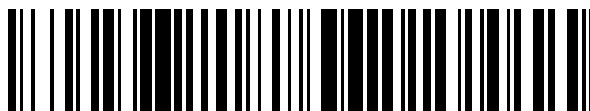


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 939**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2017** **PCT/EP2017/058116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017** **WO17174658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2017** **E 17716181 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3439684**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y alimenticias basadas en Hafnia alvei para inducir saciedad y prolongar la saciedad**

30 Prioridad:

05.04.2016 WO PCT/IB2016/051923

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2021

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13, FR;
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE ROUEN (25.0%);
TARGEDYS (25.0%) y
UNIVERSITÉ DE ROUEN (25.0%)

72 Inventor/es:

FETISSOV, SERGUEI;
DECHELOTTE, PIERRE;
BRETON, JONATHAN;
LAMBERT, GRÉGORI;
LEGRAND, ROMAIN y
LUCAS, NICOLAS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 808 939 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 farmacéuticas y alimenticias basadas en *Hafnia alvei* para inducir saciedad y prolongar la saciedad

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y alimenticias para inducir saciedad y prolongar la saciedad en sujetos que la necesitan.

10 Antecedentes de la invención

La composición de la microbiota intestinal se ha asociado con fenotipos metabólicos del hospedero (Ley y *otros* 2006) y la transferencia de microbiota "de obesidad" puede inducir adiposidad (Turnbaugh y *otros* 2006) e hiperfagia (Vijay-Kumar y *otros* 2010), lo que sugiere que la microbiota intestinal puede influir en el comportamiento de alimentación del hospedero. Aunque se desconocen los mecanismos subyacentes a los efectos de las bacterias intestinales en el apetito del hospedero, es probable que puedan utilizar vías moleculares del hospedero que controlan la ingestión de alimentos.

El modelo actual de control de la ingestión de alimentos implica la señalización de las hormonas del hambre y la saciedad derivadas del intestino a varios circuitos cerebrales que regulan los aspectos homeostáticos y hedónicos de la alimentación (Berthoud, 2011; Inui, 1999; Murphy y Bloom, 2006). Destacan entre ellas las vías anorexigénicas y orexigénicas que se originan en el núcleo arqueado hipotalámico (ARC) que incluyen las neuronas proopiomelanocortina (POMC) y las neuronas relacionadas con el neuropéptido Y (NPY)/proteína agouti (AgRP), respectivamente, que transmiten hacia el núcleo paraventricular (PVN) (Atasoy y *otros* 2012; Cowley y *otros* 1999; Garfield y *otros* 2015; Shi y *otros* 2013). Las vías ARC y PVN convergen en el núcleo parabraquial lateral que envía proyecciones anorexigénicas a la amígdala central (CeA), que expresa el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Carter y *otros* 2013; Garfield y *otros* 2015).

Los mecanismos putativos del efecto de la microbiota intestinal en el control del apetito por parte del hospedero pueden involucrar sus actividades de recolección de energía (Turnbaugh y *otros* 2006) y la producción de transmisores neuroactivos y metabolitos (Dinan y *otros* 2015; Forsythe y Kunze, 2013; Sharon y *otros* 2014). Los inventores evidenciaron una implicación de las proteínas bacterianas que actúan directamente sobre las vías de control del apetito localmente en el intestino o sistémicamente. De hecho, se demostró que varias proteínas bacterianas muestran homología de secuencia con hormonas peptídicas que regulan el apetito (Fetissov y *otros* 2008), y recientemente la proteína ClpB producida por el intestino del comensal *Escherichia coli* (*E. coli*) se identificó como un antígeno mimético de la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) y *otros* 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 del α -MSH mediados por MC4R se atribuyen principalmente a sus sitios centrales de acciones (Mul y *otros* 2013), un estudio reciente mostró que la activación del MC4R en las células enteroendocrinas intestinales estimula la liberación de hormonas de saciedad péptido YY (PYY) y péptido tipo glucagón-1 (GLP-1) (Panaro y *otros* 2014). Por lo tanto, las moléculas similares a α -MSH derivadas de bacterias intestinales pueden actuar directamente sobre las células enteroendocrinas que sintetizan hormonas de saciedad.

Resumen

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y alimenticias para inducir saciedad y prolongar la saciedad en sujetos que la necesitan. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método para inducir saciedad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.

La presente invención se refiere además a un método para prolongar la saciedad en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.

La presente invención también se refiere a un método para reducir la cantidad de comida en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.

Otro objeto de la presente invención es un método para reducir la ingestión de alimentos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.

La presente invención se refiere además a un método para controlar el aumento de peso en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.

Un objeto adicional de la presente invención es un método para estimular la pérdida de peso en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.

En una modalidad, el sujeto no es obeso. En otra modalidad, el sujeto es obeso.

En una modalidad, *Hafnia alvei* se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica. En otra modalidad, *Hafnia alvei* se administra al sujeto en forma de una composición alimenticia.

- 5 En una modalidad, la composición alimenticia se selecciona del grupo que comprende composiciones alimenticias completas, suplementos alimenticios y composiciones nutraceuticas.

En una modalidad, *Hafnia alvei* es un probiótico. En otra modalidad, *Hafnia alvei* está inactivada.

- 10 En una modalidad, la composición alimenticia comprende al menos un prebiótico. En una modalidad, el al menos un prebiótico es fibras dietéticas.

Descripción detallada

- 15 Los inventores demostraron que la proteína ClpB o una bacteria que expresa la proteína ClpB es capaz de inducir saciedad, prolongar la saciedad, reducir la ingestión de alimentos, controlar el aumento de peso, estimular la pérdida de peso y/o reducir la masa grasa en la proporción de masa magra en un sujeto que lo necesita. De hecho, los inventores demostraron sorprendentemente que la proteína ClpB expresada por dicha bacteria tuvo una acción directa sobre la saciedad, la saciedad y la ingestión de alimentos, probablemente a través de receptores MCR, independientemente de cualquier reacción inmune que pudiera ser inducida por la administración de bacterias.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para inducir saciedad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma.

- 25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para su uso para inducir saciedad en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

- 30 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para inducir saciedad en un sujeto, en particular en un sujeto con peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

- 35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para prolongar la saciedad en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína o variante ClpB de la misma.

- 40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para su uso para prolongar la saciedad en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

- 45 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para prolongar la saciedad en un sujeto, en particular en un sujeto con peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para reducir la cantidad de comida en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB o variante de la misma.

- 50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para su uso para reducir la cantidad de comida en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

- 55 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para reducir la cantidad de comida en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

- 60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para reducir la ingestión de alimentos en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB o variante de la misma.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para su uso para reducir la ingestión de alimentos en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

65

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para reducir la ingestión de alimentos en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

5 Un aspecto adicional de la presente invención también se refiere a un método para controlar, en particular reducir, el aumento de peso en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para su uso para controlar, en particular reducir, el aumento de peso en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para controlar, en particular reducir, el aumento de peso en un sujeto, en particular en un sujeto con peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

Otro aspecto de la presente invención también se refiere a un método para estimular la pérdida de peso en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB o variante de la misma.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para su uso para estimular la pérdida de peso en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para estimular la pérdida de peso en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

30 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para reducir la masa grasa en la proporción de masa magra en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína ClpB o una variante de la misma, o una cantidad efectiva de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína ClpB o una variante de la misma, o una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma, para su uso para reducir la masa grasa en la proporción de masa magra en un sujeto que lo necesita, en particular en un sujeto obeso.

40 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso cosmético no terapéutico de una proteína ClpB o una variante de la misma, o de una bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma para reducir la proporción de masa grasa en masa magra en un sujeto, en particular en un sujeto con peso normal o sobrepeso sin complicaciones.

45 Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a un animal de sangre caliente, preferentemente un ser humano, una mascota o ganado. Como se usa en la presente, los términos "mascota" y "ganado" incluyen, entre otros, perros, gatos, cobayas, conejos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos y aves de corral. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto masculino o femenino. En algunas modalidades, el sujeto es un adulto (por ejemplo, un sujeto humano mayor de 18 años). En otra modalidad, el sujeto es un niño (por ejemplo, un sujeto humano menor de 18 años). En algunas modalidades, el sujeto puede ser un "paciente", es decir un sujeto que/el cual está esperando recibir, o está recibiendo atención médica o fue/es/será objeto de un procedimiento médico de acuerdo con los métodos de la presente invención, o es monitoreado por el desarrollo de una enfermedad.

50 En algunas modalidades, el sujeto es obeso. "Obesidad" se refiere en la presente descripción a una afección médica en donde el sujeto tiene preferentemente un IMC > 30. El "IMC" o "índice de masa corporal" se define como la masa corporal del sujeto dividida por el cuadrado de su altura. Las fórmulas universalmente utilizadas en la medicina producen una unidad de medida de kg/m².

55 En algunas modalidades, el sujeto es moderadamente obeso. Un sujeto "moderadamente obeso" se refiere a un sujeto que tiene un IMC de entre 30 y 35.

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

En algunas modalidades, el sujeto no es femenino. Típicamente, el sujeto no obeso tiene un peso corporal normal. El "peso corporal normal" se refiere en la presente descripción al peso corporal que da como resultado un IMC de entre 18,5 y 25.

65

En algunas modalidades, el sujeto es sobrepeso. "Sobrepeso" se refiere en la presente descripción al peso corporal que resulta en un IMC de entre 25 y 30. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto con sobrepeso sano o con sobrepeso no complicado. Por "sobrepeso saludable" o "sobrepeso no complicado" se refiere en la presente descripción como un sujeto con sobrepeso que no muestra ninguna enfermedad o afección directamente asociada con su peso.

En algunas modalidades, el sujeto está bajo una dieta para adelgazar y/o quiere perder peso. En otras modalidades, el sujeto no está bajo una dieta para adelgazar y/o no quiere perder peso.

Como se usa en la presente, el término "saciedad" se refiere a un estado esencialmente homeostático en donde un individuo siente que sus antojos se satisfacen o minimizan. 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 también la sensación de llenura del estómago, pueden contribuir a que un individuo se sienta "saciado". Más en particular, la "saciedad" es el estado en el que se inhibe el consumo adicional y determina el tiempo entre comidas y la cantidad de alimentos consumidos en la próxima comida. Una "sensación de saciedad mejorada" o similares, tiene el significado de que la sensación de saciedad es más pronunciada y/o más prolongada en comparación con una situación control.

El término "saciedad", como se usa en la presente, se refiere al estado que finaliza el comer dentro de una comida, que típicamente ocurre/se observa dentro de un período (por ejemplo, 20-30 min) después del comienzo del consumo de la comida. Por lo tanto, cada vez que se hace referencia en la presente a "inducir saciedad" o similar, esto tiene el significado de despertar la tendencia de un sujeto a dejar de consumir alimentos durante una comida. El efecto sobre la saciedad puede determinarse al puntuar el momento de la terminación de 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 puede calificarse la reducción de 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 preferentemente de manera significativa (reducido o menos aumentado) en comparación con los sujetos control. Como se usa en la presente, el "sujeto control" se refiere a los sujetos que no se administraron con la cepa bacteriana probiótica de la presente invención.

Como se usa en la presente, 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. ClpB se describió como un factor esencial para la termotolerancia adquirida y para la virulencia e infectividad de varias bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella thyphimurium*. En *E. coli* K12, la proteína chaperona ClpB también conocida como proteína de choque térmico F84.1 o htpM y es una proteína de 857 aminoácidos. Típicamente, 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 Número UniProtKB/Swiss-Prot: P63284, disponible el 6 de noviembre de 2013). Típicamente, la secuencia de aminoácidos de la proteína chaperona ClpB comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos del 96 al 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, 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 utilizando un alineamiento global (es decir las dos secuencias se comparan en toda su longitud). Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias se conocen bien en la técnica. Puede utilizarse, por ejemplo, el programa "needle", que utiliza el algoritmo de alineamiento global Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para encontrar el alineamiento óptimo (incluyendo los espacios) de dos secuencias cuando se considera su longitud completa. El programa needle está, por ejemplo, disponible en el sitio web mundial ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad de acuerdo con la invención se calcula preferentemente usando el programa EMBOSS: needle (global) con un parámetro "Espacio Abierto" igual a 10,0, un parámetro "Espacio Extendido" igual a 0,5 y una matriz Blosum62.

De acuerdo con la invención, la proteína ClpB imita a la proteína alfa-MSH para inducir la saciedad. Por lo tanto, en algunas modalidades, la proteína ClpB de la presente invención es reconocida por un anticuerpo anti-alfa-MSH. Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal tal como IgG anti- α -MSH policlonal de conejo (1:1000, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, EE. UU.). La secuencia de aminoácidos de α -MSH comprende o consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos SYSMEHFRWGKPV (SEQ ID NO: 2) (Gen Pept Secuencia ID, PRF: 223274, disponible el 2 de diciembre de 2013).

SEQ ID NO: 1:

MRLDRLTNKF QLALADAQSL ALGHDNQFIE PLHLMSALLN QEGGSVSPLL
 TSAGINAGQL RTDINQALNR LPQVEGTGGD VQPSQDLVRV LNLCDKLAQK
 RGDNFISSEL FVLAALERSG TLADILKAAG ATTANITQAI EQMRGGESVN
 DQGAEDQRQA LKKYTIDLTE RAEQGKLDPV IGRDEEIRRT IQVLQRRTKN
 NPVLIGEPGV GKTAIVEGLA QRIINGEVPE GLKGRRVLAL DMGALVAGAK
 YRGEFEERLK GVLNDLAKQE GNVILFIDEL HTMVGAGKAD GAMDAGNMLK
 PALARGELHC VGATTLDEYR QYIEKDAALE RRFQKVFVAE PSVEDTIAIL
 RGLKERYELH HHVQITDPAI VAAATLSHRY IADRQLPDKA IDLIDEAASS
 IRMQIDSKPE ELDRDLRRH QLKLEQQALM KESDEASKKR LDMLNEELSD
 KERQYSELEE EWKAEEKASLS GTQTIKAELE QAKIAIEQAR RVGDLARMSE
 LQYGKIPLE KQLEAATQLE GKTMRLLRNK VTDAEIAEVL ARWTGIPVSR
 MMESEREKLL RMEQELHHRV IGQNEAVDAV SNAIRRSRAG LADPNRPIGS
 FLFLGPTGVG KTELCKALAN FMFDSDEAMV RIDMSEFMEK HSVSRLVGAP
 PGYVGYYEEGG YLTEAVRRRP YSVILLDEVE KAHPDVFNIL LQVLDDGRLT
 DGQGRTVDFR NTVVIMTSNL GSDLIQERFG ELDYAHMKEL VLGVVSHNFR
 PEFINRIDEV VVFHPLGEQH IASIAQIQLK RLYKRLEERG YEIHISDEAL
 KLLSENGYDP VYGARPLKRA IQQIENPLA QQILSGELVP GKVIRLEVNE
 DRIVAVQ

Como se usa en la presente, los "aminoácidos" están representados por su nombre completo, su código de tres letras o su código de una letra, como se conoce bien en la técnica. Los residuos de aminoácidos en los péptidos se abrevian como sigue: La fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G.

Como se usa en la presente, el término "aminoácidos" incluye aminoácidos tanto naturales como sintéticos, y ambos aminoácidos D y L. "Aminoácido estándar" o "aminoácido de origen natural" se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar que se encuentran comúnmente en péptidos de origen natural. "Residuo de aminoácido no estándar" se refiere a cualquier aminoácido, distinto a los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara por síntesis o se obtiene a partir de una fuente natural. Por ejemplo, la naftilalanina puede sustituirse por triptófano para facilitar la síntesis. Otros aminoácidos sintéticos que pueden sustituirse incluyen, entre otros, L-hidroxipropilo, L-3,4-dihidroxifenilalanilo, alfa-aminoácidos como L-alfa-hidroxilisilo y D-alfa-metilalanilo, L-alfa-metilalanilo, beta-aminoácidos e isoquinolilo.

Como se usa en la presente descripción, "aminoácido" abarca también aminoácidos modificados químicamente, que incluyen pero sin limitarse a sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas), y/o sustituciones. Los aminoácidos dentro de los polipéptidos de la presente invención, y particularmente en el carboxi o amino terminal, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la vida media circulante del polipéptido sin afectar negativamente su actividad. Adicionalmente, un enlace disulfuro puede estar presente o ausente en los polipéptidos de la invención.

La proteína ClpB o una variante de la misma de la invención puede comprender aminoácidos estándar naturales o aminoácidos no estándar. Los polipéptidos miméticos incluyen polipéptidos que tienen las siguientes modificaciones:
 i) polipéptidos en los que una o más de las uniones (enlaces) peptidil-C(O)NR- se reemplazaron por un enlace no peptidilo tal como un enlace -CH₂-carbamato (-CH₂OC(O)NR-), un enlace fosfonato, un enlace -CH₂-sulfonamida (-CH₂-SO₂NR-), un enlace urea (-NHC(O)NH-), un enlace -CH₂-amina secundaria, o con un enlace de peptidilo alquilado (-C(O)NR-) en donde R es C₁-C₄alquilo;

ii) polipéptidos en donde el N terminal se derivatiza a un grupo -NRR₁, a un grupo -NRC(O)R, a un grupo -NRC(O)OR, a un grupo -NRS(O)₂R, a un grupo -NHC(O)NHR donde R y R₁ son hidrógeno o C₁-C₄ alquilo con la condición de que R y R₁ no son ambos hidrógeno;

iii) polipéptidos en donde el C terminal se derivatiza a -C(O)R₂ donde R₂ se selecciona del grupo que consiste en C₁-C₄ alcoxi y -NR₃R₄ donde R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y C₁-C₄ alquilo.

En una modalidad particular, la proteína ClpB o una variante de la misma comprende o consiste de una secuencia de aminoácidos con núm. de ident.: 1 o una variante de la misma. En una modalidad particular, la proteína ClpB comprende o consiste de una secuencia de aminoácidos con núm. de ident.: 1.

En una modalidad, una "variante de ClpB" como se usa en la presente comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de secuencia de al menos 70 % con la secuencia de aminoácidos con núm. de ident.: 1, preferentemente de al menos 80 %, con mayor preferencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor.

Como se usa en la presente, el término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más secuencias de aminoácidos, se refiere al grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos, según lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el por ciento de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con interrupción en el alineamiento (si las hay) dirigidos por un modelo matemático o programa de computadora particular (es decir, "algoritmos"). Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias se conocen bien en la técnica. Tales métodos incluyen, entre otros, los descritos en Arthur M. Lesk, Computational Molecular Biology: Sources and Methods for Sequence Analysis (Nueva York: Oxford University Press, 1988); Douglas W. Smith, Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Nueva York: Academic Press, 1993); Hugh G. Griffin y Annette M. Griffin, A Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1 (Nueva Jersey: Humana Press, 1994); Gunnar von Heinje, Sequence Analysis in Molecular Biology: Treasure Trove o Trivial Pursuit (Academic Press, 1987); Michael Gribskov y John Devereux, Sequence Analysis Primer (Nueva York: M. Stockton Press, 1991); y Carillo y otros, 1988. SIAM J. Appl. Math. 48(5):1073-1082. Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mejor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas de computadora disponibles públicamente. Los métodos de programa de computadora para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programa GCG, que incluye GAP (Devereux y otros, 1984. Nucl. Acid. Res. 12(1 Pt 1):387-395; Grupo de Computación Genética, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, TBLASTN y FASTA (Altschul y otros, 1990. J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410). El programa BLASTX está disponible públicamente a partir del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y otros NCB/NLM/NIH Bethesda, Md.D 20894; Altschul y otros, 1990. J. Mol. Biol 215(3):403-410). El programa "needle", que utiliza el algoritmo de alineamiento global Needleman-Wunsch (Needleman SB y Wunsch CD (1970). J Mol Biol 48, 443-453) para encontrar el alineamiento óptimo (incluyendo los espacios) de dos secuencias cuando se considera su longitud completa, puede utilizarse preferentemente. El programa needle está, por ejemplo, disponible en el sitio web mundial ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad de acuerdo con la invención se calcula preferentemente usando el programa EMBOSS: needle (global) con un parámetro "Espacio Abierto" igual a 10,0, un parámetro "Espacio Extendido" igual a 0,5 y una matriz Blosum62. El bien conocido algoritmo de Smith Waterman también puede utilizarse para determinar la identidad.

