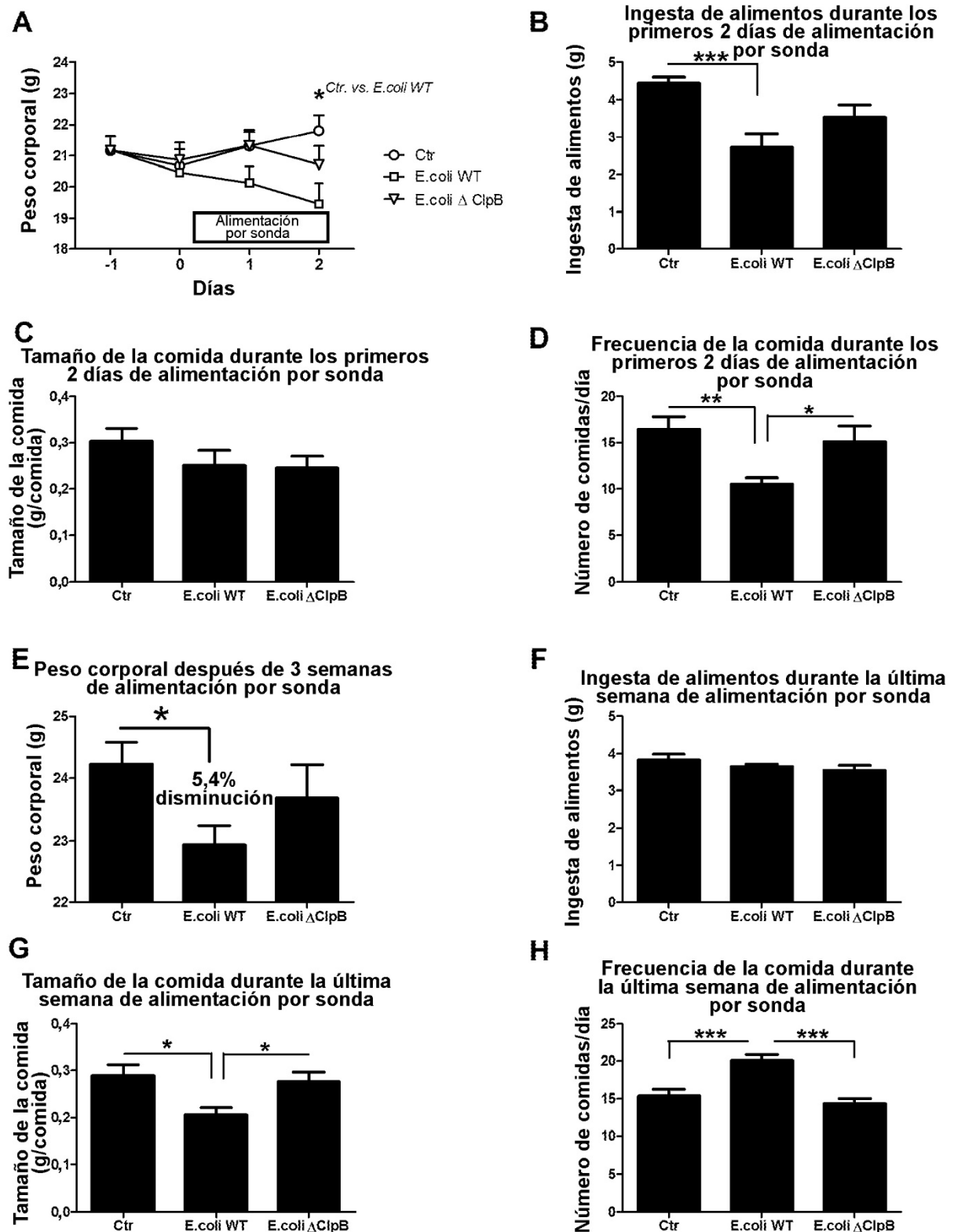


Fig. 1

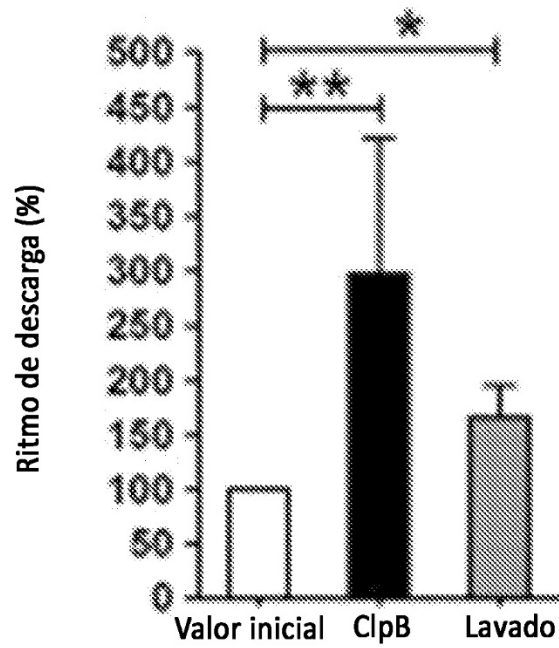