El término "variante" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que típicamente difiere de un polipéptido específicamente descrito en la presente descripción en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en la presente descripción y/o mediante el uso de cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden hacerse modificaciones en la estructura de los polipéptidos y aún obtener una molécula funcional que codifica una variante o derivado de polipéptido con características convenientes.

Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante o porción de un ligando de la invención equivalente, o incluso mejorada, de un polipéptido de la descripción, un experto en la técnica modificará típicamente uno o más de los codones de la secuencia codificante de ADN. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin una pérdida de función apreciable en comparación con la proteína ClpB con la SEQ ID NO: 1.

Determinadas sustituciones de secuencia de aminoácidos pueden realizarse en una secuencia de proteína y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que pueden hacerse varias modificaciones en las secuencias peptídicas de las composiciones descritas o en las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica. En muchos casos, una variante de polipéptido contendrá una o más sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos podría esperar que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no se modifiquen sustancialmente. Como se explicó anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones ilustrativas

- que toman en consideración varias de las características anteriores se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse además sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar modificaciones conservadoras incluyen: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; and (5) Phe, Tyr, Trp, His.
- Como se usa en la presente, el término "sustitución conservadora de aminoácidos" puede definirse además como un intercambio de aminoácidos dentro de uno de los siguientes cinco grupos:
- (i) residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
 - (ii) residuos polares cargados negativamente y sus amidas: Asn, Asp, Glu, Gln;
 - (iii) Residuos polares con carga positiva: His, Arg, Lys;
 - (iv) residuos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys;
 - (v) residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.
- Una variante puede contener además, o alternativamente, modificaciones no conservadoras. En una modalidad preferida, las variantes de polipéptido difieren de una secuencia nativa por sustitución, delección o adición de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos. Las variantes pueden modificarse además (o alternativamente), por ejemplo, por la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.
- En una modalidad, una variante de SEQ ID NO: 1 es capaz de inducir saciedad, prolongar la saciedad, reducir la ingestión de alimentos, controlar el aumento de peso, estimular la pérdida de peso y/o reducir la relación masa grasa en masa magra en un sujeto que lo necesita con una eficiencia al menos equivalente a la de la sec. con núm. ident.: 1.
- En una modalidad, una variante de SEQ ID NO: 1 comprende sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 1, tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- En otra modalidad, una variante de la SEQ ID NO: 1 es un polipéptido en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO: 1 está/están ausente(s), o está sustituido por cualquier aminoácido, o en donde se añaden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos (contiguos o no).
- En una modalidad de la invención, la proteína ClpB o una variante de la misma como se describe aquí anteriormente se modifican por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante la adición de uno o más grupos funcionales tales como un grupo fosfato, acetato, lípido o carbohidrato, y/o mediante la adición de uno o más grupos protectores.
- Por ejemplo, los péptidos pueden ser modificados por la adición de uno o más grupos funcionales tales como fosfato, acetato, o varios lípidos y carbohidratos. La proteína ClpB o una variante de la misma también puede existir como derivados de polipéptidos.
- El término "derivado de polipéptido" se refiere al compuesto que tiene un grupo amino ($-NH-$), y más particularmente, un enlace peptídico. Los polipéptidos pueden considerarse amidas sustituidas. Como el grupo amida, el enlace peptídico muestra un alto grado de estabilización por resonancia. El enlace simple C-N en el enlace peptídico tiene típicamente aproximadamente 40 por ciento de carácter de enlace doble y el enlace doble C=O aproximadamente 40 por ciento de carácter de enlace simple. Los "grupos protectores" son los grupos que previenen reacciones indeseables (tales como proteólisis) que involucran grupos funcionales no protegidos. Los ejemplos específicos de grupos amino protectores incluyen formilo; trifluoroacetilo; benciloxicarbonilo; benciloxicarbonilo sustituido tal como (orto- o para-) clorobenciloxicarbonilo y (orto- o para-) bromobenciloxicarbonilo; y oxicarbonilo alifático tal como t-butoxicarbonilo y t-amiloxicarbonilo. Los grupos carboxilo de los aminoácidos pueden protegerse a través de la conversión en grupos éster. Los grupos éster incluyen ésteres de bencilo, ésteres de bencilo sustituidos tales como metoxibencil éster; ésteres de alquilo tales como ciclohexil éster, cicloheptil éster o t-butil éster. La porción guanidino puede estar protegida por nitro; o arilsulfonilo tal como tosilo, metoxibencensulfonilo o mesitilenosulfonilo, incluso se piensa que no necesita un grupo protector. Los grupos protectores de imidazol incluyen tosilo, bencilo y dinitrofenilo. El grupo indol del triptófano podría estar protegido por formilo o podría no estar protegido.
- La modificación de la proteína ClpB o variantes de la misma se dirige particularmente a mejorar su tiempo de vida *in vivo*. Un tipo de modificación es la adición de polietilenglicol (PEG) al N o C terminal de la proteína ClpB o una variante de la misma. El PEG se conoce por los expertos en la técnica por tener numerosas propiedades que lo hacen un portador ideal para péptidos tal como su alta solubilidad en agua, alta movilidad en solución y baja inmunogenicidad. Esta modificación además protege los polipéptidos de exopeptidasas y por lo tanto incrementa su estabilidad de conjunto *in vivo*.

Las otras modificaciones usadas para prevenir la degradación de los polipéptidos por endopeptidasas o exopeptidasas incluyen modificaciones del N-terminal tales como acetilación o glicosilación, modificaciones del C-terminal tales como amidación y uso de aminoácidos no naturales (β -amino y α -trifluorometilo amino ácidos) particularmente en sitios dentro de los polipéptidos.

Otra alternativa para aumentar el tamaño molecular del polipéptido es la fusión genética de los polipéptidos al dominio Fc de la inmunoglobulina humana (que incluye, por ejemplo, IgA, IgM e IgG) o la fusión de los polipéptidos a la albúmina.

Las proteínas ClpB o variantes de la misma descritas en la presente descripción pueden ser producidos sintéticamente mediante síntesis química o síntesis enzimática como se conoce bien en la técnica. Alternativamente, las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos de la invención pueden introducirse dentro de un vector de expresión de proteínas y producirse en un organismo hospedero adecuado (por ejemplo, bacteria, células de insecto, etcétera), después purificarse. En una modalidad, la proteína ClpB o una variante de la misma se obtiene mediante un método de clonación, tal como, por ejemplo, mediante el uso de cualquier sistema de producción conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, *E. coli*, levadura, célula de insecto baculovirus o células de mamífero tales como el sistema de expresión HEK o CHO.

Un polipéptido adicional ("marcador") puede agregarse para el propósito de purificar o identificar o purificar los péptidos. Los marcadores de proteínas hacen posible, por ejemplo, que los polipéptidos se adsorban, con alta afinidad, a la matriz, y para que la matriz después se lave rigurosamente con tampones adecuados sin que el complejo se eluya en alguna magnitud significativa, y para que el complejo adsorbido se eluya subsecuentemente de manera selectiva. Los ejemplos de los marcadores de proteínas los cuales son conocidos por los expertos en la técnica son un marcador (His)₆, un marcador Myc, un marcador FLAG, un marcador hemaglutinina, un marcador glutatión transferasa (GST), inteína con un marcador aglutinante de quitina por afinidad o un marcador de proteína aglutinante de maltosa (MBP). Estos marcadores de proteína pueden estar localizados N-terminalmente, C-terminalmente y/o internamente.

En algunas modalidades, la proteína ClpB se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica. En algunas modalidades, la proteína ClpB se combina con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas.

El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones y entidades moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, de manera adecuada. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga líquida, semisólida o sólida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo. En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de la vía oral tales como tabletas, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración en aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que se puede inyectar. Estos pueden estar en soluciones salinas estériles, isotónicas particulares (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de estas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas las que tras la adición, en dependencia del caso, de agua o solución salina fisiológica esterilizada, permite la constitución de soluciones inyectables. Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen las dispersiones o soluciones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las soluciones que comprenden los compuestos de la invención como una base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezcladas con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse además en glicerina, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. El ingrediente activo puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, tartárico oxálico, mandélico, y similares. Las sales con los grupos carboxilo libres pueden derivarse, además, de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. El portador puede ser además un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, con el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y con el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede

proporcionarse mediante el uso en las composiciones de agentes de absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución de este, anteriormente esterilizada por filtración. Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación en cantidades tales que sean terapéuticamente efectivas. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse las cápsulas de liberación del fármaco y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, si es necesario, la solución debe regularse adecuadamente con tampón y primero, el diluyente líquido se torna isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, a la luz de la presente descripción los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 mL de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 mL de fluido de hipodermoclinis o se inyecta en el sitio propuesto de infusión. Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente en dependencia de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará en cualquier caso la dosis adecuada para el sujeto individual.

Como se usa en la presente, la expresión "bacteria que expresa el ClpB" se refiere a una bacteria que expresa o sobreexpresa la proteína chaperona ClpB o una variante de la misma, como se definió anteriormente o un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos del 96 al 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, con mayor preferencia 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos con núm. de ident.: 1.

En algunas modalidades, la bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma es una bacteria de calidad alimentaria grado alimenticio.

En algunas modalidades, la bacteria que expresa la proteína ClpB o una variante de la misma es una cepa bacteriana probiótica.

Como se usa en la presente, el término "probiótico" se destina a designar microorganismos vivos que, cuando se integran en una cantidad suficiente, ejercen un efecto positivo sobre la salud, la comodidad y el bienestar más allá de los efectos nutricionales tradicionales. Los microorganismos probióticos se definen como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero" (FAO/OMS 2001). Como se usa en la presente, la expresión "cepa bacteriana probiótica" denota una cepa bacteriana que tiene un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del hospedero.

En algunas modalidades, 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.

En algunas modalidades, 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 modalidades, la mezcla de fragmentos bacterianos de la presente invención consiste en proteínas de la cepa bacteriana.

En algunas modalidades, la tinción bacteriana probiótica de la presente invención se selecciona de bacterias de grado alimenticio. "Bacterias de grado alimenticio" significa bacterias que se usan y generalmente se consideran seguras para su uso en alimentos.

La cepa bacteriana puede ser una cepa bacteriana natural o puede ser una cepa bacteriana genéticamente modificada.

En algunas modalidades, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es una bacteria que expresa constitutivamente la proteína ClpB o una variante de la misma.

En algunas modalidades, la proteína ClpB o una variante de la misma se sobreexpresa en la bacteria. En general, una expresión de proteína está "regulada a la alta" o una proteína está "sobreexpresada" cuando se expresa o produce en una cantidad o rendimiento que es mayor que un rendimiento de línea base dado que ocurre en la naturaleza en condiciones estándar. La sobreexpresión de una proteína puede lograrse, por ejemplo, alterando uno o más de: (a) el crecimiento o las condiciones de vida de las células hospedero; (b) el polinucleótido que codifica la proteína; (c) el promotor usado para controlar la expresión del polinucleótido y su número de copia en la célula; y (d) las propias células hospedero.

En algunas modalidades, la bacteria se sometió a condiciones de estrés para que la expresión de la proteína ClpB o una variante de la misma esté regulada a la alta en la bacteria. El estrés puede seleccionarse del grupo que consiste en una exposición al calor, cambios de temperatura, estrés mecánico o almacenamiento a largo plazo, almacenamiento de baja humedad y/o liofilización o secado por pulverización.

En algunas modalidades, 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. Típicamente, 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 modalidades, 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 o variante de la misma es máxima.

En algunas modalidades, la bacteria comprende al menos una mutación puntual, de modo que la expresión de la proteína ClpB o una variante de la misma está regulada. El término "mutación puntual" como se usa en la presente significa una sustitución y/o delección de ácido nucleico. Alternativa o simultáneamente, la al menos una mutación se encuentra 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 reguladoras de ADN pueden servir para aumentar la expresión de la proteína.

En algunas modalidades, 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 o una variante de la misma. Típicamente, la cepa bacteriana se transformó con un ácido nucleico que codifica la proteína ClpB o una variante de la misma. El término "transformación" significa la introducción de un "extranjero" (es decir gen extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN a una célula hospedero, de modo que la célula hospedero expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula hospedero que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido "transformada". El ácido nucleico puede permanecer extracromosómico tras la transformación de un microorganismo parental o puede adaptarse para integrarse 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 hospedero) o la expresión estable y la replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otras secuencias reguladoras). En algunas modalidades, el ácido nucleico es un constructo de ácido nucleico o vector. En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico o vector es un constructo o vector de expresión, sin embargo, la invención abarca otros constructos y vectores, tales como los utilizados para la clonación. En algunas modalidades, el constructo o vector de expresión es un plásmido. Típicamente, el constructo/vector de expresión comprende además un promotor, como se describe en la presente descripción anteriormente. En algunas modalidades, el promotor permite la expresión constitutiva de los genes bajo su control. Sin embargo, también pueden emplearse promotores inducibles. Se apreciará que un constructo/vector de expresión de la presente invención puede contener cualquier número de elementos reguladores además del promotor, así como también genes adicionales adecuados para la expresión de la proteína ClpB o una variante de la misma si se desea. Los métodos para transformar células bacterianas con ácidos nucleicos extracelulares se conocen bien en la técnica.

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

En algunas modalidades, 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 *Enterobacteriaceae*.

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

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

En otras modalidades, la cepa bacteriana es una cepa *Hafnia alvei*, tal como la cepa *Hafnia alvei* AF036 comercializada por la Compañía Bioprox. En otras modalidades más, la cepa bacteriana es una cepa *Proteus vulgaris*.

En otras modalidades más, se usa una combinación de cepas bacterianas que expresan la proteína ClpB o una variante de la misma.

Típicamente, 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. De acuerdo con la invención, son adecuados diversos medios de fermentación, tales como (pero sin limitarse a), por ejemplo, primero 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 alimenticia o producto. Alternativamente, pueden usarse células bacterianas, o células bacterianas con medio (por ejemplo, el caldo de fermentación), o fracciones de dicha célula que comprende medio (es decir, medio con dicha cepa/s bacterianas). Las células o la célula que comprende el medio comprenden células bacterianas vivas o viables y/o células bacterianas muertas o no viables de la(s) cepa(s). El medio puede ser tratado, pero sin limitarse a, calentamiento o sonicación. Además, los medios liofilizados o congelados, libres de bacterias y/o células (que pueden concentrarse) están incluidos en los métodos para preparar la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención.
- En una modalidad particular, la cepa bacteriana de la invención se liofiliza, luego se resuspende preferentemente antes de administrarse.
- Típicamente, 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 modalidades, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se encapsula para protegerse del estómago. En consecuencia, en algunas modalidades, 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 sobrevivencia. En tal caso, la presencia de una cápsula puede en particular retrasar o prevenir la degradación del microorganismo en el tracto gastrointestinal. Se apreciará que las composiciones de las presentes modalidades se pueden encapsular en una cápsula o tableta de liberación prolongada con recubrimiento entérico. El recubrimiento entérico permite que la cápsula/tableta permanezca intacta (*es decir*, no disuelta) a medida que pasa a través del tracto gastrointestinal, hasta el momento en que llega al intestino delgado. Los métodos para encapsular células bacterianas vivas se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos de General Mills Inc., tal como Pat. Núm. 6,723,358). Por ejemplo, la microencapsulación con alginato y almidón Hi-Maize™ seguido de liofilización demostró ser exitosa en prolongar el tiempo de vida de las células bacterianas en los productos lácteos [ver, por ejemplo, Kailasapathy K. (2002) Curr Issues Intest Microbiol 3 (2), 39-48]. Alternativamente, la encapsulación puede realizarse con fibras de glucomanano como las extraídas de *Amorphophallus konjac*. Alternativamente, también puede utilizarse el atrapamiento de bacterias viables en emulsiones de aceite de sésamo [véase, por ejemplo, Hou RC, Lin MY, Wang MM, Tzen J.T. (2003) J Dairy Sci 86, 424-428]. En algunas modalidades, los agentes para recubrimientos entéricos son preferentemente copolímeros de ácido metacrílico-acrilato de alquilo, tales como polímeros Eudragit®. Los poli(met)acrilatos han demostrado ser particularmente adecuados como materiales de recubrimiento. EUDRAGIT® es el nombre comercial de copolímeros derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, cuyas propiedades son 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 uso conveniente y la combinación de diferentes polímeros EUDRAGIT® ofrecen soluciones ideales para la liberación controlada de medicamentos en diversas aplicaciones farmacéuticas y técnicas. EUDRAGIT® proporciona películas funcionales para recubrimientos de tabletas 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 del fármaco: focalización del tracto gastrointestinal (gastroresistencia, liberación en el colon), recubrimientos protectores (enmascaramiento del sabor y el olor, protección contra la humedad) y liberación retardada del fármaco (formulaciones de liberación sostenida). Los polímeros EUDRAGIT® están disponibles en una amplia gama de diferentes concentraciones y formas físicas, incluyendo soluciones acuosas, dispersiones acuosas, soluciones orgánicas y sustancias sólidas. Las propiedades farmacéuticas de los polímeros EUDRAGIT® son determinadas por las propiedades químicas de sus grupos funcionales. Se hace una distinción entre:
- los poli(met)acrilatos, solubles en fluidos digestivos (por formación de sal) EUDRAGIT® L (copolímero de ácido metacrílico), S (copolímero de ácido metacrílico), FS y E (copolímero de metacrilato butilado básico) polímeros con grupos ácidos o alcalinos que permiten la liberación del ingrediente activo dependiente del pH. Aplicaciones: desde el simple enmascaramiento del sabor a través de la resistencia únicamente al fluido gástrico, hasta la liberación controlada de fármacos en todas las secciones del intestino.
 - los poli(met)acrilatos, insolubles en fluidos digestivos: Los polímeros EUDRAGIT® RL y RS (copolímeros de metacrilato de amonio) con polímeros alcalinos y EUDRAGIT® NE con grupos neutros permiten la liberación controlada en el tiempo del activo independiente del pH, por hinchamiento.
- Los recubrimientos entéricos EUDRAGIT® proporcionan protección a la liberación de fármacos en el estómago y permiten la 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 (a 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 finamente el pH de disolución y, por lo tanto, definir el sitio de liberación del fármaco en el intestino. Los grados EUDRAGIT® L y S son adecuados para recubrimientos entéricos. EUDRAGIT® FS 30 D (dispersión acuosa de un copolímero aniónico basado en acrilato de metilo, metacrilato de metilo y ácido metacrílico) se usa específicamente para la liberación controlada en el colon.

Típicamente, la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se administra al sujeto en forma de una composición alimenticia. En consecuencia, 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.

En algunas modalidades, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención se selecciona de composiciones alimenticias completas, suplementos alimenticios, composiciones nutracéuticas y similares. La composición de la presente invención puede usarse como ingrediente alimenticio y/o ingrediente alimenticio.

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

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

"Alimento" se refiere a líquido (es decir bebidas), composiciones dietéticas sólidas o semisólidas, especialmente composiciones alimenticias totales (sustitutivas de alimentos), que no requieren una ingestión adicional de nutrientes o composiciones de suplementos alimenticios. Las composiciones de suplementos alimenticios no reemplazan completamente la ingestión de nutrientes por otros medios. Los alimentos y las composiciones de complementos alimenticios son, por ejemplo, productos lácteos fermentados o productos a base de lácteos, que se administran o ingieren preferentemente por vía oral una o más veces al día. Los productos lácteos fermentados pueden prepararse directamente usando las bacterias de acuerdo con la invención en el proceso de producción, por ejemplo, mediante la adición a la base de alimentos, mediante el uso de métodos conocidos per se. En tales métodos, la(s) cepa(s) de la invención pueden usarse además del microorganismo usado habitualmente, y/o pueden reemplazar uno o más o parte del microorganismo usado habitualmente. Por ejemplo, en la preparación de productos lácteos fermentados tales como yogur o bebidas a base de yogur, puede agregarse o usar una bacteria de la invención como parte de un cultivo iniciador o puede agregarse adecuadamente durante dicha fermentación. Opcionalmente, la bacteria puede ser inactivada o eliminada más adelante en el proceso de producción. Los productos lácteos fermentados incluyen productos a base de leche, como (pero sin limitarse a) 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, a base de soja bebidas, helados, etcétera. Alternativamente, las composiciones de alimentos y/o suplementos alimenticios pueden ser productos no lácteos o productos lácteos no fermentados (por ejemplo, cepas o medio libre de células en leche no fermentada o en otro medio alimentario). En algunas modalidades, la cepa bacteriana probiótica de la presente invención se encapsula y 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 nutricionales y similares. Los productos no lácteos pueden incluir bebidas en polvo y barras nutricionales, y similares. Los productos pueden hacerse usando métodos conocidos, como agregar una cantidad efectiva de la(s) cepa(s) y/o medio de cultivo libre de células a una base alimenticia, como leche desnatada o leche o una composición a base de leche y fermentación como se conoce. Otras bases alimenticias a las que pueden agregarse las (composiciones que comprenden) las células bacterianas y/o el medio de cultivo sin células son carne, sustitutos de carne o bases de plantas.

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 un producto alimenticio o suplemento alimenticio, por ejemplo, en forma de tabletas, geles, polvos, cápsulas, bebidas, barras, etcétera. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un polvo envasado en una bolsita que se puede disolver en agua, zumo de frutas, leche u otra bebida.

Como se usa en la presente, el término "ingrediente alimenticio" o "ingrediente alimentario" incluye una formulación que se añade o puede añadirse a alimentos o productos alimenticios funcionales como suplemento nutricional.

Por "alimento nutricional" o "nutracéutico" o alimento "funcional" se entiende un alimento que contiene ingredientes que tienen efectos beneficiosos para la salud o son capaces de mejorar las funciones fisiológicas.

Por "suplemento alimenticio" se entiende un producto alimenticio que tiene el propósito de completar una dieta alimenticia 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 en combinación en pequeñas cantidades.

De acuerdo con la invención, "alimento funcional" resume los alimentos y los productos correspondientes desarrollados recientemente a los que se les atribuye importancia no solo porque son valiosos en cuanto a nutrición y sabor, sino debido a sustancias de ingredientes particulares. De acuerdo con la invención, el mantenimiento y la promoción de la salud a medio o largo plazo son importantes. En este contexto, se prefieren los usos no terapéuticos. Los términos "nutrientes", "productos alimenticios" y "alimentos de diseño", que también representan modalidades de la invención, se usan como sinónimos, en parte, sin embargo, también de manera diferenciada. Sin embargo, el aspecto preventivo y la promoción de la salud, así como también el carácter alimenticio de los productos, se aclaran mejor con el término alimento funcional. En muchos casos, se refieren a productos acumulados por surtido y selección (como también es el caso en la presente invención), purificación, concentración, cada vez más por adición. No se incluyen sustancias efectivas aisladas, en particular en forma de tabletas o píldoras. Aunque no existe una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes interesadas en esta área están de acuerdo en que son alimentos comercializados que tienen efectos específicos

para la salud más allá de los efectos nutricionales básicos. En consecuencia, los alimentos funcionales son alimentos ordinarios que tienen componentes o ingredientes (como los descritos en la presente descripción) incorporados en ellos que imparten al alimento un beneficio funcional específico, por ejemplo, médico o fisiológico, además de un efecto puramente nutricional.

5

En algunas modalidades, la bebida es una bebida funcional o una bebida terapéutica, un apagador de la sed o una bebida ordinaria. A manera de ejemplo, la composición de la presente invención puede usarse como ingrediente para refrescos, un zumo de fruta o una bebida que comprende proteína de suero, téis saludables, bebidas de cacao, bebidas lácteas y bebidas de bacterias de ácido láctico, yogur y yogur para beber, queso, helado, helados de agua y postres, confitería, pasteles de galletas y mezclas para pasteles, bocadillos, comidas y bebidas balanceadas, rellenos de frutas, glaseado de cuidado, relleno de panadería de chocolate, relleno con sabor a pastel de queso, relleno de pastel con sabor a fruta, glaseado de pastel y rosquilla, cremas de relleno de panadería instantánea, rellenos para galletas, relleno de panadería listo para usar, relleno reducido en calorías, bebida nutricional para adultos, bebida de soja/jugo acidificada, bebida de chocolate aséptica/retocada, mezclas de barra, bebidas en polvo, soja/bebida simple fortificada con calcio y leche con chocolate, bebida de café fortificada con calcio.

15

La composición puede usarse además como ingrediente en productos alimenticios tales como salsa de queso americano, agente antiaglomerante para queso triturado y rallado, salsa de papas fritas, queso crema, crema batida agria sin grasa para cobertura, crema batida congelada/descongelada, cobertura batida estable a congelación/descongelación, queso cheddar natural bajo en grasa y ligero, yogur estilo suizo bajo en grasa, postres congelados aireados, helado duro, helado duro etiquetado saludable, economía mejorada e indulgencia, helado bajo en grasa: servido suave, salsa de barbacoa, salsa de queso, aderezo de requesón, mezcla seca de salsa Alfredo, salsa de mezcla de queso, salsa de mezcla de tomate seco y otros.

20

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

30

En algunas modalidades, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención es adecuada para preparar productos sustitutivos de comidas. Como se usa en la presente, el término "producto sustitutivo de comidas", a menos que se especifique de cualquier otra manera, incluye cualquier producto nutricional que contenga proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, cuya combinación es adecuada como fuente de nutrición única o primaria para una comida. Típicamente, el producto sustitutivo de 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 proteína, puede usarse cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo proteínas animales (tales como proteínas de leche, proteínas de carne y proteínas de huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o sus combinaciones. Las proteínas de la leche, como la caseína y el suero, y las proteínas de soja son particularmente preferidas. Las proteínas pueden estar intactas o hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede ser conveniente suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre 2 y 20 %), por ejemplo para animales que se cree que están en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis puede llevarse a cabo según se desee y como se conoce en la técnica. Por ejemplo, puede prepararse 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 descubre que la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis.

40

45

Esto permite reducir la extensión del bloqueo de lisina de aproximadamente 15 % en peso de lisina total a menos de aproximadamente 10 % en peso de lisina; por ejemplo, aproximadamente el 7 % en peso de lisina que mejora en gran medida la calidad nutricional de la fuente de proteínas. Si la composición incluye una fuente de grasa, la fuente de grasa proporciona preferentemente del 5 % al 40 % de la energía de la composición; por ejemplo del 20 % al 30 % de la energía. Puede obtenerse un perfil de grasa adecuado usando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico. La fuente de carbohidratos proporciona preferentemente 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. Típicamente, la sustitución de una comida diaria por una dieta con restricción energética con un reemplazo de comida contribuye al mantenimiento del peso después de la pérdida de peso.

55

La composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención típicamente comprende portadores o vehículos. "Portadores" o "vehículos" significan materiales adecuados para la administración e incluyen cualquier material conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, solvente, 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 manera perjudicial. Los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco,

65

tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetiales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

En algunas modalidades, 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 enzimas y funciona como un agente natural de carga y laxante. La fibra dietética puede ser soluble o insoluble y, en general, se prefiere una combinación de los dos tipos. Las fuentes adecuadas de fibra dietética incluyen soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma arábica, fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, sialil-lactosa y oligosacáridos derivados de leches animales. En algunas modalidades, la fibra dietética se selecciona entre mananos. Los mananos (como los glucomananos y los galactomananos), como la goma guar, la goma de algarroba, el konjac y la goma xantana, están presentes en algunas paredes celulares de las plantas. Los glucomananos generalmente están compuestos de unidades de glucosa y manosa unidas por (1-4)- β , mientras que los galactomananos generalmente están compuestos por una cadena principal de (1-4)- β -manano sustituida con unidades individuales de (1-6)- α -galactosa. Muchas legumbres endospermicas, como el guar y la algarroba, contienen galactomananos en el endospermo durante el desarrollo de la semilla. Los glucomananos también se han encontrado como un componente menor de los granos de cereales.

En algunas modalidades, la composición alimenticia que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención contiene minerales y micronutrientes tales como elementos traza y vitaminas de acuerdo con las recomendaciones de organismos gubernamentales tales como la USRDA. Por ejemplo, la composición puede contener por dosis diaria uno o más de los siguientes micronutrientes en los rangos 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 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 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 modalidades, la composición que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención contiene emulsionantes. Los ejemplos de emulsionantes de grado alimenticio típicamente incluyen ésteres de ácido diacetil tartárico de mono y diglicéridos, lecitina y mono y diglicéridos. De manera similar, pueden incluirse sales y estabilizadores adecuados.

En algunas modalidades, 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 crecimiento de la cepa bacteriana probiótica de la presente invención en los intestinos. El prebiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina; y/o fibras dietéticas.

En algunas modalidades, la composición que comprende la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, de la presente invención contiene hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales encapsulantes, materiales de cubierta/envoltura, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etcétera), adsorbentes, vehículos, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, auxiliares tecnológicos (solventes), agentes que fluyen, agentes para enmascarar el sabor, agentes de ponderación, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos. La composición también puede contener aditivos y adyuvantes 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 saborizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, rellenos y similares. En todos los casos, dichos componentes adicionales se seleccionarán teniendo en cuenta su idoneidad para el destinatario previsto.

En algunas modalidades, la administración de la proteína ClpB o variante de la misma, o de la cepa bacteriana, en particular la cepa bacteriana probiótica, que expresa la proteína ClpB o variante de la misma, se repite, por ejemplo, 2 a 3 veces al día, durante un día o más y generalmente durante un período sostenido de al menos 4 días, o incluso de 4 a 15 semanas, con, cuando corresponda, uno o más períodos de interrupción. En algunas modalidades, la proteína ClpB o variante de la misma o la cepa bacteriana que expresa la proteína ClpB o variante de la misma se administra de forma simultánea o secuencial con una comida del sujeto. En algunas modalidades, la proteína ClpB o variante de la misma o la cepa bacteriana que expresa la proteína ClpB o variante de la misma, se administra antes de la comida del sujeto.

Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente de proteína ClpB o una variante de la misma o de bacterias que expresan la proteína ClpB o una variante de la misma, para lograr el efecto beneficioso (por ejemplo, estimular la saciedad, prolongar la saciedad, reducir la ingestión de alimentos, controlar, en particular, reducir, el aumento de peso, estimular la pérdida de peso y/o la reducción de la masa grasa en la relación de masa magra). En el contexto de la presente invención, la cantidad de una proteína ClpB o una variante de la misma o de bacterias que expresan la proteína ClpB o una variante de la misma, administrada al sujeto dependerá de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal.... El experto será capaz de determinar las dosis apropiadas en dependencia de estos y otros factores. Por ejemplo, cuando la proteína ClpB o una variante de la misma se administra al sujeto en forma de un probiótico, la cepa de la presente invención podrá generar una colonia

que sea 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, típicamente puede comprender 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 en seco de la composición alimenticia.

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Efectos del suministro intragástrico diario de *E. coli* K12 tipo silvestre (WT) o *E. coli* con el gen ClpB (Δ ClpB) eliminado en el peso corporal de ratones adultos C57B16 normales (A, E), ingestión de alimentos durante 24 h (B, F) y patrón de comidas (C, D, G, H) analizados al principio y al final de 3 semanas de alimentación por sonda. Los ratones control (Ctr) no recibieron ninguna sonda. El patrón de comidas se midió como la cantidad de comida (C, G), que corresponde a una cantidad promedio de alimentos consumidos durante una sola comida, y como la frecuencia de la comida (D, H), que corresponde a un número de comidas por 24 h separadas por al menos 5 min. La disminución de la cantidad de comida refleja una saciedad más rápida y la disminución de la frecuencia de la comida refleja una mayor saciedad. A: Mediciones repetidas bidireccionales ANOVA, seguido de prueba de Bonferroni * $p < 0,05$. B, D, G, H: ANOVA, seguido de prueba de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. E: * $p < 0,05$ prueba t de Student.

Figura 2: Efecto de ClpB sobre la actividad eléctrica de las neuronas ARC POMC. La frecuencia del potencial de acción expresada en por ciento de cambio con respecto al nivel basal; promedio $\pm$ SEM. Pruebas posteriores de Bonferroni * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 3: Dinámica del peso corporal en ratones obesos *ob/ob* antes y durante (0-21 días) con la sonda intragástrica con *E. coli* K12, *E. coli* K12 Δ ClpB, tanto en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctr). ANOVA de dos vías, efecto del tratamiento: $p = 0,01$, seguido de prueba Bonferroni Ctr. con respecto a *E. coli* K12, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 4: Porcentaje de cambio promedio del peso corporal (desde el día de la aleatorización = 100 %) en ratones obesos *ob/ob* después de 3 semanas con la sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n = 8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n = 8), tanto en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con el medio MH, como control (Ctr., n = 7). ANOVA $p = 0,01$, seguido de prueba de Tukey * $p < 0,05$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 5: Contenido de grasa en ratones obesos *ob/ob* medidos por EchoMRI después de 3 semanas con la sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n = 8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n = 8), tanto en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con el medio MH, como control (Ctr., n = 7). ANOVA $p = 0,005$, seguido de prueba de Tukey ** $p < 0,01$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 6: Proporciones de masa magra a grasa en ratones obesos *ob/ob* medidos por EchoMRI después de 3 semanas con sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n = 8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n = 8), tanto en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con el medio MH, como control (Ctr., n = 7). ANOVA $p = 0,05$, prueba t de Student * $p < 0,05$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 7: Ingestión de alimentos diaria promedio en ratones obesos *ob/ob* durante 3 semanas con sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n = 8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n = 8), tanto en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con el medio MH, como control (Ctr., n = 7). ANOVA $p < 0,0001$, seguido de prueba de Tukey *** $p < 0,001$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 8: Promedio de comida diaria en ratones obesos *ob/ob* durante 3 semanas con sonda intragástrica con *E. coli* K12 (n = 8), *E. coli* K12 Δ ClpB (n = 8), tanto en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con el medio MH, como control (Ctr., n = 7). ANOVA $p < 0,0001$, seguido de prueba de Tukey *** $p < 0,001$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 9: Aumento diario de peso corporal en ratones obesos *ob/ob* durante sonda intragástrica con *E. coli* K12 *E. coli* Niessle 1917, *E. coli* Niessle 1917 liofilizado (lio), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctr). ANOVA de 2 vías, $p = 0,02$, seguido de prueba Bonferroni a, Ctr. con respecto a *E. coli* Niessle 1917 lio y b, Ctr. con respecto a *E. coli* Niessle 1917, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 10: Porcentaje de cambio promedio de peso corporal (desde el día de la aleatorización = 100 %) en ratones obesos *ob/ob* después de 2 semanas con sonda intragástrica con *E. coli* K12 *E. coli* Niessle 1917, *E. coli* Niessle 1917 liofilizado (lio), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctr). Kruskal-Wallis $p < 0,01$, seguido de prueba de Dunn * $p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney ## $p < 0,01$. Promedio $\pm$ SEM.

Figura 11: Contenido de grasa en ratones obesos *ob/ob* medidos por EchoMRI después de 2 semanas con sonda intragástrica con *E. coli* K12 *E. coli* Niessle 1917, *E. coli* Niessle 1917 liofilizado (lio), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctr). ** $p < 0,01$ prueba t de Student. Promedio $\pm$ SEM.

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

Figura 13: Aumento de peso corporal (en g) en ratones obesos *ob/ob* después de 17 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (Nissle) (n=15), *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) (n=15) o *Hafnia alvei* AF036 (Hafnia) (n=15), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl) (n=12).

Figura 14: Ingestión acumulada de alimentos (en g) en ratones obesos *ob/ob* después de 17 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (Nissle) (n=15), *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) (n=15) o *Hafnia alvei* AF036 (Hafnia) (n=15), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl) (n=12).

Figura 15: Aumento de masa grasa y magra en ratones obesos *ob/ob* medidos por EchoMRI después de 17 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (Nissle) (n=15), *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) (n=15) o *Hafnia alvei* AF036 (H. alvei) (n=15), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl) (n=12). A. Ganancia de masa grasa (en g). B. Ganancia de masa magra (en g). C. Relaciones de masa magra a grasa.

Figura 16: Tasa de expresión relativa de la proteína lipasa sensible a hormonas (pHSL) (contra la tasa de expresión de la actina como estándar) en ratones obesos *ob/ob* después de 17 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (*E. coli* Nissle) (n=15), *E. coli* K12 (*E. coli* K12) (n=15) o *Hafnia alvei* AF036 (*Hafnia alvei*) (n=15), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl) (n=12). Las tasas de expresión de HSL y actina se midieron por transferencia Western.

Figura 17: Validación de la dieta alta en grasas. A. Peso corporal (en g) en ratones alimentados con una dieta alta en grasas/carbohidratos (HFD) (n=48) y en ratones alimentados con una dieta control (Ctrl) (n=8). B. Masa grasa (en g). C. Masa magra (en g).

Figura 18: Reducción en el aumento de peso corporal a partir de D0 en ratones obesos inducidos con dieta alta en grasas (HFD) después de 14 días con sonda intragástrica con *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) o *Hafnia alvei* AF036 (*H. alvei*), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl).

Figura 19: Aumento de masa grasa y magra a partir de D0 en ratones obesos inducidos con dieta alta en grasas (HFD) después de 14 días de sonda intragástrica con *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) o *Hafnia alvei* AF036 (*H. alvei*), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl). A. Ganancia de masa grasa (en g). B. Ganancia de masa magra (en g).

Figura 20: Aumento de peso corporal (en AUC - Área bajo la curva) en obesos ratones *ob/ob* después de 21 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (Nissle), *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) o *Hafnia alvei* AF036 (*H. alvei*), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl).

Figura 21: Ingestión acumulada de alimentos (en AUC) en ratones obesos *ob/ob* después de 21 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (Nissle), *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) o *Hafnia alvei* AF036 (*H. alvei*), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl).

Figura 22: Aumento de masa grasa (en g) en ratones obesos *ob/ob* después de 21 días con sonda intragástrica con *E. coli* Niessle 1917 (Nissle), *E. coli* K12 (K12 Δ -ClpB) o *Hafnia alvei* AF036 (*H. alvei*), todo en medio Mueller-Hilton (MH), o solo con medio MH, como control (Ctrl).

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Crecimiento de E. coli in vitro después del suministro regular de nutrientes

Las bacterias *E. coli* K12 se cultivaron a 37 °C en 40 mL de medio MH (Becton, Dickinson, MD) que contenía 30 % de infusión de carne de res, 1,75 % de hidrolizado de caseína y 0,15 % de almidón con pH 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 un OD a $\lambda = 600$ nm por un espectrofotómetro cada 2 h después de la 1^{ra} provisión de medio MH, cada 1 hora después de las 3^{ra} y cada 10 min después de la 5^{ta} provisión. Al final de cada ciclo de 12 h, las bacterias se centrifugaron durante 5 min a 6000 rpm a temperatura ambiente (RT). Los sobrenadantes fueron descartados y reemplazados por un volumen equivalente (~40 mL) de un nuevo medio MH. Después de la última suplementación de medio MH, se tomaron muestras de bacterias para la extracción de proteínas en la fase exponencial y en la siguiente fase estacionaria.

Extracción de proteínas

Las bacterias *E. coli* K12 se centrifugaron a 4 °C durante 30 minutos 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 minutos a temperatura ambiente. Para separar las proteínas de los fragmentos de células no disueltas, el homogeneizado bacteriano se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 10 000 g. El sobrenadante se recuperó y luego se ultracentrifugó a 4 °C durante 45 minutos a 60 000 g para separar aún más 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 proteínas se midieron utilizando el estuche 2-D Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional

Para 2D-PAGE, 300 µg de *E. coli* se utilizaron extractos de proteínas para rehidratar tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (pH 4-7; 18 cm; BIO-RAD, Hercules, CA). Luego, las proteínas se resolvieron en la primera dimensión mediante un enfoque isoelectrico para un total de 85 000 Vh utilizando el sistema de enfoque isoelectrico IPGphor (GE Healthcare). Después de enfocar, las tiras de IPG se incubaron durante 15 minutos en el tampón de equilibrio [urea 6 mol/L, glicerol 30 % (v/v), dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 % (p/v), Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,8 y 0,25 % (p/v) de azul de bromofenol que contiene ditiotreitol 2 % (p/v)] y luego se alquila durante 15 minutos en el tampón de equilibrio que contiene yodoacetamida 4 % (p/v). Las tiras de IPG se fijaron subsecuentemente en geles de 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 Daltsix (GE Healthcare) con 12 mA/gel a 25 °C. Después de SDS-PAGE, los geles 2D se fijaron durante 2 h en ácido ortofosfórico al 2 % (v/v) y en metanol al 50 % (v/v) a temperatura ambiente. Luego se enjuagaron los geles con agua y se visualizaron las manchas de proteína mediante tinción con CBB G-250 (BIO-RAD) [metanol al 34 % (v/v), sulfato de amonio al 17 % (p/v), 2 % (v/v) ácido ortofosfórico y 0,66 g de CBB G-250/L].