Fig. 2

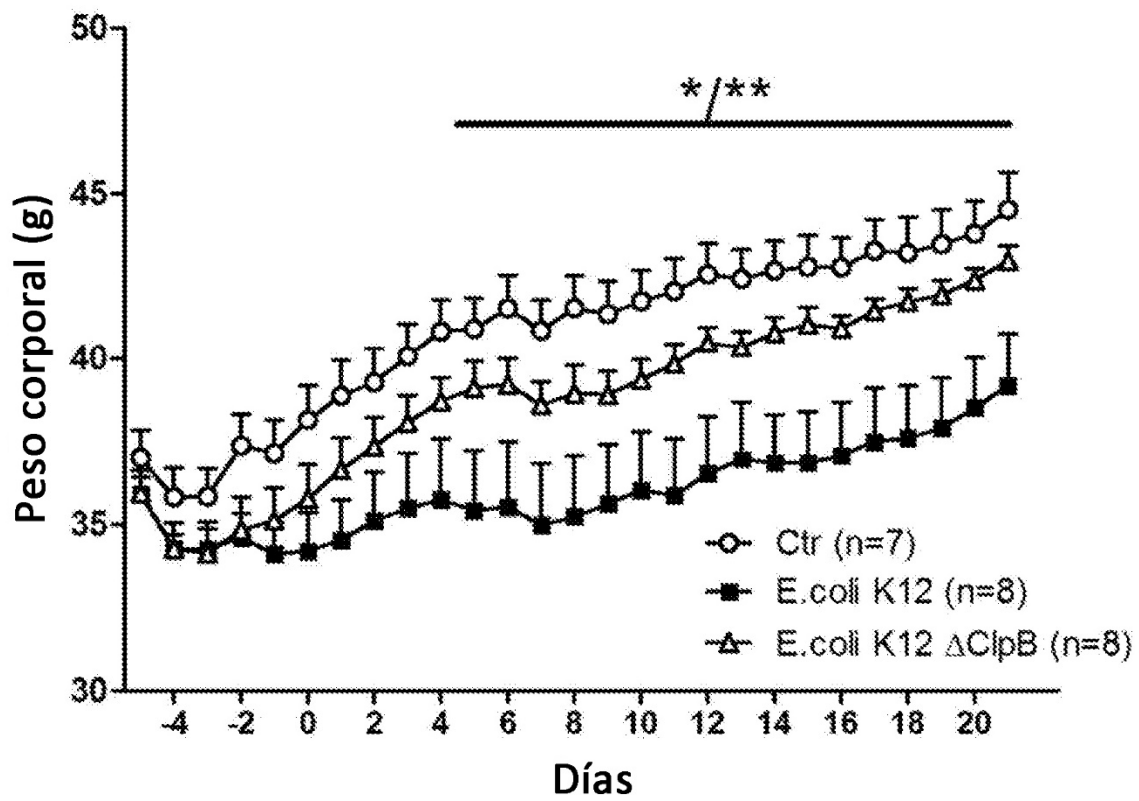


Fig. 3