Análisis de expresión diferencial de proteínas.

Las imágenes de geles 2D teñidos se escanearon con 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 entre series, y cada conjunto de 3 (o 4) geles se comparó usando ImageMaster para confirmar no aparición de puntos estadísticamente diferenciales dentro del conjunto de geles. Se usó el gel más representativo (migración de gel, definición de punto y número de punto) de cada conjunto para comparar las proteínas de *E. coli* entre las fase exponencial y estacionaria. El nivel de expresión se determinó por el volumen relativo de cada punto en el gel y se expresó como % de volumen, calculado como volumen de punto/Σ volúmenes de todos los puntos resueltos en el gel. Este volumen de manchas normalizadas tiene en cuenta las variaciones debidas a la carga y tinción de proteínas al considerar el volumen total sobre todas las manchas presentes en el gel. Las variaciones en la abundancia se calcularon como la relación de los valores promedio del % de volumen para un grupo de puntos entre las 2 fases. Solo los puntos con una relación de variación de volumen >1,5 se consideraron relevantes. La ausencia de una mancha dentro de un gel indicaba que no se podía informar una expresión detectable para una proteína en la condición experimental seleccionada. El valores *p* correspondiente se determinaron mediante la prueba *t* de Student (nivel de significancia *p*<0,05) después de la transformación logarítmica del volumen de la mancha.

Identificación de proteínas por cromatografía líquida-ionización por electropulverización MS/MS

Los puntos de proteína de interés se extirparon de geles 2D teñidos con CBB G-250 usando Ettan Spot Picker (GE Healthcare), y la digestión automática en gel de proteínas se realizó en el Ettan Digester (GE Healthcare) como se describió anteriormente (Goichon y otros 2011). Los extractos de proteínas se resuspendieron en 10 µl de acetonitrilo al 5 % (v/v)/ ácido fórmico al 0,1% (v/v) y luego se analizaron con un sistema nano-LC1200 acoplado a un espectrómetro de masas 6340 Ion Trap equipado con una fuente de nanopulverización y una interfaz de cubo de chip HPLC (Agilent Technologies, Courtaboeuf, Francia). Brevemente, los péptidos se enriquecieron y desalaron en una columna trampa de 40 nL RP-C18 y se separaron en un Zorbax (tamaño de poro de 30 nm, tamaño de partícula de 5-µm) columna C18 (43 mm de largo x 75 µm diámetro interior; Tecnologías Agilent). Se usó un gradiente lineal de 9 minutos (acetonitrilo al 3 %-80 % en ácido fórmico al 0,1 %) a un régimen de flujo de 400 nL/min y el eluyente se analizó con un espectrómetro de masas con trampa de iones.

Para la identificación de proteínas, se extrajeron las listas de picos MS/MS y se compararon con las bases de datos de proteínas utilizando el motor de búsqueda MASCOT Daemon versión 2.2.2 (Matrix Science). Las búsquedas se realizaron con los siguientes parámetros específicos: especificidad enzimática, tripsina; se permitió un sitio de corte ausente; 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 iones de fragmentos, 0,6 Da; ESI-TRAP como instrumento; taxonomía *E. coli*; Base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [NCBI nr 20120531 (18280215 secuencias, 6265275233 residuos)] (Bethesda, MD). Las coincidencias de proteínas se validaron automáticamente si cumplían uno de los siguientes criterios: identificación con al menos dos péptidos de alto rango (negrita y rojo), cada uno con un puntaje MASCOT de más de 54 (*p*<0,01), o al menos dos péptidos de alto rango (negrita y rojo) cada uno con un puntaje 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 el 1 %.

5 Ensayo de ATP

La producción de ATP *in vitro* se midió usando el estuche de ensayo colorimétrico/fluorométrico de ATP 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 µg/ml en tampón de ensayo de ATP) y se ajustaron a 50 µl/pocillo con tampón de ensayo de ATP. Luego se añadieron 10 µl de solución de nutrientes diferentes, 15 % de sacarosa o medio MH a los pocillos correspondientes y se ajustaron a 50 µl/pocillo con el tampón de ensayo de ATP; se añadieron 50 µl/pocillo de tampón ATP solo a los pocillos de control. La placa se incubó 2 ha 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 50 µL de mezcla de reacción de ATP (que contenía tampón de ensayo de ATP, sondas de ATP, convertidor de ATP y mezcla de revelador) en cada pocillo. La OD se midió a 570 nm después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, protegida de la luz del día.

Desarrollo y validación de inmunoensayo ClpB

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

Para evitar la unión del anticuerpo de revelado (Ab) al Ab de captura Ab, produjimos 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 epítomos anti-ClpB. Para evitar la reactividad cruzada entre ClpB y α-MSH utilizamos, como Ab de detección, un Ab anti-ClpB monoclonal de ratón que se caracteriza por una alta sensibilidad y especificidad para reconocer ClpB pero no α-MSH preseleccionado por la detección ELISA de varios clones Ab. El Ab de revelado anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina se usó como una herramienta común de ELISA para obtener una reacción enzimática cromogénica legible como la OD proporcional a la concentración de analito. Un cambio lineal en la OD resultante de la detección de 7 diluciones consecutivas de una proteína ClpB recombinante de *E. coli* que oscila entre 2 pM y 150 pM se obtuvo sin alcanzar una meseta y sin saturación de la señal de OD.

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 *E. coli* ΔClpB mutante. El Dr. Axel Mogk (ZMBH, Universidad de Heidelberg, Alemania) proporcionó amablemente la mutante ΔClpB y las cepas de tipo silvestre (WT) correspondientes. Además, analizamos la presencia de ClpB en estas muestras de proteínas bacterianas mediante WB usando un Ab policlonal anti-ClpB de conejo 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 con concentraciones de ClpB superiores a 1000 pM, mientras que ClpB no era detectable en la muestra de proteína extraída de *E. coli* ΔClpB. El WB reveló una banda principal de un tamaño esperado de 96 kDa en la *E. coli* WT pero no en ΔClpB. La intensidad de OD 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 lo tanto, la ausencia de detección de ClpB en preparaciones de proteínas de *E. coli* ΔClpB confirmó la especificidad de los ensayos, y una buena correspondencia entre el ELISA y el 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, utilizamos el ELISA de ClpB para medir ClpB en plasma de ratones que habían sido suplementados vía sonda intragástrica diariamente durante 3 semanas con *E. coli* WT o con ΔClpB. Las muestras de plasma estaban disponibles en nuestro estudio publicado anteriormente (Tennoune y otros 2014). Descubrimos que ClpB normalmente estaba presente en el plasma de ratones, incluyendo los controles y los ratones alimentados con 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 confirmando el origen bacteriano intestinal del ClpB plasmático.

ELISA par ClpB

Anticuerpos policlonales de conejo anti ClpB de *E. coli* (producidos de manera personalizada por Delphi Genetics, Gosselies, Bélgica), se revistieron en placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY) usando 100 µL y una concentración de 2 µg/ml en tampón NaHCO₃ 100 mM, pH 9,6 por 12 h a 4 °C. Las placas se lavaron (5 min x 3) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4. La proteína ClpB recombinante de *E. coli* (producida específicamente por Delphi Genetics) se diluyó en serie a 5, 10, 25, 50, 70, 100 y 150 pM en el tampón de muestra (PBS, azida de sodio al 0,02 %, pH 7,4) y se añadió a los pocillos por duplicado para preparar un estándar. Las

muestras de analitos incluyeron: muestras de mucosa colónica y plasma de ratones y ratas o proteínas extraídas de cultivos de *E. coli* K12. Se agregaron por duplicado muestras de analito a los pocillos restantes y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron (5 min x 3) en PBS con Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4. Anticuerpo monoclonales de ratón anti-ClpB de *E. coli* se añadieron (1:500 en tampón de muestra, producido específicamente por Delphi Genetics) a los pocillos y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron (5 min x 3) en PBS con Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4. IgG de cabra anti-ratón 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 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron (5 min x 3) en PBS con Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4 y luego se añadieron 100 µL de solución de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, St. Louis, MO) como sustrato de la fosfatasa alcalina. Después de 40 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo agregando 50 µL de NaOH 3N. La OD se determinó a 405 nm utilizando un lector de microplacas Metertech 960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwán). Los valores de OD en el 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 OD de la muestra.

Transferencia Western ClpB

La transferencia western se realizó utilizando proteínas extraídas de *E. coli* K12. Las muestras de proteínas (10 µg) se separaron en gel 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 hora a temperatura ambiente con leche en polvo sin grasa 5 % (p/v) en TBS (10 mmol/L Tris, pH 8; 150 mmol/L NaCl) más Tween 20 al 0,05 % (p/v). Luego, la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con anticuerpos policlonales anti-ClpB de *E. coli* (1:2000, Delphi Genetics). Después de tres lavados en una solución de bloqueo de leche en polvo sin grasa al 5 % (p/v) en TBS/Tween 20 al 0,05 %, las membranas se incubaron durante 1 hora con IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa (1:3000, SantaCruz Biotechnology). Después de tres lavados, la reacción de peroxidasa se reveló usando el estuche de detección de ECL (GE Healthcare). Las bandas de proteínas se compararon con el estándar de peso molecular (Precision Plus, BioRad) y las películas se escanearon con ImageScanner III (GE Healthcare) y se analizaron para determinar la densidad de píxeles de la banda con el software ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare).

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

Animales

El cuidado y la experimentación con animales estaban de acuerdo con las pautas establecidas por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos y cumplían con las regulaciones de la Comunidad Francesa y Europea (Diario Oficial de la Comunidad Europea L 358, 18/12/1986). Se mantuvieron ratas hembra Sprague-Dawley, peso corporal 200-250 g (Janvier, Genest-Saint-Isle, Francia) en jaulas de retención (3 ratas por jaula) en una instalación para animales totalmente equipada en condiciones ambientales reguladas (22 ± 1 °C, en un ciclo de luz-oscuridad de 12h con luces encendidas a las 7:30 a.m.) durante 1 semana para aclimatarse a las condiciones de alojamiento. Se disponía de comida estándar para roedores granulada (dieta RM1, SDS, Reino Unido) y agua potable *ad libitum*.

Experimento #1

Este experimento se diseñó para evaluar la relevancia de nuestro modelo *in vitro* de crecimiento de *E. coli* para situaciones *in vivo* de crecimiento bacteriano en el intestino. Las ratas se anestesiaron con solución de ketamina (75 mg/kg, Virbac, Carros, Francia) / xilazina (5 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Francia), 3:1 vol., 0,1 ml/100 g de peso corporal I.P. después de la laparotomía, el colon se movilizó colocando 2 ligaduras: La 1ª en la unión caecocolónica y la 2ª, 4 cm por debajo. Las infusiones de colon y el muestreo del contenido luminal se realizaron utilizando un 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 e inmediatamente después se retiraron para la medición de OD. Después de la medición de OD, toda la muestra del contenido de colon se devolvió al colon. Tal muestreo del contenido de colon, sin agregar nuevo medio MH o agua, se repitió cada 5 min durante los primeros 20 min y luego a los 30 min y 60 min. La densidad bacteriana se midió como una DO a $\lambda = 600$ nm mediante un espectrofotómetro. Se tomaron muestras de sangre de la vena porta antes y 30 y 60 minutos después del 1ª infusión. Se tomaron muestras fecales del colon al final del experimento para extracción de ADN y PCR de ClpB.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) para analizar la densidad bacteriana de las bacterias que expresan el ADN de ClpB usando un instrumento CFX 96 q-PCR (BioRad, CA). El ADN total se extrajo de las heces fecales de ratas usando el mini estuche QAMP DNA stool (QIAGEN Venlo, Países Bajos). La mezcla qPCR incluía 5 µL de SYBR Green Master (QIAGEN, West Sussex, Reino Unido), 0,5 µM de cebadores directos e inversos, ADN de muestras y agua para dar un volumen total de 10 µL. Los cebadores se compraron de Invitrogen (Cergy-Pontoise, Francia). Se realizó una PCR de tres pasos 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.

Experimento #2

Este experimento tuvo como objetivo evaluar los efectos de las proteínas de *E. coli* en los péptidos intestinales (GLP-1 y PYY) que se liberan en la circulación sistémica. Las ratas se anestesiaron y el colon se movilizó como se describió anteriormente, las infusiones de colon de las proteínas de *E. coli* (0,1 µg/kg de proteína en 2 mL de PBS) extraídas en la 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 minutos de infusiones de colon para ensayos de GLP-1, PYY y ClpB. Se tomaron muestras de mucosa colónica al final del experimento para el ensayo de ClpB. Los ensayos GLP-1 y PYY se realizaron usando un estuche de inmunoensayo enzimático fluorescente (Phoenix Pharmaceutical Inc., CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se midió a 325 nm para excitación y 420 nm para emisión usando un lector de microplacas Chameleon (HIDEX Inc., Turku, Finlandia).

Las administraciones de proteínas de *E. coli* en ratas, ingestión de alimentos y estudio cerebral c-fos

Animales

Las ratas Wistar macho, con un peso corporal de 200-250 g (Janvier, Genest-Saint-Isle, Francia) se aclimataron a las condiciones de alojamiento y se alimentaron como se describió 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). El agua potable siempre estuvo disponible. Las ratas se manejaron suavemente diariamente 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 usaron en los Experimentos 1-3. Se realizaron dos experimentos que incluían restricción de alimentos en las mismas ratas con un intervalo de 4 días. El 3^{er} experimento en ratas de alimentación libre involucró sus nuevas series.

Experimento #1

El 1^{er} objetivo del experimento era comparar los efectos de las proteínas de membrana de *E. coli* extraídas en las fases exponencial y estacionaria. Las ratas fueron privadas de alimentos durante la noche (entre las 18.00 h y las 10.00 h), mientras que el agua estaba disponible *ad libitum*. Al día siguiente después de la privación de alimentos, las proteínas de *E. coli* se inyectaron I.P. a las 10.00 h y las ratas regresaron inmediatamente a sus jaulas de metabolismo, que contenían una cantidad de alimento previamente pesada. La ingestión 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 la fase exponencial en 300 µL de PBS; el 2^{do} grupo de ratas (n=6) recibió 0,1 mg/kg de proteínas de membrana extraídas de *E. coli* en la fase estacionaria y el grupo control (n=6) recibió 300 µL de PBS.

Experimento #2

El 2^{do} objetivo del experimento era comparar los efectos de las proteínas citoplasmáticas de *E. coli* extraídas en fases exponencial y estacionaria. Se usó un protocolo experimental similar al del Experimento #1.

Experimento #3

Este experimento se diseñó para evaluar los efectos de las proteínas totales de *E. coli* en la ingestión de alimentos en ratas de alimentación libre. Inyecciones de las proteínas de *E. coli* (0,1 mg/kg de proteína en 300 µL PBS, I.P.) extraídas en la fase exponencial (n=6) o en la fase estacionaria (n=6) o PBS solo 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 de alimento previamente pesada. La ingestión acumulada de alimentos se midió después de 2 h. Inmediatamente después, las ratas se anestesiaron con pentobarbital de sodio (0,2 mg/kg, I.P.) y se perfundieron para el estudio inmunohistoquímico de la expresión de c-fos en el cerebro.

Preparación de tejidos e inmunohistoquímica.

Los cerebros fueron fijados por perfusión/inmersión en paraformaldehído al 4 %, congelados y cortados (14 µm) en un criostato (Leica Microsystems, Nanterre, Francia) y luego procesados para inmunohistoquímica utilizando un estuche de amplificación de señal de tiramida (TSA) más fluoresceína (NEN, Boston, MA). Para la tinción única, se utilizó antisuero policlonal de conejo contra c-fos (1:4000, Ab-5, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para la doble tinción, después de la TSA, se aplicó una técnica de inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales de conejo contra β-endorfina (extremo β) 1:1000 (Life Technologies, Frederick, MD) que se reveló con anticuerpos anti-conejo Cyanine-3 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) o IgG monoclonal de ratón anti péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX) que se reveló con anticuerpos conjugados con rojo de rodamina anti-ratón 1:200 (Jackson ImmunoResearch). En los núcleos arqueados y ventromediales hipotalámicos y en el núcleo central de la amígdala, las células positivas se contaron con un aumento de x20 en seis secciones consecutivas. El número medio de células positivas por rata se utilizó para calcular el promedio del grupo. Las imágenes digitales fueron optimizadas para brillo y contraste en el software Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San José, CA).

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

Se compraron ratones C57B16 machos de dos meses de edad (n=32) de Janvier Labs y se aclimataron a la instalación de animales durante 1 semana con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, con las luces encendidas a las 8:00.

5 Luego, los ratones se colocaron individualmente en las jaulas de ratones BioDAQ (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ), cada uno equipado con un monitor de alimentación automática. Después de 3 días de aclimatación a las jaulas BioDAQ, los ratones se dividieron en tres grupos (n=8), cada uno de los cuales recibió diferentes tratamientos que consistían en dos inyecciones diarias I.P. a las 9:00 y a las 18:30 de: (i) PBS, (ii) proteínas bacterianas extraídas en la fase exponencial (0,1 mg/kg de peso corporal), (iii) proteínas bacterianas extraídas en la fase estacionaria (0,1 mg/kg de peso corporal). Se disponía de alimentos (SERLAB, Montataire, Francia) y agua potable *ad libitum* y el peso corporal se midió diariamente. Los datos de alimentación se monitorearon 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 relaciones de saciedad se calcularon como el 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 el microarreglo de ARNm de neuropéptido.

Microarreglos de ARNm de neuropéptido hipotalámico

20 El ARN total se extrajo del hipotálamo de ratones, que recibieron administraciones crónicas de proteínas de *E. coli*, utilizando el estuche *NucleoSpin® RNA II* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo el protocolo de los fabricantes. El ARN digerido se retrotranscribió a 42 °C durante 60 minutos usando el estuche del Sistema de Transcripción Inversa ImProm-II™ (Promega, Madison, WI). El ADNc obtenido se usó 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 eficiencia y especificidad. La reacción de PCR, compuesta de 6 µL de ADNc y 6 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies) que contiene cebadores específicos hacia adelante y hacia atrás a una concentración de 100 nM, se dispuso en placas de 96 pocillos con un sistema de manejo de líquidos Bravo (Agilent) y amplificado con un QuantStudio 12K Flex (Life Technologies). Las señales generadas por ADNc para genes objetivo se corrigieron internamente con las señales de genes de referencia para detectar variaciones en las cantidades de ARNm de partida. El nivel de expresión génica se comparó con un grupo de muestra control correspondiente, y las regulaciones se determinaron con el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Registros electrofisiológicos

35 Se prepararon cortes cerebrales (250 µm) de ratones POMC-eGFP adultos (5-7 semanas de edad; Ref: C57BL/6J-Tg (Pomc-EGFP) 1Low/J, The Jackson Laboratory) como se describió previamente (Fioramonti y otros 2007). Los cortes se incubaron a TA, en medio extracelular oxigenado que contiene (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 grabación, 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 video microscopía IR-DIC. Las neuronas viables de ARC POMC se visualizaron usando un objetivo de inmersión en agua X40 (Nikon) con una cámara de video fluorescente (Nikon). Las pipetas de borosilicato (4-6 MΩ; 1,5 mm OD, Sutter Instruments, Novato, CA) se llenaron con medio extracelular filtrado. Las grabaciones conectadas a la célula se realizaron con un amplificador Multiclamp 700B, digitalizado con la interfaz Digidata 1440A y adquirido a 3 kHz con el software pClamp 10.3 (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las pipetas y las capacidades de las celdas se compensaron completamente. Después de establecer una línea basal estable, se perfundió 1 nM de ClpB (Delphi Genetics) durante 5-10 min. La velocidad 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 velocidad de activación medida 3 minutos antes de la perfusión.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron y los gráficos se trazaron utilizando GraphPad Prism 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 (KW) con las pruebas posteriores de Tukey o Dunn, de acuerdo con los resultados de normalidad. En su caso, los grupos individuales se compararon utilizando la prueba de *t*-Student y correlaciones de Pearson o la prueba de Mann-Whitney (MW) de acuerdo con los resultados de normalidad. Los efectos de los experimentos continuos se analizaron utilizando mediciones repetidas (RM) ANOVA y las pruebas posteriores de Bonferroni. Los datos se muestran como medias ± error estándar de medias (s.e.m), y para todas las pruebas, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

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

Después del 1^{er} suministro del medio nutricional Mueller-Hinton (MH) al cultivo de *E. coli*, se observaron tres fases de crecimiento bacteriano: 1) fase de crecimiento lento de 2h; 2) fase de crecimiento exponencial de 4h y 3) fase estacionaria con densidad óptica (OD) de 0,35 que permanece estable durante 6h. Después del 3^{er} y 5^{to} suministro de medio MH, solo se encontraron dos fases de crecimiento: la exponencial y estacionaria, la 1^{ra} fase comenzó inmediatamente después de la provisión de nutrientes. Cada nuevo ciclo de alimentación se caracterizó por una duración más corta de la fase de crecimiento exponencial: 2h después de las 3^{ra} y 20 min después de las 5^{ta} provisión. Después de la 5^{ta} provisión de nutrientes, se extrajeron proteínas bacterianas y se separaron en la membrana y las fracciones citoplasmáticas utilizadas para el análisis proteómico y *en vivo* experimentos 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, a las bacterias *E. coli* A K12 se le suministraron nutrientes 9 veces. Descubrimos que, después de la 7^{ma} y 9^{na} provisión de nutrientes, la fase de crecimiento exponencial no cambió más, durando 20 minutos con el mismo aumento relativo ($\Delta 0,3$) en OD, reflejando un crecimiento bacteriano idéntico después de cada suministro de nutrientes. De acuerdo con los estándares de McFarland, un aumento de 0,3 OD corresponde a un incremento de 10^8 - 10^9 de bacterias. Después de la 9^{na} provisión de nutrientes, las proteínas bacterianas se extrajeron en las fases exponencial y estacionaria, mostrando concentraciones de proteínas totales de 0,088 mg/ml y 0,15 mg/ml, respectivamente. Las proteínas extraídas se analizaron para determinar los niveles de ClpB y se usaron en el ensayo de producción de ATP y para experimentos *en vivo* que incluyen infusiones intracolónicas e inyecciones sistémicas en ratones y ratas de alimentación libre seguidos de la detección de c-fos en el cerebro.

Análisis proteómico

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

La comparación de la 2D-PAGE de las proteínas de membrana entre las fases exponencial y estacionaria reveló 20 proteínas expresadas diferencialmente (por al menos 1,5 veces). Entre ellas, 17 proteínas mostraron una mayor expresión en la fase exponencial y 15 fueron identificadas por espectrometría de masas. La comparación de la 2D-PAGE de proteínas citoplasmáticas mostró 20 proteínas expresadas diferencialmente (por al menos 1,5 veces). Contrariamente a las proteínas de membrana, la mayoría (19) de las proteínas citoplasmáticas mostraron una mayor expresión durante la fase estacionaria. Solo una mancha de proteína, correspondiente a flagelina, tuvo una mayor expresión en la fase exponencial. La mayoría de las proteínas identificadas estaban implicadas en procesos anabólicos o catabólicos que mostraban un perfil metabólico de mezcla global en ambas fases de crecimiento.

La producción de ATP en *E. coli* por proteínas *in vitro*

Para estudiar si el cambio de proteoma bacteriano durante las fases de crecimiento puede influir en sus capacidades de extracción de energía, la producción de ATP a partir de nutrientes por las proteínas de *E. coli* K12 de las fases exponencial y estacionaria se evaluaron *in vitro*. Descubrimos que las proteínas de ambas fases de crecimiento podían aumentar la producción de ATP a partir de diferentes fuentes de energía. Las concentraciones de ATP fueron más altas cuando se utilizó una fuente de energía mixta que contiene proteínas, como el medio MH, en comparación con una solución de sacarosa. La producción de ATP aumentó de forma dependiente de la dosis con las concentraciones de proteínas bacterianas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los efectos de las proteínas que producen ATP 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 usado en este estudio. Si la producción de proteína ClpB es diferente entre las fases de crecimiento bacteriano se estudió en 4 cultivos separados de *E. coli* K12. 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 confirmaron aún más utilizando el ELISA de ClpB en las mismas preparaciones de proteínas bacterianas, lo que demuestra 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 inducido por nutrientes de *E. coli* es relevante para la dinámica del crecimiento bacteriano intestinal *en vivo*, se infundieron medio MH o agua en el colon de ratas anestesiadas. Encontramos que las instilaciones de medio MH, pero no de agua, indujeron la proliferación bacteriana en el intestino con una fase de crecimiento exponencial que duró 20 minutos, consistente 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. Sin embargo, 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 *E. coli* en los proteomas pueden influir en los mecanismos del hospedero para el control del apetito localmente en el intestino, en un experimento separado, las ratas anestesiadas recibieron infusiones colónicas de 20 minutos de proteínas de *E. coli* de las fases exponencial o estacionaria, ambas a 0,1 mg/kg. Las concentraciones de ClpB en la mucosa del colon medidas 20 minutos después de la infusión fueron más altas en las 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* en la señalización del apetito del hospedero pueden depender de la fase de crecimiento bacteriano, descubrimos que las infusiones colónicas de proteínas de *E. coli* de la fase exponencial pero no de la fase estacionaria estimularon los niveles plasmáticos de GLP-1 y, por el contrario, se detectaron niveles plasmáticos aumentados de PYY después de la infusión de proteínas desde la fase estacionaria pero no exponencial.

Ingestión de alimentos y c-fos cerebrales después de administración aguda de proteínas de *E. coli* en ratas

Debido a que ClpB estaba presente en el plasma en todas las ratas y ratones probados, es posible que las proteínas de *E. coli* en el plasma pueden influir en el apetito a través de su acción sistémica y que tales efectos pueden 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, disminuyeron la ingestión de alimentos durante 1 hora y 2 horas durante la realimentación en comparación con el grupo control. En contraste, 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 aumentaron la ingestión de alimentos durante 4 horas durante la realimentación.

Para investigar más a fondo si las proteínas de *E. coli* totales pueden influir en la ingestión espontánea de alimentos de una manera dependiente de la fase de crecimiento, y para activar sitios centrales como el ARC, se inyectaron ratas de alimentación libre antes del inicio de la fase de oscuridad con proteínas bacterianas (0,1 mg/kg de peso corporal, I.P.). La ingestión de alimentos se midió durante 2 horas después de las inyecciones, y luego se sacrificó a 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 las controles, mientras que la ingestión 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 las proteínas de *E. coli* a ratas de alimentación libre, la expresión de c-fos se analizó inmunohistoquímicamente en el ARC y el núcleo ventromedial (VMN) del hipotálamo y en el CeA. El mayor número de células positivas a c-fos se encontró en el ARC y VMN de ratones que reciben proteínas bacterianas de la fase estacionaria. La mayoría de las células que expresan c-fos en el ARC contenían β -endorfina (controles, $71,31 \pm 12,81$ %, *E. coli* fase exp., $73,56 \pm 10,45$ %, *E. coli* fase est., $80,50 \pm 9,68$ %, ANOVA $p=0,36$), es decir fueron identificados como neuronas anorexigénicas de POMC. En consecuencia, el porcentaje de neuronas c-fos restantes en el ARC no difirió significativamente entre los grupos (controles, $28,69 \pm 12,81$ %, *E. coli* fase exp., $26,44 \pm 10,45$ %, *E. coli* fase est., $19,5 \pm 9,68$ %, ANOVA $p=0,36$). Aunque el número total de células positivas para β -endorfinas no fue significativamente diferente entre los grupos (controles, $54,82 \pm 10,67$ células, *E. coli* fase exp., $66,03 \pm 11,43$ células, *E. coli* fase est., $66,03 \pm 5,06$ células, ANOVA $p=0,09$), el número relativo de neuronas de activadas para β -endorfina aumentó en ratas que recibieron proteínas de fase estacionaria en comparación con los controles y en ratas que recibieron proteínas de fase exponencial. Además, el número de neuronas activadas para β -endorfinas se correlacionó inversamente con la ingestión de alimentos (Pearson $r=-0,57$, $p=0,018$).

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

Patrón de alimentación y neuropéptidos hipotalámicos después de inyecciones crónicas de proteínas 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 de alimentación libre. El primer día después de las inyecciones se caracterizó por un peso corporal y una ingestión de alimentos significativamente más bajos en ratones que recibieron proteínas bacterianas de la fase estacionaria pero no la exponencial en comparación con los controles. Aunque la cantidad de comida diaria no fue significativamente diferente entre los grupos, su disminución con relación al día anterior a las inyecciones se observó una semana después en ratones que recibieron proteínas de la fase estacionaria. La frecuencia de la comida 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 ingestión total de alimentos entre 3 grupos no fue significativamente diferente durante los 6 días de inyecciones, al analizarla por separado durante los períodos de luz y oscuridad, mostró que los ratones inyectados

con las proteínas de la fase exponencial habían aumentado la ingestión de alimentos durante el período de luz, pero disminuyeron durante el período de oscuridad. Por el contrario, los ratones que reciben las proteínas de la fase estacionaria se muestran por debajo de la ingestión de alimentos de 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 hacia una disminución, una semana después.

Para obtener 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 de ARNm hipotalámico de varios neuropeptidos involucrados en el control del apetito. Encontramos que los ratones que recibieron las proteínas de la fase estacionaria mostraron niveles elevados de ARNm precursor del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y orexina en comparación con los controles, y de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en comparación con los ratones inyectados con proteínas de la fase exponencial, que también mostraron niveles elevados de BDNF pero disminuyeron QRFP.

Activación electrofisiológica de neuronas POMC hipotalámicas por ClpB

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

Por lo tanto, estos resultados sugieren un efecto directo de la proteína ClpB sobre la saciedad y la saciedad.

Discusión

Nuestro estudio revela que las proteínas bacterianas pueden vincular fisiológicamente a las bacterias intestinales con el control del apetito del hospedero, incluyendo 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) el suministro regular de nutrientes acelera y estabiliza el crecimiento exponencial de *E. coli* dura 20 minutos, de acuerdo con los datos *en vivo*; 2) *E. coli* en la fase de crecimiento estacionaria se caracterizó por un mayor contenido de proteína bacteriana total y un perfil de proteoma diferente, que incluía un aumento de ClpB; 3) las proteínas de *E. coli* de ambas fases de crecimiento estimularon la producción de ATP *in vitro* de forma dependiente de la dosis; 4) los niveles plasmáticos de ClpB no cambiaron después del crecimiento bacteriano inducido por nutrientes en el intestino, sino que 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 estimularon los GLP-1 y PYY en plasma, respectivamente. 6) las inyecciones sistémicas de proteínas de *E. coli* disminuyeron significativamente la ingestión de alimentos solo por las proteínas de la fase estacionaria, acompañadas por la activación de c-fos en las neuronas anorexigénicas ARC y CeA, y finalmente 7) ClpB estimuló la tasa de activación de las neuronas ARC POMC.

Suministro regular de nutrientes y crecimiento bacteriano

Entre la amplia variedad de bacterias que colonizan los tractos gastrointestinales de los humanos, *E. coli* es el anaerobio facultativo más abundante, lo que lo justifica como un organismo modelo para las bacterias intestinales comensales (Foucault y otros 2009). Aquí, encontramos que *E. coli* cambia su dinámica de crecimiento durante el suministro regular de nutrientes, resultante después del 5^{to} ciclo de alimentación, en un crecimiento exponencial inmediato que dura 20 minutos seguido de la fase estacionaria. El ciclo de crecimiento se reproduce idénticamente luego 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 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 en el número de bacterias se mantuvo estable después de cada nueva provisión, lo que sugiere que la producción estable correspondiente de la biomasa bacteriana, incluyendo el aumento del contenido de proteínas en el intestino, puede desempeñar un papel de factor regulador inducido por las comidas para el hospedero. Dado que la fase prandial promedio en humanos es similar a la duración del crecimiento exponencial de bacterias alimentadas regularmente, es tentador especular que la saciedad del hospedero puede ser activada por bacterias intestinales que alcanzan la fase estacionaria, 20 minutos después de un contacto con nutrientes ingeridos. Sin embargo, el contenido bacteriano en el tracto gastrointestinal varía de 10^3 en el estómago a 10^{12} en el colon. Además, son necesarias aproximadamente 2 h para el avance de los nutrientes ingeridos a través del estómago y el intestino delgado y aproximadamente 10h a través del intestino grueso. Debido a este retraso en el suministro 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 iniciarse 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 la detección intestinal

Porque la dinámica de crecimiento de las *E. coli* alimentadas regularmente puede asociarse con las fases prandial y posprandial del hospedero, estudiamos si la expresión de proteínas bacterianas puede potencialmente vincular las bacterias intestinales y el control del apetito por parte del hospedero. Primero, comparamos los proteomas de *E. coli* en las fases de crecimiento exponencial con respecto a estacionaria. Para este análisis, las proteínas de *E. coli* se extrajeron en el medio de la fase exponencial, es decir 10 minutos después de la provisión de nutrientes, y en la fase estacionaria 2 horas más tarde, un tiempo normalmente caracterizado por sensación de saciedad. El hallazgo de al menos 40 proteínas expresadas diferencialmente entre las 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. Después se estudió la posible relevancia de la modificación del perfil de expresión de proteína para el control del apetito del hospedero: 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 reciente identificación proteómica de ClpB de *E. coli* como un mimético proteico conformacional de α -MSH (Tennoune y otros 2014); los datos que validaron nuestra hipótesis anterior de que las proteínas bacterianas intestinales, que muestran epítomos homólogos a péptidos anorexigénicos u orexigénicos, pueden ser responsables de la producción de autoanticuerpos con reacción cruzada (Fetissov y otros 2008). Es, por lo tanto, concebible que una combinación de tales proteínas miméticas bacterianas pueda influir directamente en el apetito, en dependencia del perfil de expresión de proteínas asociado con la fase de crecimiento bacteriano. Analizando los cultivos de *E. coli* y la mucosa intestinal, encontramos niveles elevados de ClpB asociados con la fase de crecimiento estacionaria. El aumento de ClpB puede, por lo tanto, contribuir a la activación de las vías anorexigénicas después la proliferación de *E. coli* inducida por nutrientes y el aumento de la producción de proteínas bacterianas. Una pregunta importante es dónde las proteínas bacterianas, como ClpB, pueden actuar en las vías reguladoras del apetito.

Aunque las proteínas bacterianas están presentes en la mucosa intestinal (Haange y otros 2012), su paso a través de la barrera intestinal no ha sido ampliamente estudiado (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 otros 2012). Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS), que se libera tras la lisis de bacterias gramnegativas, está naturalmente presente en el plasma de humanos y ratones sanos con niveles basales más altos después de consumir dietas altas en grasas (Cani y otros 2007). Los niveles plasmáticos de LPS también aumentan posprandialmente (Harte y otros 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. Esto indica que el ClpB en plasma, y muy probablemente otras proteínas bacterianas presentes en el plasma, no están fuertemente 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 soportada por nuestros datos, obtenidos para la validación de ELISA de ClpB, que muestran mayores concentraciones de ClpB en plasma en ratones criados crónicamente con *E. coli* pero no en ratones que recibieron *E. coli* *mutantes de ClpB*. Por lo tanto, es posible que las proteínas bacterianas intestinales presentes en el plasma, incluyendo la ClpB, puedan actuar vinculando sistémicamente 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 otros 2006). El ATP, derivado del catabolismo de nutrientes en bacterias y animales, sirve como el sustrato energético principal para los procesos anabólicos. Los animales pueden percibir cambios en el ATP a través de la actividad de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina-5' (AMPK), lo que resulta en una mayor ingestión de alimentos, cuando los niveles de ATP son bajos y *viceversa* (Dzambo y Steinberg, 2009). Por lo tanto, en el presente trabajo, comparamos la capacidad de las proteínas de *E. coli* en fase exponencial y estacionaria para generar ATP *in vitro*. De hecho, muchas de las proteínas identificadas mostraron propiedades anabólicas o catabólicas. Encontramos que las proteínas de *E. coli* son capaces de estimular la producción de ATP *in vitro* sugiriendo 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 la fase 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 dar lugar a una mayor síntesis de ATP. La relevancia de la eficiencia de la microbiota intestinal para coleccionar energía para el metabolismo del hospedero se estableció previamente al comparar humanos y ratones obesos y delgados (Turnbaugh y otros 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 las comidas puede conducir a un aumento del ATP intestinal, lo que debería contribuir a la detección luminal de la disponibilidad de energía y la relajación intestinal (Glasgow y otros 1998).

Los efectos intestinales de las proteínas de *E. coli* en las hormonas de la saciedad

Luego, estudiamos si las proteínas de *E. coli* en el intestino pueden estimular la liberación sistémica de hormonas intestinales de saciedad como GLP-1 y PYY (Adrian y otros 1985; Batterham y otros 2002; Beglinger y Degen, 2006; Pedernal y otros 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 otros 1992), y por lo tanto, las células L están directamente expuestas a proteínas bacterianas. Encontramos efectos diferenciales de las proteínas de *E. coli* en la liberación de GLP-1 y PYY, que muestran la estimulación de GLP-1 por las proteínas de las fases de crecimiento exponencial y de PYY de la estacionaria. Estos resultados apuntan a algunas similitudes entre el crecimiento bacteriano inducido por nutrientes y la dinámica conocida de liberación inducida por comidas de GLP-1 y PYY. De hecho, como se mostró en humanos, se produce un pico agudo de GLP-1 en plasma 15 minutos después de una infusión intragástrica de una comida líquida, mientras que un PYY elevado en plasma de mayor duración comienza entre 15 y 30 minutos después de una comida (Edwards y otros 1999; Gerspach y otros 2011). La liberación prolongada de GLP-1 se asoció con la ingestión de grasas (van der Klaauw y otros 2013). Por lo tanto, la dinámica de crecimiento de las bacterias intestinales alimentadas regularmente se ajusta temporalmente a la dinámica de la liberación de GLP-1 y PYY, lo que sugiere un papel inductivo de las bacterias intestinales, y específicamente de las proteínas de *E. coli*, en la señalización de saciedad intestinal inducida por las comidas. Un efecto diferencial de las proteínas de *E. coli* de la fase exponencial para estimular GLP-1, posiblemente pueden reflejar un papel incretinal de GLP-1 en el control glucémico (Edwards y otros 1999; Steinert y otros 2014). Una demostración reciente de MC4R funcional expresada por las células L (Panaro y otros 2014), proporcionan un antecedente para su posible activación por proteínas bacterianas miméticas α -MSH. Una mayor producción de ClpB durante la fase estacionaria de *E. coli*, así como también los niveles elevados de ClpB en la mucosa intestinal, asociados con el aumento de los niveles plasmáticos de PYY, sugieren un papel directo de ClpB en la activación de las células L productoras de PYY en el colon. Por otro lado, las hasta ahora no identificadas, proteínas de *E. coli* posiblemente reguladas a la alta durante la fase de crecimiento exponencial pueden estimular preferentemente la secreción de GLP-1.

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

Mostramos aquí que las inyecciones periféricas de las proteínas de *E. coli* a ratas hambrientas o de alimentación libre y ratones de alimentación libre cambiaron su ingestión de alimentos en dependencia de la fase de crecimiento de *E. coli*. Teniendo en cuenta que el ClpB plasmático no se vio afectado por la infusión intestinal de nutrientes, sino que fue estable en poco tiempo, 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 a la alta durante la fase estacionaria de larga duración deben dominar en el plasma y, por lo tanto, sus administraciones sistémicas pueden representar mejor las situaciones fisiológicas. Las concentraciones de 0,1 mg/kg de las proteínas de *E. coli* utilizadas en estos experimentos fueron similares a las dosis satietogénicas efectivas de hormonas peptídicas como la leptina o PYY después de administraciones periféricas en humanos o roedores (Batterham y otros 2002; Halaas y otros 1995; Heymsfield y otros 1999).