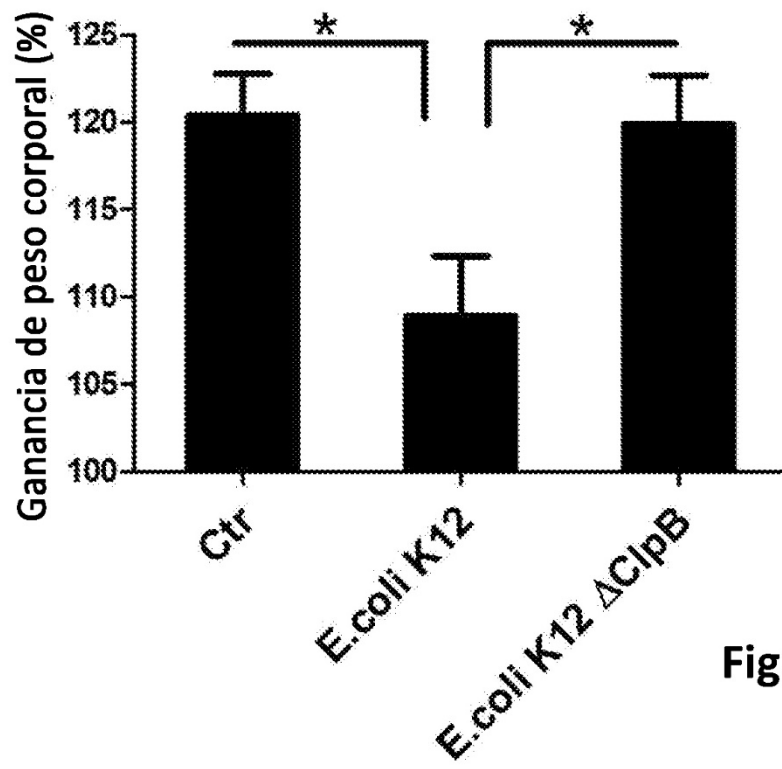


Fig. 4

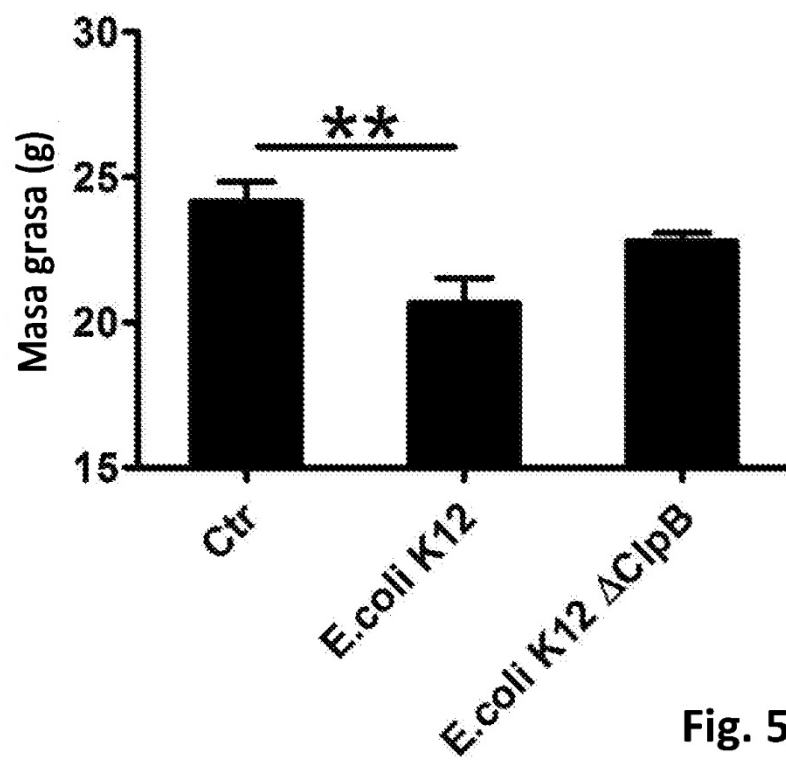
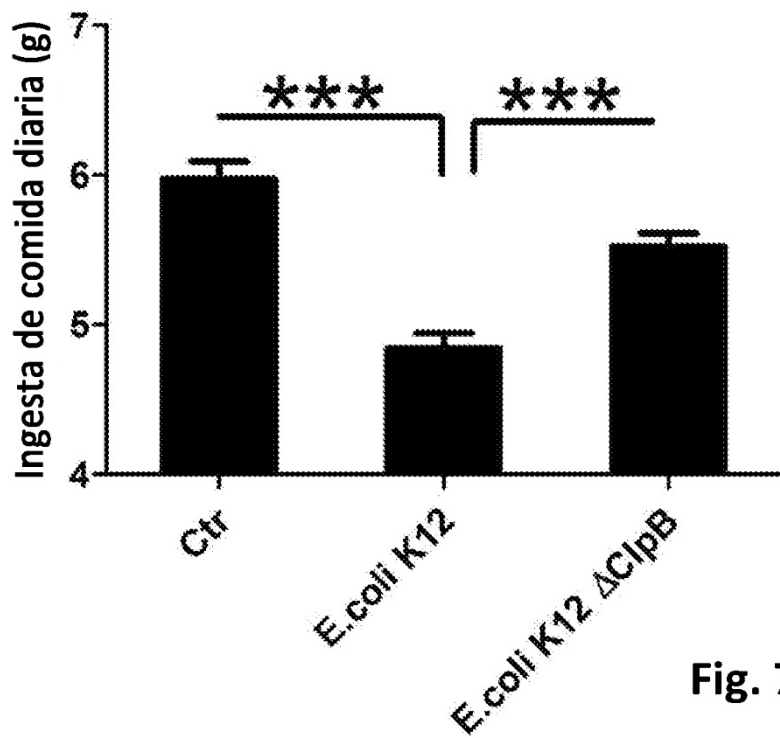
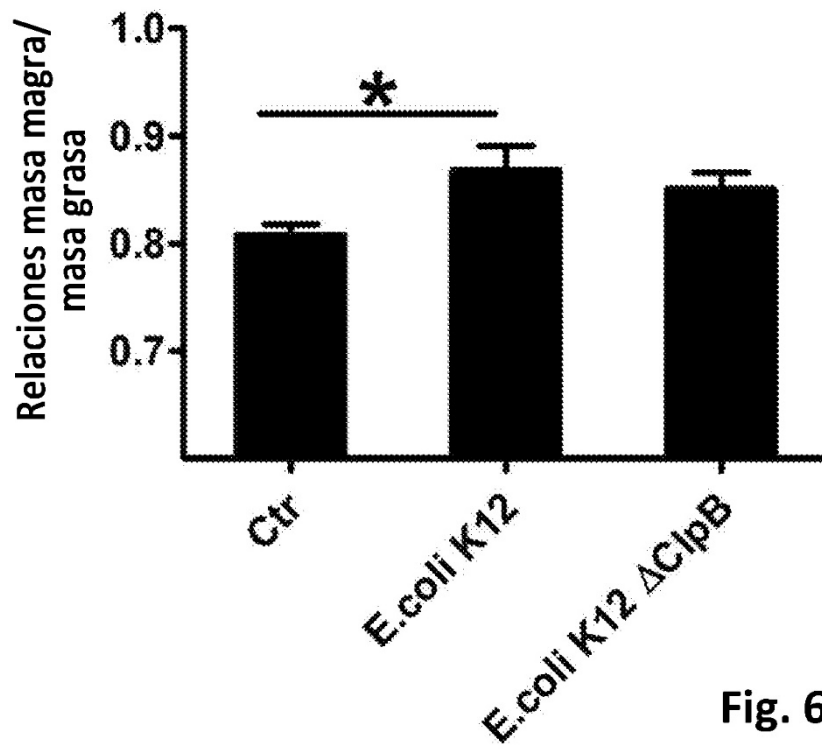