Se observó un aumento de la ingestión de alimentos en ratas hambrientas durante la realimentación en fase ligera después de 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 ingestión 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 de alimentación libre en la fase de oscuridad, solo se observó una disminución en la ingestión de alimentos que fue inducida por proteínas de la fase estacionaria.

Los resultados de inyecciones repetidas en ratones de alimentación libre 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 estuvo acompañado por una disminución de la ingestión de alimentos y el peso corporal, siendo significativo en ratones que recibieron proteínas de fase estacionaria y que también se caracterizaron por una mayor relación de saciedad. Aunque la ingestión de alimentos en estos ratones se normalizó a partir de entonces, una disminución progresiva de la cantidad de comida se acompañó por una mayor frecuencia de las comidas, muy probablemente como un mecanismo compensatorio para mantener la ingestión de alimentos (Meguid y otros 1998). Adicionalmente, los efectos diferenciales de las proteínas de *E. coli* se observaron durante las fases de luz y oscuridad. En consecuencia, el patrón de expresión de ARNm de neuropéptidos reguladores del apetito en el hipotálamo mostró una respuesta mixta con la activación de las vías anorexigénicas y orexigénicas. Cabe destacar que ambos grupos de ratones que reciben las proteínas de *E. coli* mostraron un aumento similar del ARNm de BDNF, una vía anorexigénica aguas abajo de MC4R en el VMN (Xu y otros 2003). Esta vía puede ser la base de una disminución de la ingestión de alimentos durante la fase oscura observada en ambos grupos, y que se acentuó aún más en ratones inyectados con las proteínas de fase exponencial que muestran niveles más bajos de QRFP orexigénico (Chartrel y otros 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 neuronas PVN que expresan MC4R (Lu y otros 2003). Estos cambios combinados con una mayor expresión de precursores de ARNm de orexina A que estimula la frecuencia de las comidas (Baird y otros 2009), puede contribuir a disminuir la cantidad de comida y la relación 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 claves, encontramos en ratas de alimentación libre una mayor expresión de c-fos en las neuronas anorexigénicas ARC POMC, así como también en el VMN, que se conoce desde hace mucho tiempo como centro de saciedad y está interconectado con las neuronas ARC POMC (Sternson y otros 2005). El patrón c-fos obtenido se asemeja al de una respuesta satietogénica durante la ingestión de alimentos (Johnstone y otros 2006) o inducida por hormonas de saciedad como PYY o polipéptido pancreático (Batterham y otros 2002; Challis y otros 2004; Lin y otros 2009). Un número relativamente pequeño (~10 %) de las neuronas POMC activas para 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, su contribución a la señalización por proteínas bacterianas no puede excluirse; estas neuronas también expresan MC3R y MC4R (Mounien y otros 2005). Además, una activación más fuerte de c-fos en las neuronas CeA CGRP que en ARC POMC (~40 %) puede significar una acción convergente aguas abajo de las neuronas ARC POMC y NPY/AgRP y posiblemente de otras áreas del cerebro que regulan el apetito, que no se analizaron aquí, como el núcleo del tracto solitario. Finalmente, para determinar si la activación de los sitios del cerebro que regulan el apetito, como las neuronas ARC POMC, por las 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 las neuronas POMC que expresan MC3R y MC4R funcionales (Smith y otros 2007), lo que sugiere que ClpB puede ser un activador fisiológico de las neuronas POMC hipotalámicas, algo similar al PYY satietogénico y la leptina (Batterham y otros 2002; Cowley y otros 2001). Sin embargo, no sabemos si ClpB pudo activar las neuronas POMC directamente o mediante una red local.

Tomados en conjunto, estos datos apoyan un papel de presencia sistémica las proteínas de *E. coli* cuya expresión se incrementa en la fase de crecimiento estacionaria, como ClpB, en la promoción del equilibrio energético negativo a través de la activación de las vías anorexigénicas 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 *Enterobacteriaceae* pueden influir en el balance energético del hospedero de manera positiva o negativa, respectivamente.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra el efecto de las bacterias que expresan ClpB en la ingestión de alimentos.

Ratones machos C57B16 de un mes de edad (Laboratorios Janvier) se aclimataron a la instalación de animales durante 1 semana y se mantuvieron como se describió anteriormente. Los ratones se distribuyeron en 3 grupos de la siguiente manera: (i) alimentado con sonda con 10^8 bacteria *E. coli* K12 (que expresa ClpB); (ii) alimentado con sonda con 10^8 bacteria *E. coli* K12 deficiente para ClpB; (iii) y controles que no recibieron ningún tratamiento. La cepa mutante ClpB se generó en el Laboratorio Bernd Bukau (ZMBH, Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania) y se proporcionó amablemente junto con el tipo silvestre correspondiente bacterias *E. coli* WT por el Dr. Axel Mogk. Los ratones se colocaron individualmente en las jaulas BioDAQ (Dietas de investigación) y se calibraron intragástricamente diariamente antes del inicio de la fase de oscuridad durante 21 días con 0,5 ml de medio LB con la bacteria. Los primeros días con sonda fueron acompañados por una disminución en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratones que recibieron *E. coli*, WT contrario a las bacterias que no expresan la proteína ClpB (Figura 1).

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el efecto de las bacterias que expresan ClpB en ratones obesos *ob/ob*.

Los ratones genéticamente obesos *ob/ob* se aclimataron a las instalaciones para animales durante 1 semana y se mantuvieron como se describió anteriormente. Los ratones fueron evaluados intragástricamente con (i) 10^8 bacteria *E. coli* K12 (que expresa ClpB); (ii) 10^8 bacteria *E. coli* K12 deficiente para ClpB; tanto en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iii) medio MH solamente, como control. La cepa mutante ClpB se generó en el Laboratorio Bernd Bukau (ZMBH, Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania) y se proporcionó amablemente junto con el tipo silvestre correspondiente bacterias *E. coli* WT por el Dr. Axel Mogk. Los ratones se colocaron individualmente en las jaulas BioDAQ (Dietas de investigación) y se calibraron intragástricamente diariamente durante 21 días como se indica.

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

Ejemplo 4

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

Los ratones genéticamente obesos *ob/ob* se aclimataron a las instalaciones para animales durante 1 semana y se mantuvieron como se describió anteriormente. Los ratones fueron evaluados intragástricamente con (i) 10^8 bacterias *E. coli* K12 (que expresa ClpB); (ii) 10^8 bacteria *E. coli* Niessle 1917 (que expresa ClpB) (iii) 10^8 bacteria *E. coli* Niessle 1917 (que expresa ClpB) en forma liofilizada; todo en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iv) medio MH solamente, como control. Los ratones se inocularon intragástricamente diariamente durante 14 días como se indica.

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

Ejemplo 5

Este ejemplo confirma la acción sacietogénica directa de ClpB.

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

Se mantuvieron ratas macho Sprague-Dawley de 200-250 g (Janvier, L'Arbresle, Francia) a 24 °C con un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 h (período de luz 7-19 h) en instalaciones especializadas para animales, con aire acondicionado. Las ratas fueron alimentadas con comida estándar granulada (dieta RM1, 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), las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg)/xilacina (5 mg/kg) mezcla (3:1 vol - 0,1 ml/100 g de peso corporal) y se colocaron en un nuevo instrumento estereotáxico estándar para ratas y ratones (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). Las cánulas se implantaron bajo un microscopio quirúrgico (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 incisiva establecida a -3,3 mm. Las cánulas se fijaron al cráneo con cemento dental soportado por los tornillos de anclaje. Después de despertar, las ratas se mantuvieron individualmente en las jaulas de metabolismo (Techniplast, Lyon, Francia) durante 1 semana y se alimentaron *ad libitum* con el mismo alimento estándar para roedores (RM1, SDS) con agua siempre disponible. Las condiciones físicas y el aumento de peso corporal se monitorearon diariamente en el postoperatorio para garantizar una buena recuperación.

Luego, las ratas se colocaron individualmente en las jaulas de ratas BioDAQ (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ), cada una equipada con un monitor de alimentación automática. Después de 3 días de aclimatación a las jaulas BioDAQ, las ratas fueron privadas de alimentos 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, diluido en 2 mL de solución cerebroespinal artificial estéril. Las inyecciones se realizaron 15 minutos antes del inicio de la fase oscura y el suministro de alimentos. La ingestión de alimentos se midió durante la fase oscura.

Los animales mostraron una disminución de la ingestión de alimentos dependiente de la dosis (ver Figura 12).

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra el efecto de la expresión de ClpB *Hafnia alvei* en ratones obesos *ob/ob*.

Los ratones genéticamente obesos *ob/ob* se aclimataron a las instalaciones para animales durante 1 semana y se mantuvieron como se describió anteriormente. Los ratones fueron evaluados intragástricamente con (i) 10^8 bacteria *Hafnia alvei* AF036 (que expresa ClpB); (ii) 10^8 bacteria *E. coli* K12 deficiente para ClpB; (iii) 10^8 bacteria *E. coli* Niessle 1917 (que expresa ClpB); todo en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iv) medio MH solamente, como control.

Los inventores muestran que el tratamiento con *Hafnia alvei* indujo una disminución significativa en el aumento de peso corporal en comparación con los controles obesos (Figura 13). Además, la disminución en el aumento de peso corporal se asoció con una disminución de la ingestión acumulada de alimentos (Figura 14) y con una disminución de las masas grasas y magras, sin alterar la relación de masa magra a masa grasa (Figura 15).

La lipasa sensible a hormonas (HSL) es una lipasa neutra intracelular que es capaz de hidrolizar triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol y ésteres de colesterol, así como también otros sustratos lípidos y solubles en agua. En particular, la activación de HSL induce lipólisis. La activación hormonal de HSL se produce a través de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), que fosforila HSL. Un aumento de la expresión de la forma fosforilada de la proteína HSL (pHSL) significa así la activación de la lipólisis. La expresión de pHSL se midió por transferencia Western.

Los inventores mostraron que la alimentación con sonda con las bacterias *E. coli* Niessle 1917 y *Hafnia alvei* aumentaron la expresión de pHSL (Figura 16) en comparación con el control y la sonda con bacterias *E. coli* K12. Por lo tanto, las bacterias *E. coli* Niessle 1917 y *Hafnia alvei* activan el mecanismo de la lipólisis.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra el efecto de la expresión de ClpB de *Hafnia alvei* en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas.

Ratones machos C57B16 de un mes de edad (Janvier Laboratories) fueron inducidos con una dieta alta en grasas/carbohidratos durante 2 semanas. Los ratones fueron luego sometidos a prueba intragástrica con (i) 10^8 bacteria *Hafnia alvei* AF036 (que expresa ClpB); (ii) 10^8 bacteria *E. coli* K12 deficiente para ClpB; tanto en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iii) medio MH solamente, como control. Los ratones se colocaron individualmente en las jaulas BioDAQ (Dietas de investigación) y se calibraron intragástricamente diariamente durante 21 días como se indica.

La inducción de obesidad mediante una dieta alta en grasas se validó mediante la medición del peso corporal promedio (Figura 17A), la masa grasa (Figura 17B) y la masa magra (Figura 17C) en un grupo inducido y un grupo no inducido por obesidad.

Los inventores demostraron que la alimentación con sonda con cualquier cepa de bacterias *Hafnia alvei* que expresan ClpB indujeron una reducción en el aumento de peso (Figura 18) y una reducción en el contenido de grasa (Figura 19).

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra el efecto de la expresión de ClpB de *Hafnia alvei* en ratas Zucker obesas *fafa*.

Las ratas Zucker genéticamente obesas *fafa* (Laboratorios Janvier) se aclimataron a las instalaciones de animales durante 1 semana y se mantuvieron como se describió anteriormente. Las ratas se inocularon intragástricamente con (i) 10^8 bacteria *Hafnia alvei* AF036 (que expresa ClpB); (ii) 10^8 bacteria *E. coli* K12 deficiente para ClpB; (iii) 10^8 bacteria *E. coli* Niessle 1917 (que expresa ClpB); todo en medio Mueller-Hilton (MH) o con (iv) medio MH solamente, como control. Las ratas se colocaron individualmente en las jaulas BioDAQ (Dietas de investigación) y se clasificaron intragástricamente diariamente durante 21 días como se indica.

Los resultados muestran que el aumento de peso corporal disminuye principalmente en el grupo de *H. alvei* en comparación con las ratas que recibieron *E. coli* K12 Δ -ClpB o *E. coli* Niessle 1917, o para el control (Figura 20). Además, la menor ingestión acumulada de alimentos se observa en el grupo de *H. Alvei* en comparación con los otros tres grupos (Figura 21).

Los inventores también muestran que la ganancia de masa grasa solo disminuye en el grupo de *H. alvei* (Figura 22).

Referencias

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 en la presente como referencia.

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.

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 otros, (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.

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 otros, (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.

Carter, M.E., Soden, M.E., Zweifel, L.S., and 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 otros, (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin 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.

Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Rego, J.C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., y otros, (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.
- 5 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.
- Dzambo, N.L., y Steinberg, G.R. (2009). AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiologica* 196, 115-127.
- 10 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.
- 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.
- 15 Fetissov, S.O., and Déchelotte, P. (2011). The new link between gut-brain axis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14, 477-482.
- 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.
- 20 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.
- 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.
- 25 Forsythe, P., y Kunze, W. (2013). Voices from within: gut microbes and the CNS. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 55-69.
- 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 otros, (2015). A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. *Nat Neurosci* doi:10.1038/nn.4011.
- 30 Gerspach, A.C., Steinert, R.E., Schonenberger, 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.
- 35 Goichon, A., Coëffier, M., Claeysens, S., Leclaire, S., Cailleux, A.-F., Bole-Feysot, C., Chan, P., Donnadieu, N., Lerebours, E., Lavoinne, A., y otros, (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.
- 40 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 otros, (2012). High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 35, 375-382.
- 45 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 otros, (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: A randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568-1575.
- 50 Inui, A. (1999). Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptidesmediation 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.
- 55 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.
- 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 otros, (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.
- 60 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.
- 65 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.
- 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., and 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 otros, (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 otros, (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., y 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 otros, (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 otros, (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., Ghoulzali, I., y otros, (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., Dhillo, 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> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)
- CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE ROUEN
- TARGEDYS
- UNIVERSITÉ DE ROUEN
- FETISSOV Serguei
- DECHELOTTE Pierre
- BRETON Jonathan
- LAMBERT Gregory

<120> Composiciones farmacéuticas y alimenticias basadas en Hafnia alvei para inducir saciedad y prolongar la saciedad

<130> CDM - 692/PCT/3

<160> 2

<170> BiSSAP 1.3.6

5 <210> 1

<211> 857

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

10

```

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
145     150     155     160
Leu Lys Lys Tyr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Arg Ala Glu Gln Gly Lys
165     170     175
Leu Asp Pro Val Ile Gly Arg Asp Glu Glu Ile Arg Arg Thr Ile Gln
180     185     190
Val Leu Gln Arg Arg Thr Lys Asn Asn Pro Val Leu Ile Gly Glu Pro
195     200     205
Gly Val Gly Lys Thr Ala Ile Val Glu Gly Leu Ala Gln Arg Ile Ile
210     215     220
Asn Gly Glu Val Pro Glu Gly Leu Lys Gly Arg Arg Val Leu Ala Leu
225     230     235     240
Asp Met Gly Ala Leu Val Ala Gly Ala Lys Tyr Arg Gly Glu Phe Glu
245     250     255
Glu Arg Leu Lys Gly Val Leu Asn Asp Leu Ala Lys Gln Glu Gly Asn
260     265     270
Val Ile Leu Phe Ile Asp Glu Leu His Thr Met Val Gly Ala Gly Lys
275     280     285

```

ES 2 808 939 T3

Ala	Asp	Gly	Ala	Met	Asp	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	Lys	Pro	Ala	Leu	Ala
290						295					300				
Arg	Gly	Glu	Leu	His	Cys	Val	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Tyr	Arg
305					310						315				320
Gln	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Phe	Gln	Lys	Val
				325						330				335	
Phe	Val	Ala	Glu	Pro	Ser	Val	Glu	Asp	Thr	Ile	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly
			340					345					350		
Leu	Lys	Glu	Arg	Tyr	Glu	Leu	His	His	His	Val	Gln	Ile	Thr	Asp	Pro
		355					360					365			
Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	His	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp	Arg
		370					375					380			
Gln	Leu	Pro	Asp	Lys	Ala	Ile	Asp	Leu	Ile	Asp	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser
385					390					395					400
Ile	Arg	Met	Gln	Ile	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu	Asp	Arg	Leu	Asp
				405					410					415	
Arg	Arg	Ile	Ile	Gln	Leu	Lys	Leu	Glu	Gln	Gln	Ala	Leu	Met	Lys	Glu
				420				425					430		
Ser	Asp	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Arg	Leu	Asp	Met	Leu	Asn	Glu	Glu	Leu
		435					440					445			
Ser	Asp	Lys	Glu	Arg	Gln	Tyr	Ser	Glu	Leu	Glu	Glu	Glu	Trp	Lys	Ala
		450					455					460			
Glu	Lys	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Thr	Gln	Thr	Ile	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu
465					470					475					480
Gln	Ala	Lys	Ile	Ala	Ile	Glu	Gln	Ala	Arg	Arg	Val	Gly	Asp	Leu	Ala
				485					490					495	
Arg	Met	Ser	Glu	Leu	Gln	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Glu	Leu	Glu	Lys	Gln
			500					505					510		
Leu	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln	Leu	Glu	Gly	Lys	Thr	Met	Arg	Leu	Leu	Arg
		515					520					525			
Asn	Lys	Val	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Arg	Trp	Thr
		530				535						540			
Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Met	Met	Glu	Ser	Glu	Arg	Glu	Lys	Leu	Leu
545					550					555					560
Arg	Met	Glu	Gln	Glu	Leu	His	His	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Asn	Glu	Ala
				565					570					575	
Val	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Ile	Arg	Arg	Ser	Arg	Ala	Gly	Leu	Ala
		580						585					590		
Asp	Pro	Asn	Arg	Pro	Ile	Gly	Ser	Phe	Leu	Phe	Leu	Gly	Pro	Thr	Gly
		595					600					605			
Val	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	Ala	Leu	Ala	Asn	Phe	Met	Phe	Asp
		610				615					620				
Ser	Asp	Glu	Ala	Met	Val	Arg	Ile	Asp	Met	Ser	Glu	Phe	Met	Glu	Lys
625					630					635					640

```

5  <210> 2
    <211> 13
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 2
    Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
    1              5              10

```

REIVINDICACIONES

1. Un método cosmético no terapéutico para inducir saciedad en un sujeto que lo necesita que comprende administrar oralmente al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.
5
2. Un método cosmético no terapéutico para prolongar la saciedad en un sujeto que lo necesita que comprende administrar oralmente al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.
3. Un método cosmético no terapéutico para reducir la ingestión de alimentos en un sujeto que lo necesita que comprende administrar oralmente al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.
10
4. Un método cosmético no terapéutico para reducir el aumento de peso en un sujeto que lo necesita que comprende administrar oralmente al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.
5. Un método cosmético no terapéutico para estimular la pérdida de peso en un sujeto que lo necesita que comprende administrar oralmente al sujeto una cantidad efectiva de *Hafnia alvei*.
15
6. El método cosmético no terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde *Hafnia alvei* se administra por vía oral al sujeto en forma de una composición alimenticia.
20
7. El método cosmético no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición alimenticia se selecciona del grupo que comprende composiciones alimenticias completas, suplementos alimenticios y composiciones nutracéuticas.
8. *Hafnia alvei* para su uso en un método para tratar la obesidad al inducir saciedad, prolongar la saciedad, reducir la ingestión de alimentos, reducir el aumento de peso o estimular la pérdida de peso en un sujeto que lo necesita, en donde *Hafnia alvei* se administra al sujeto por vía oral.
25
9. *Hafnia alvei* para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde *Hafnia alvei* se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica.
30
10. El método cosmético no terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o *Hafnia alvei* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde *Hafnia alvei* es un probiótico.
11. El método cosmético no terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o *Hafnia alvei* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde *Hafnia alvei* está inactivada.
35
12. El método cosmético no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición alimenticia comprende al menos un prebiótico.
13. El método cosmético no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el al menos un prebiótico es fibras dietéticas.
40