Fig. 5



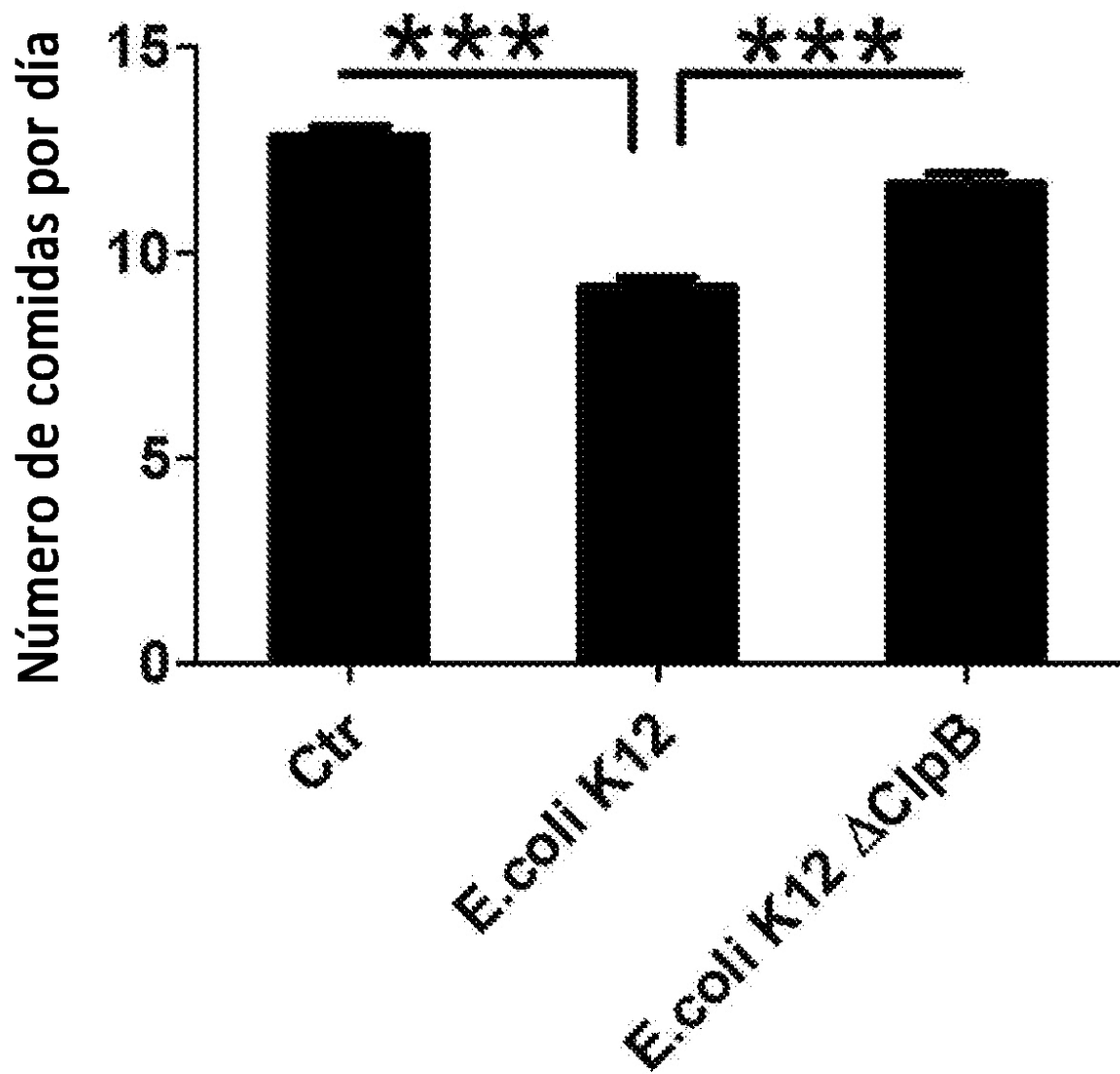
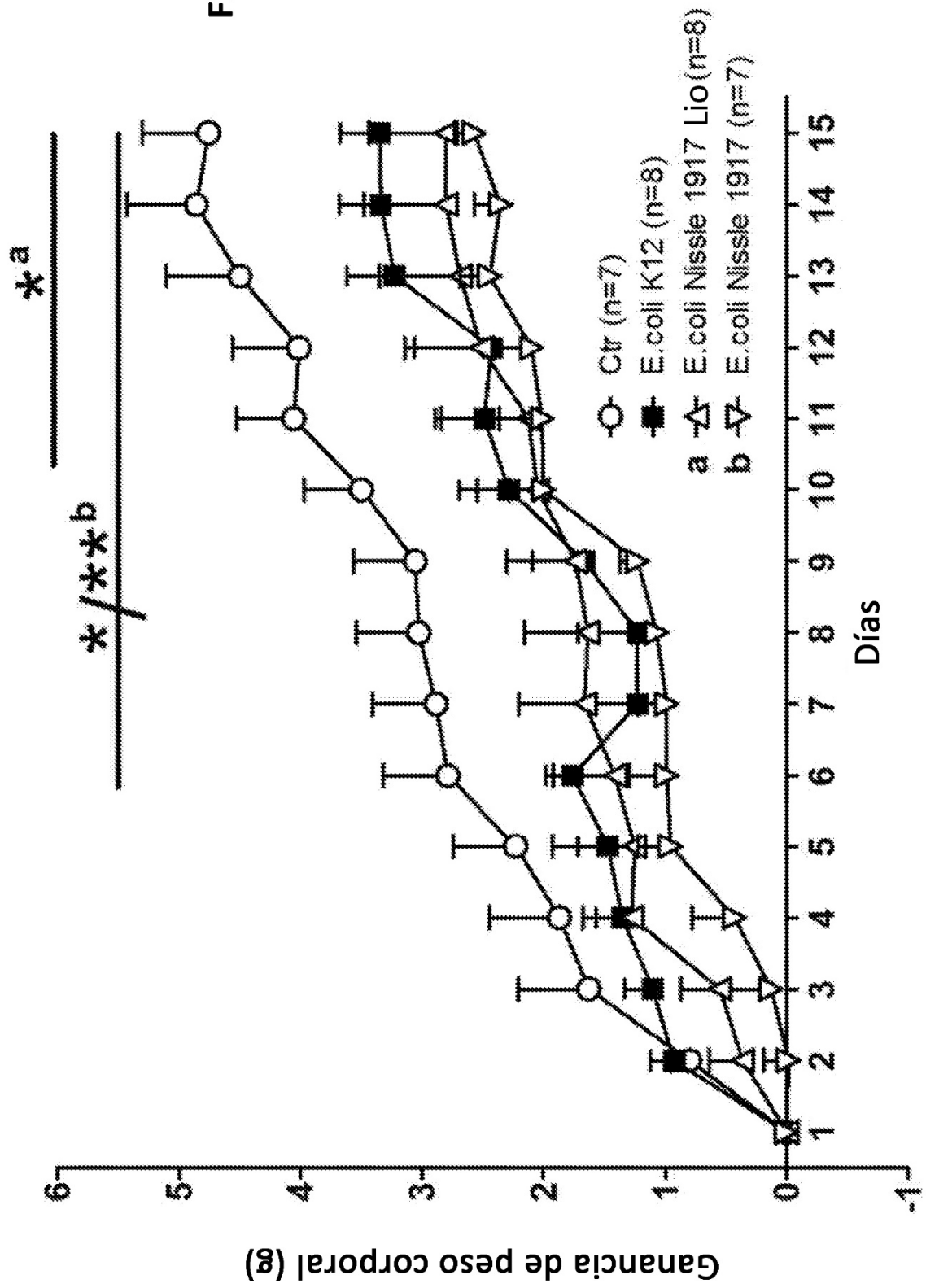