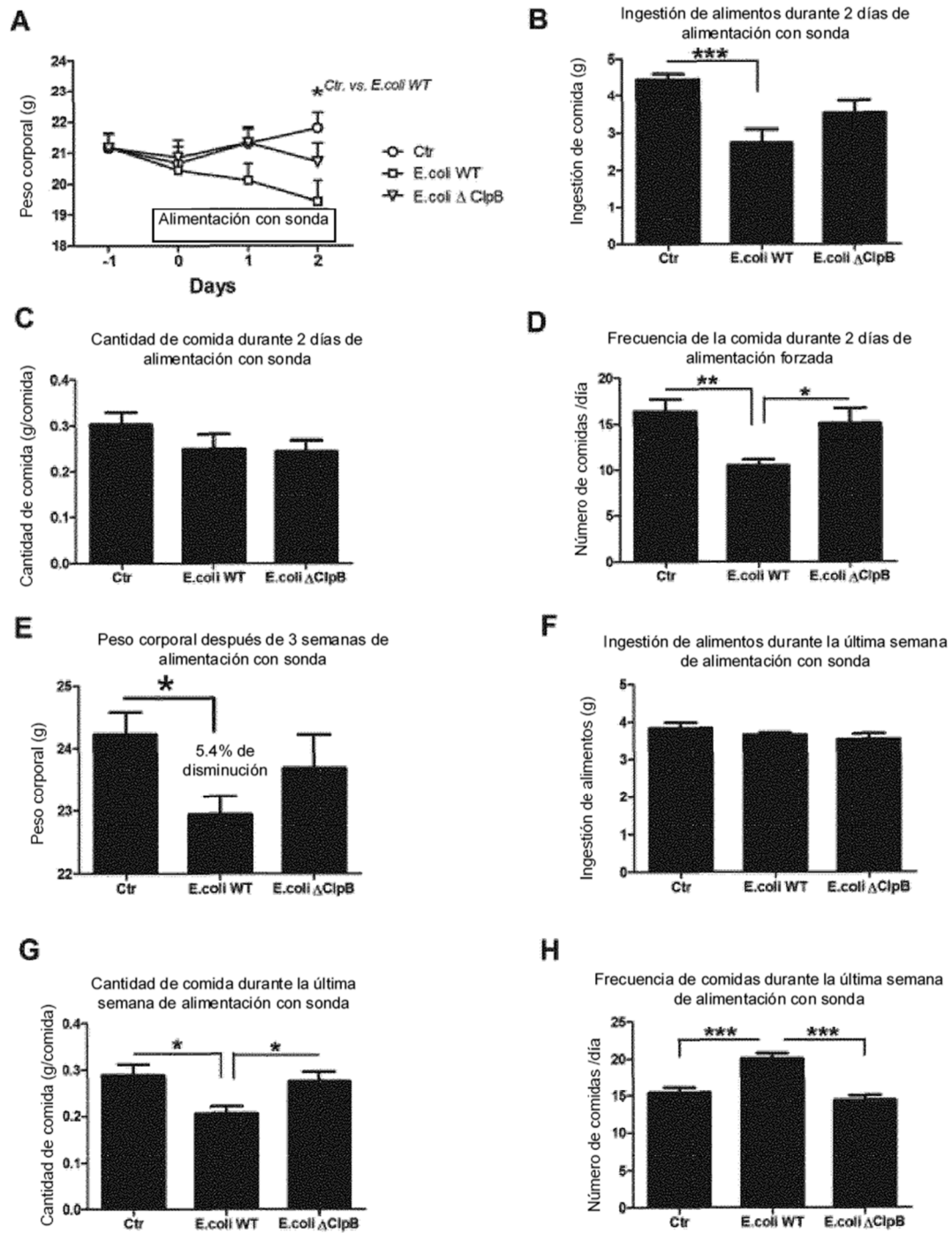


Figura 1

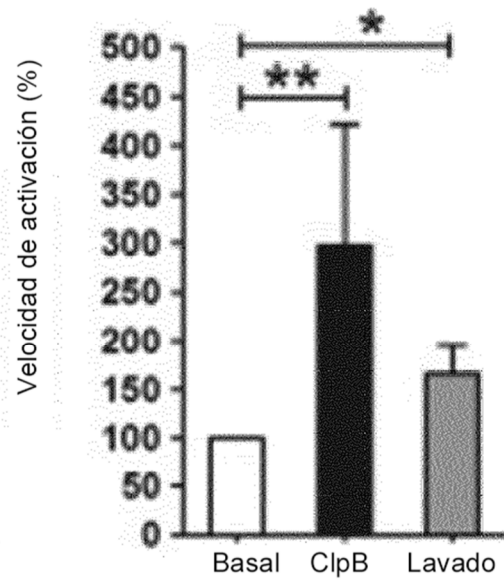


Figura 2

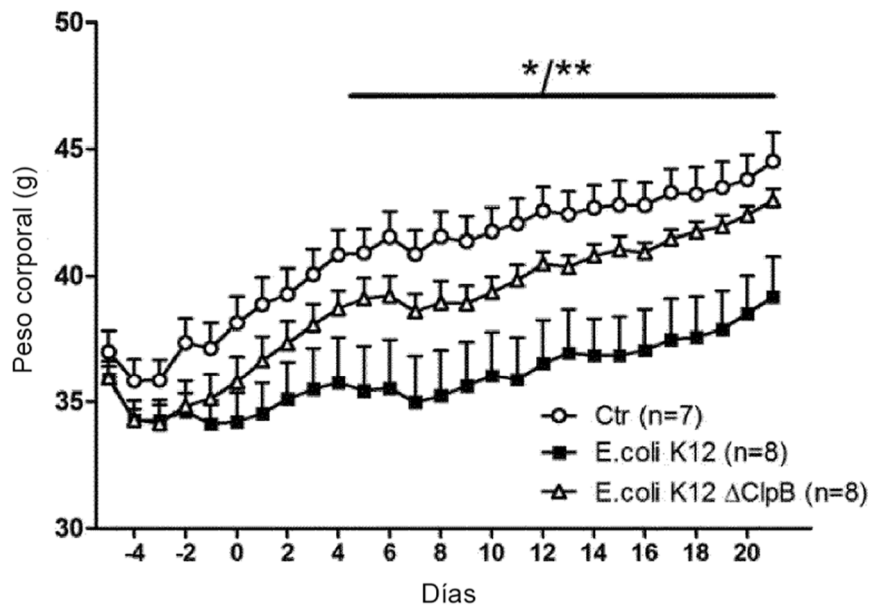


Figura 3

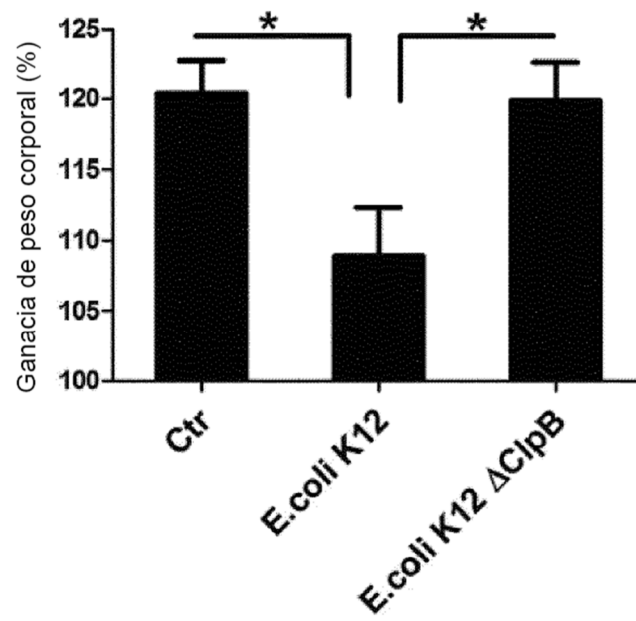


Figura 4

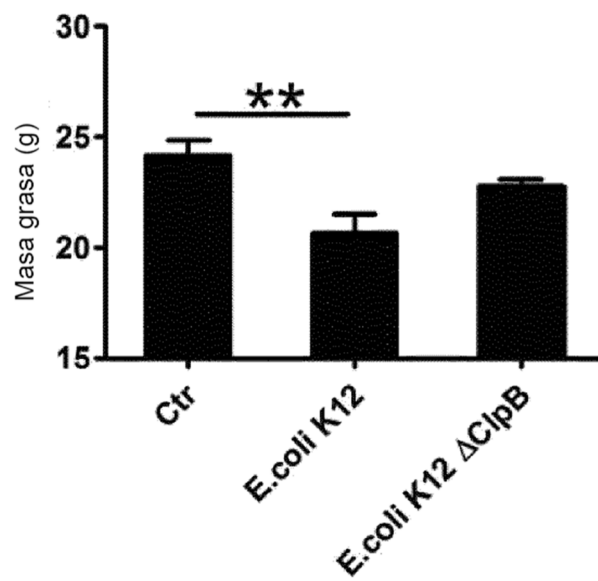


Figura 5

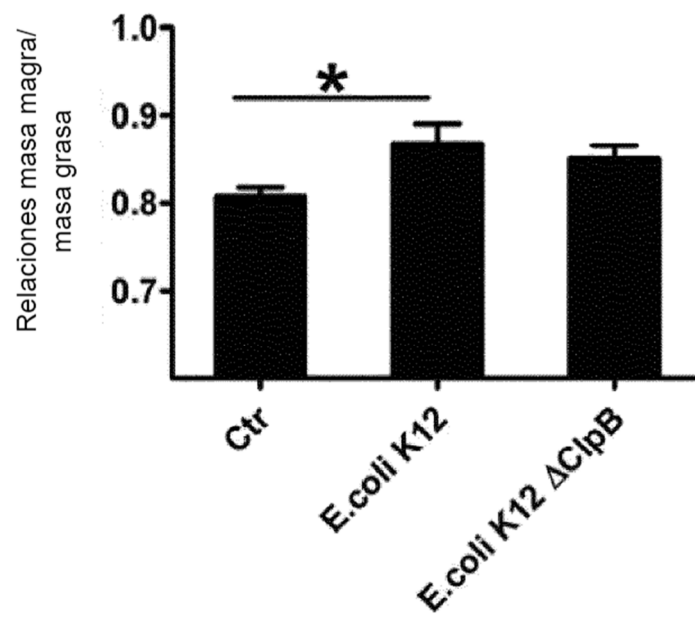


Figura 6

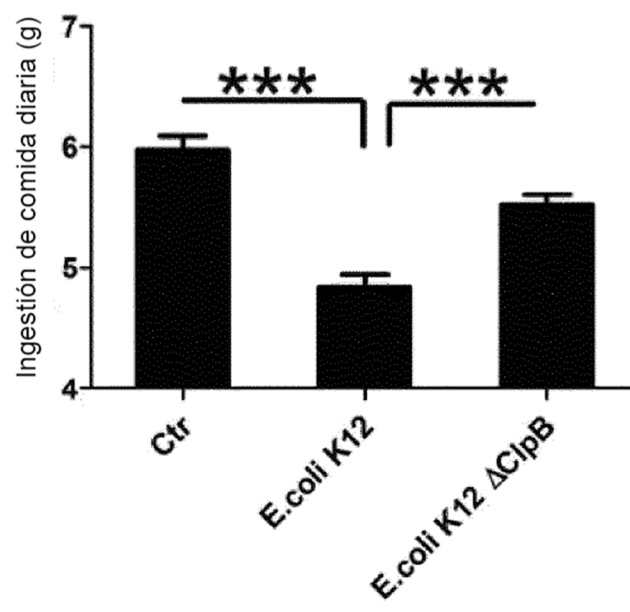


Figura 7

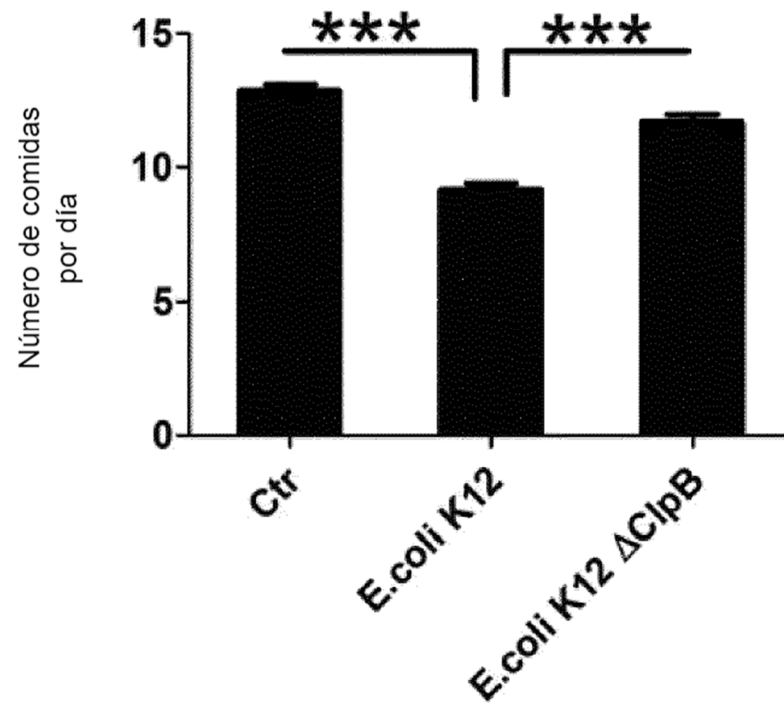


Figura 8

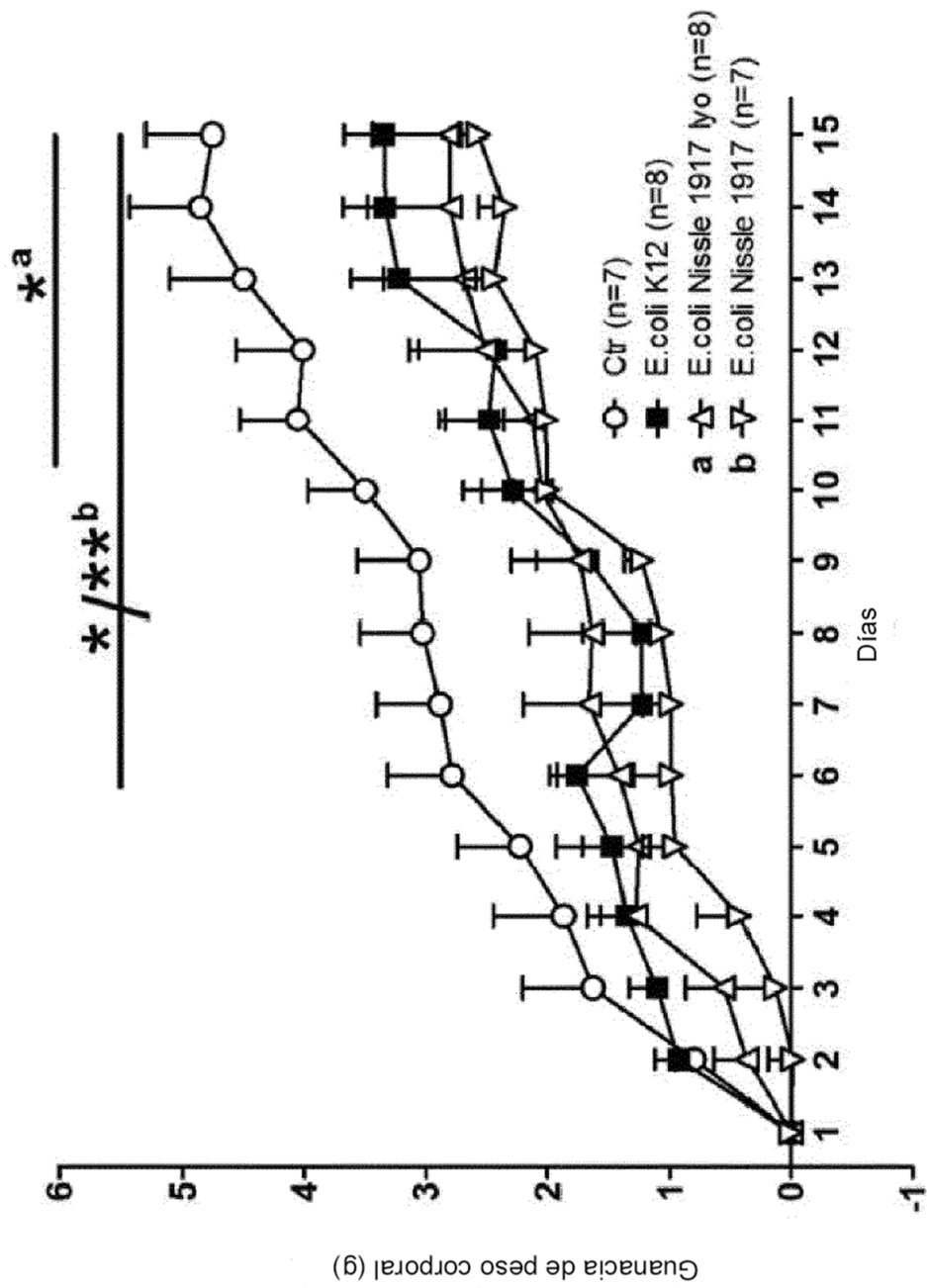


Figura 9

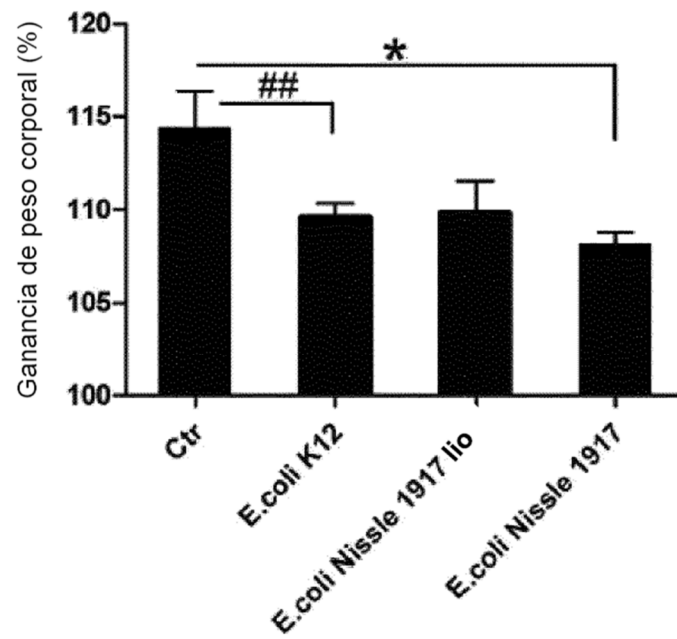


Figura 10

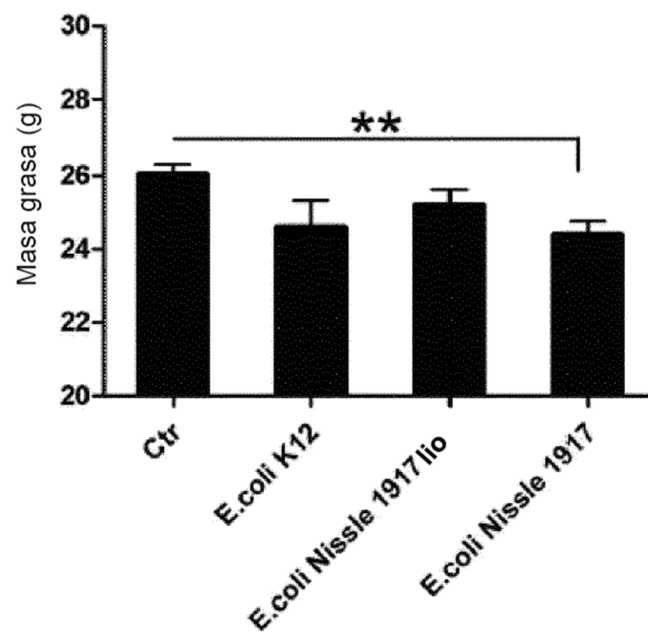


Figura 11

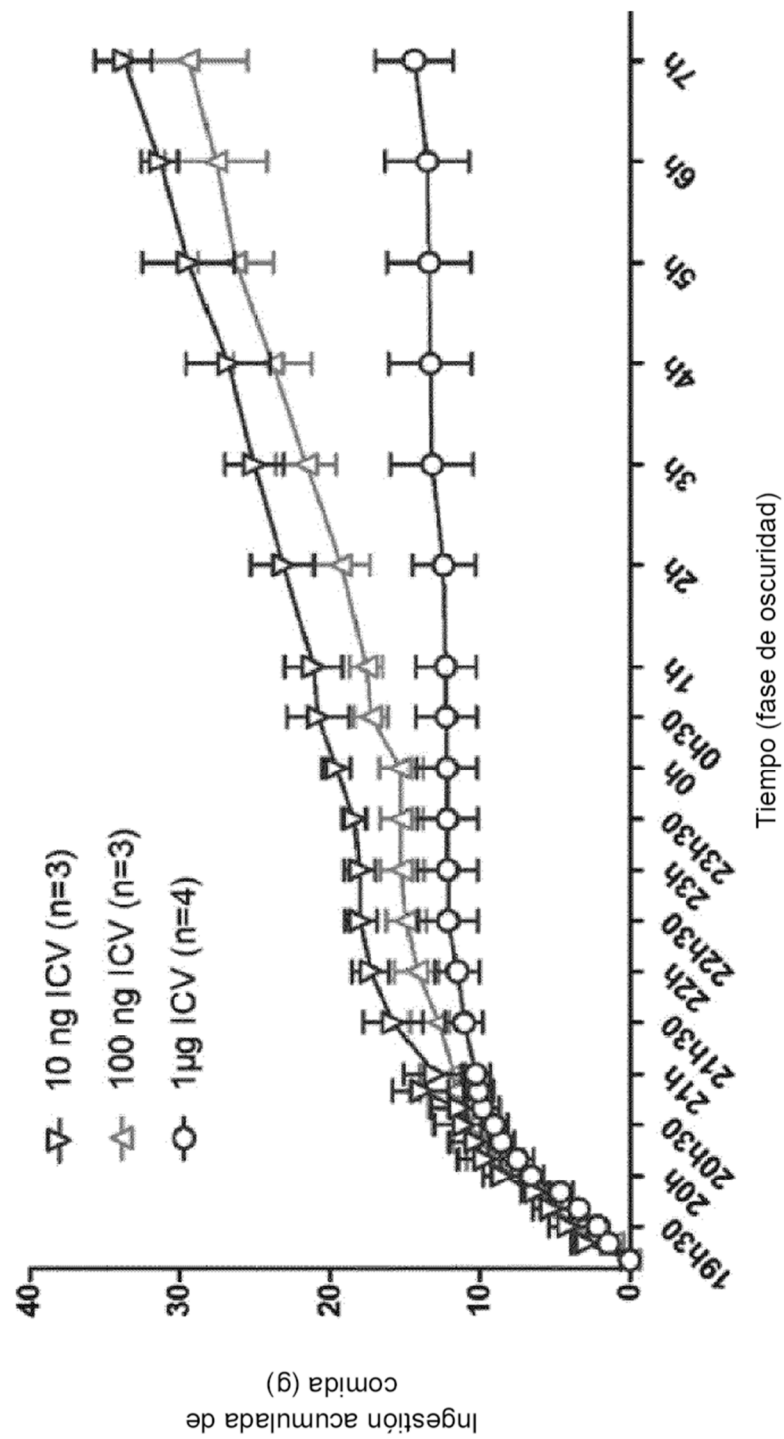