Fig. 8



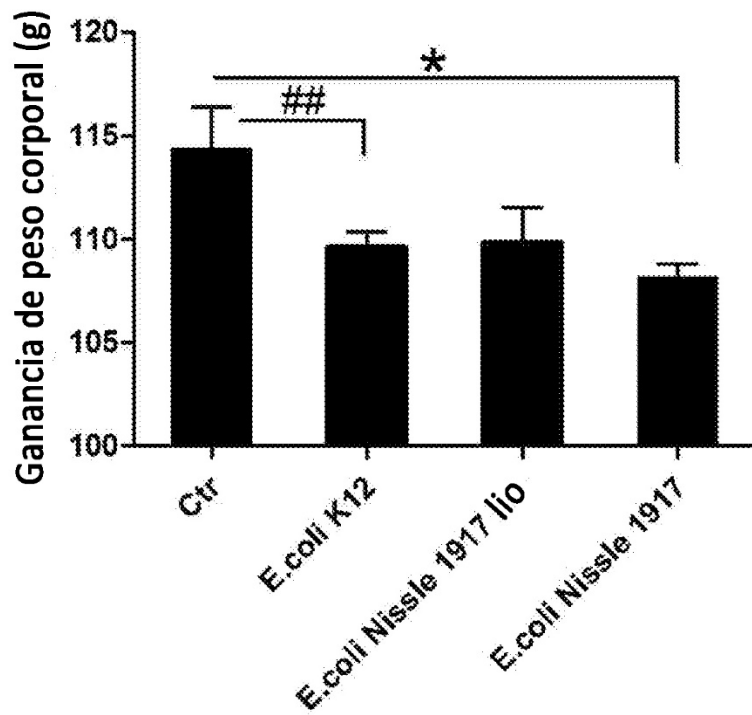


Fig. 10

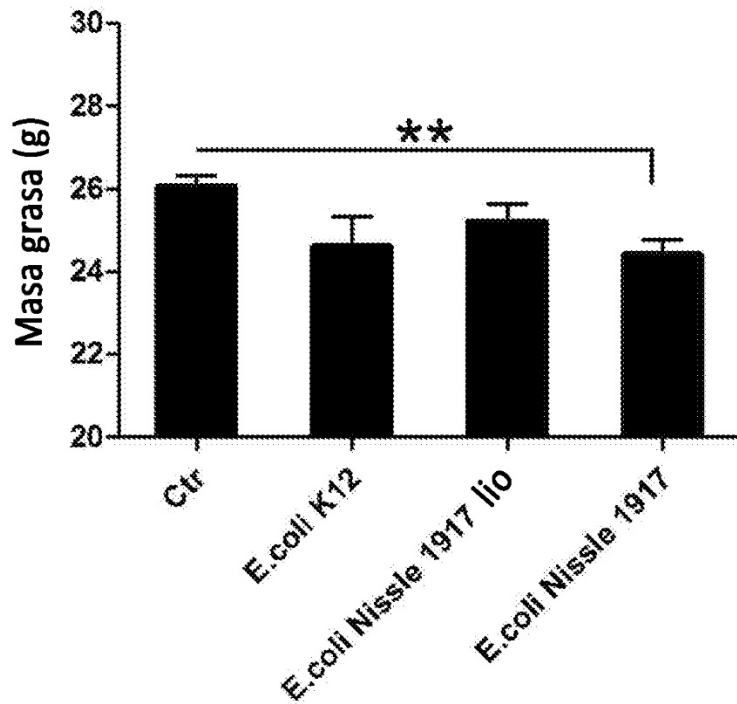


Fig. 11

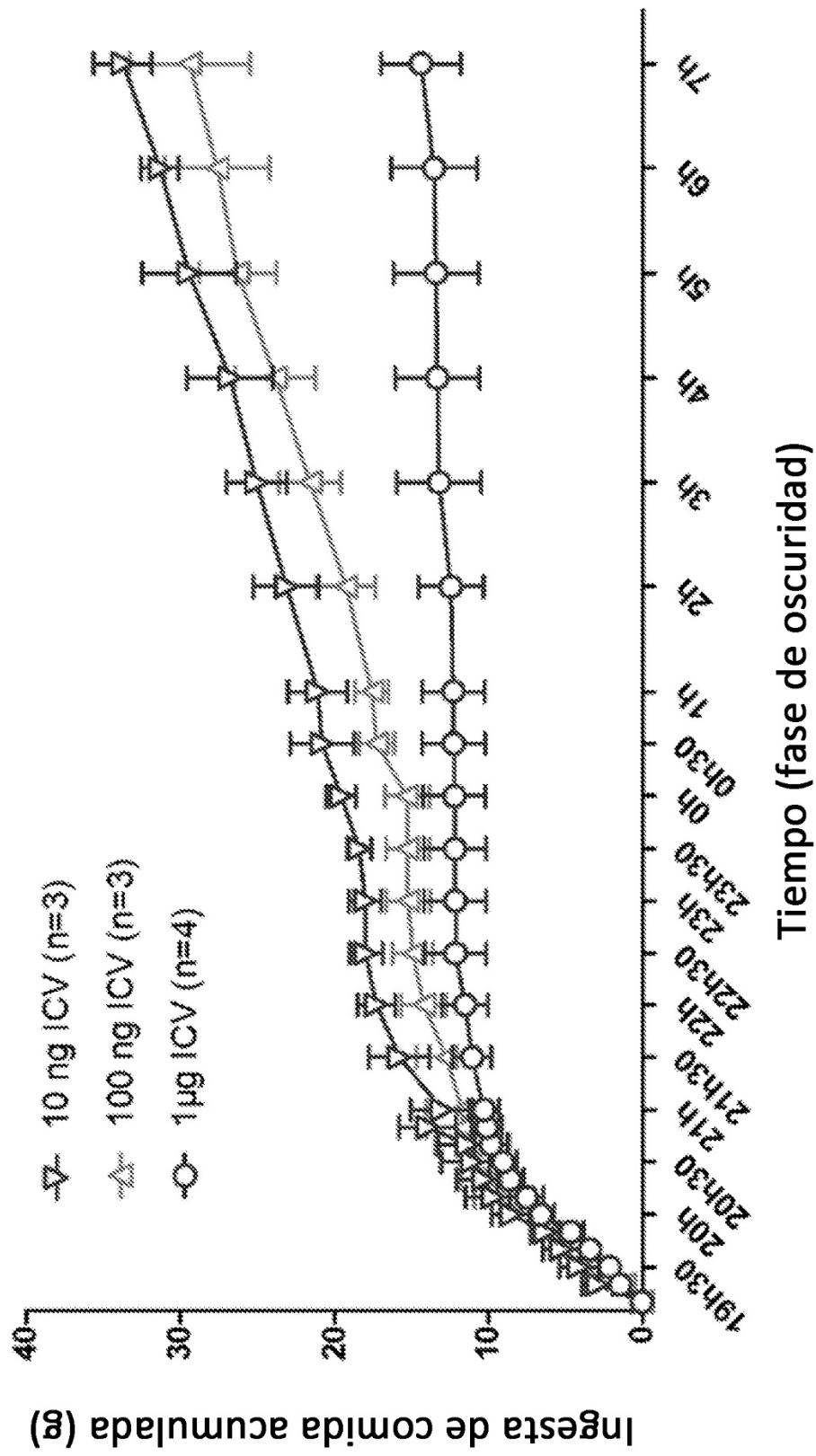


Fig. 12