Figura 12

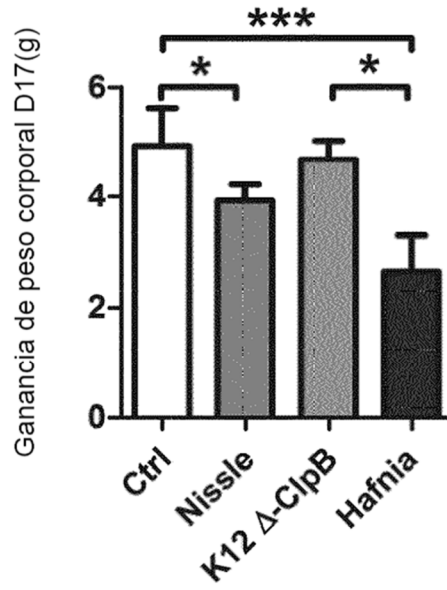


Figura 13

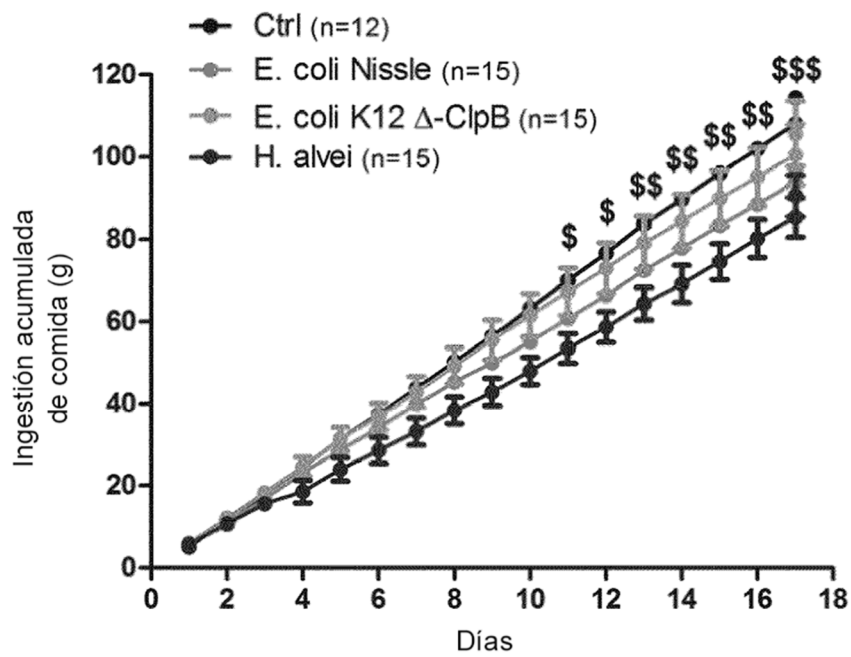


Figura 14

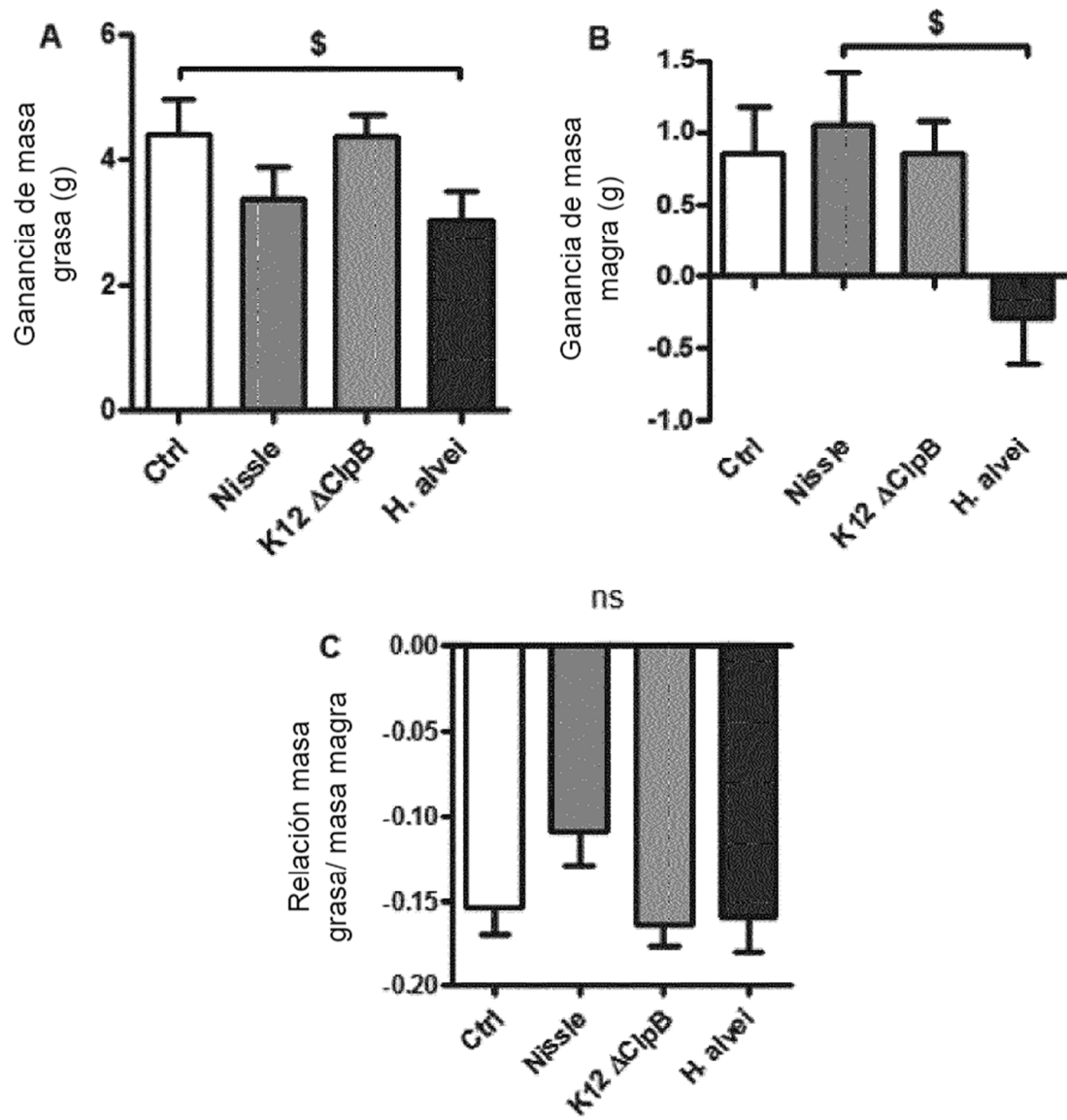


Figura 15

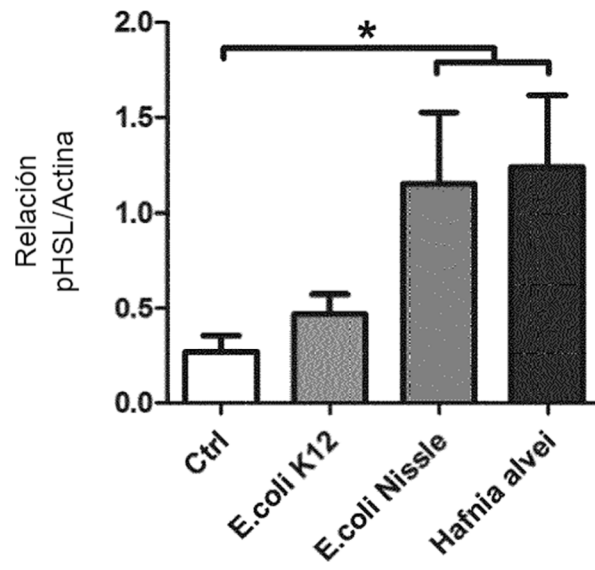


Figura 16

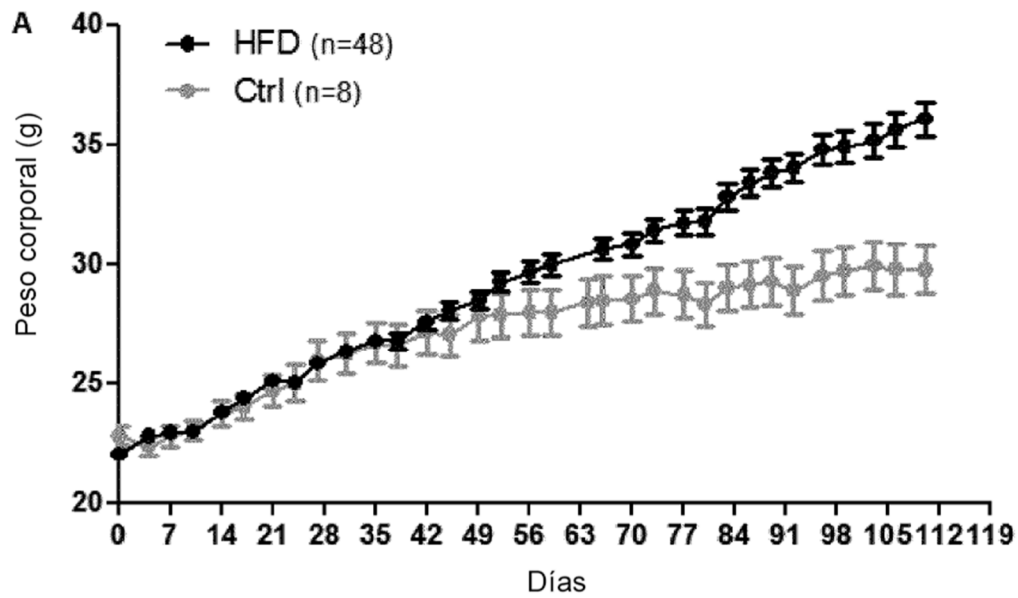


Figura 17A

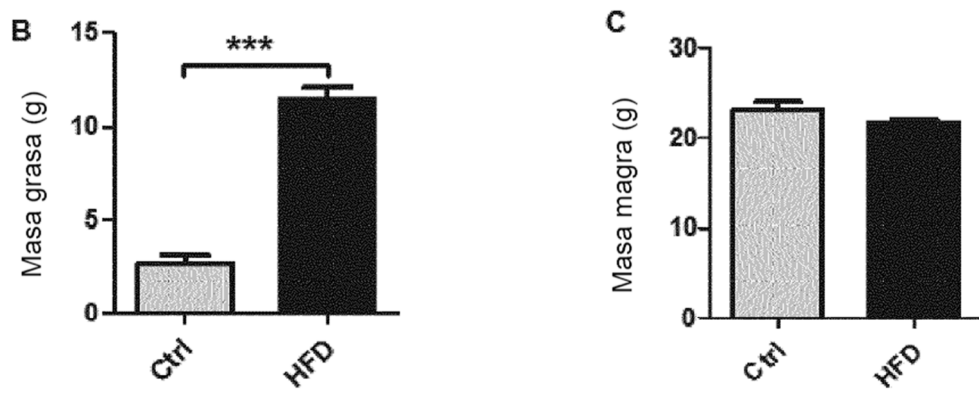


Figura 17 B-C

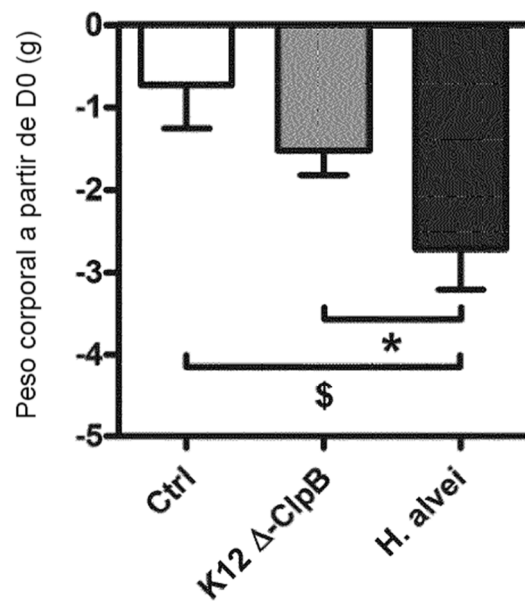


Figura 18

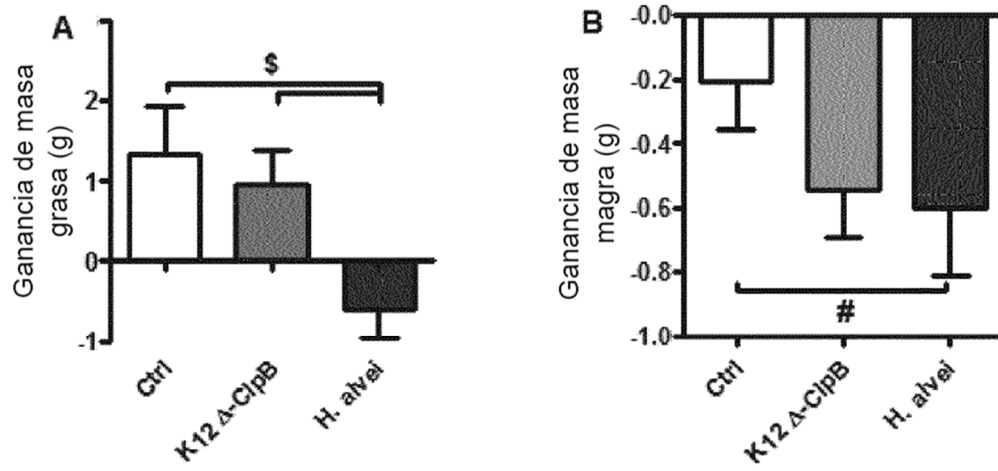


Figura 19

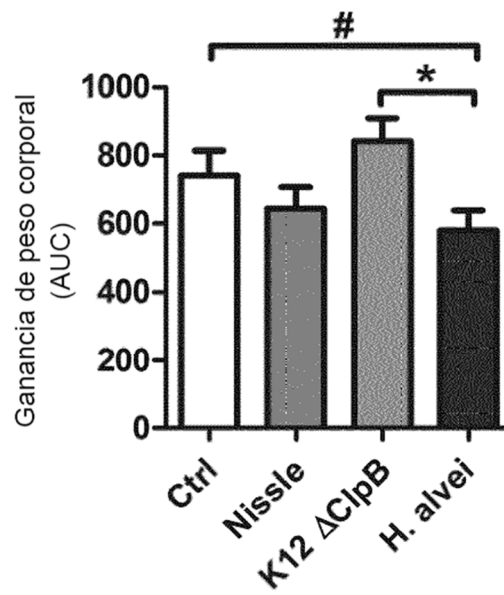


Figura 20

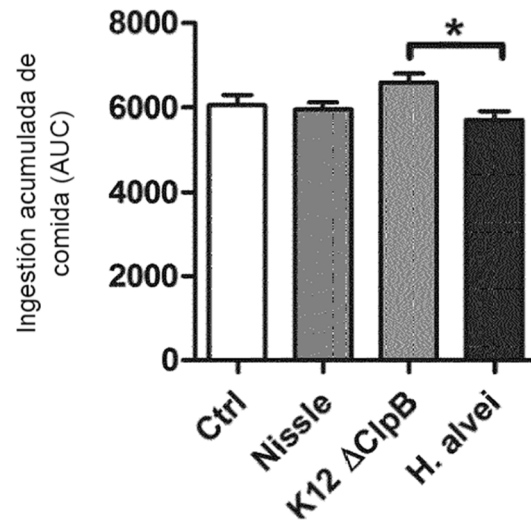


Figura 21

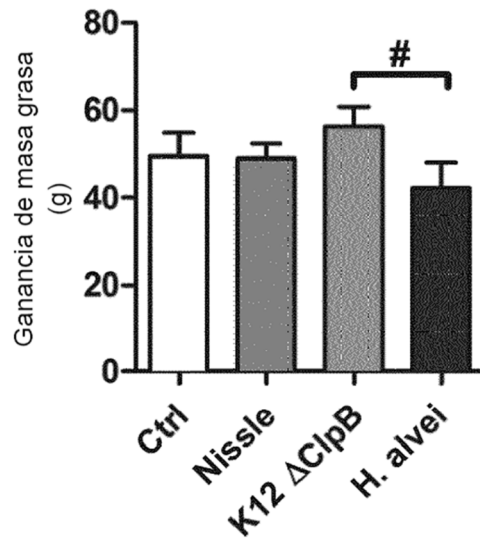


Figura 22