

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2023/006248 A2**

(43) Date de la publication internationale  
02 février 2023 (02.02.2023)

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 36/48 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)  
A61K 38/01 (2006.01) A23J 1/14 (2006.01)  
A61K 31/42 (2006.01) A23J 3/14 (2006.01)  
A61K 31/46 (2006.01) A23J 3/34 (2006.01)  
A61K 31/575 (2006.01) A23L 33/185 (2016.01)  
A61P 1/16 (2006.01)

(72) Inventeurs : **LEFRANC-MILLOT, Catherine** ; Rue de la Haute Loge, 62136 Lestrem (FR). **VIDAL, Hubert** ; 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Bénite (FR). **DE-FOIS, Clémence** ; 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Bénite (FR).

(74) Mandataire : **PLASSERAUD IP** ; 66 rue de la Chaussée d'Antin, 75440 Paris Cedex 09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2022/025353

(22) Date de dépôt international :

26 juillet 2022 (26.07.2022)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

FR2108059 26 juillet 2021 (26.07.2021) FR

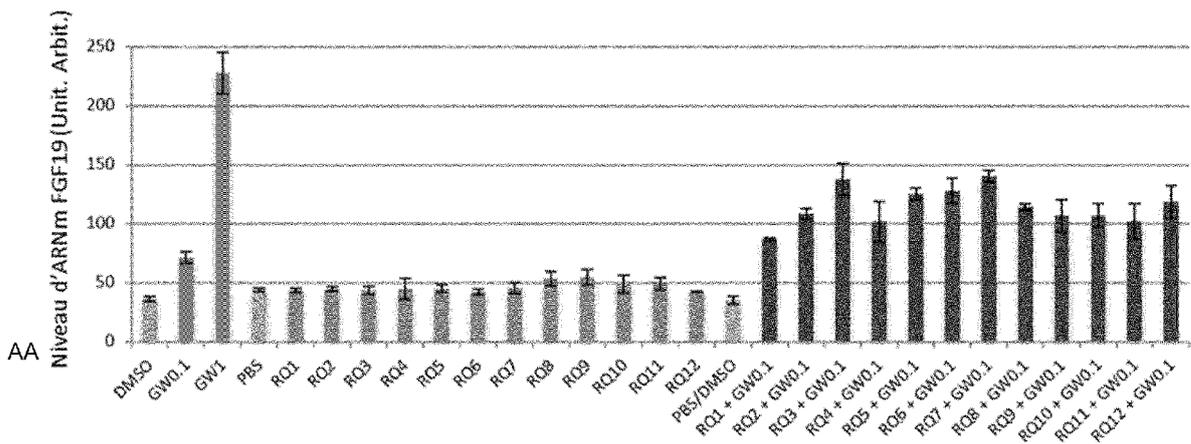
(71) Déposant : **ROQUETTE FRERES** [FR/FR] ; 1 rue de la Haute Loge, 62136 Lestrem (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR ACTIVATING THE SYNTHESIS OF FGF19

(54) Titre : METHODE D'ACTIVATION DE LA SYNTHÈSE DU FGF19

[Fig. 1]



AA Level of FGF19 mRNA (Arbit. Units)

(57) Abstract: The present invention is a pulse protein composition, preferably of pea or faba bean, the degree of hydrolysis of which is less than 10%, in particular for therapeutic use, preferably in the prevention and/or treatment of a disease susceptible to treatment by activation of the synthesis of FGF19.

(57) Abrégé : La présente invention consiste en une composition de protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10%, en particulier pour une utilisation thérapeutique, de préférence dans la prévention et/ou le traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par une activation de la synthèse du FGF19.



WO 2023/006248 A2

**(84) États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

- *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2(g))*
- *avec les informations concernant l'incorporation par renvoi d'un élément ou d'une partie manquant (règle 20.6)*

## Description

### Titre: METHODE D'ACTIVATION DE LA SYNTHÈSE DU FGF19

#### Domaine technique

5 [0001] La présente invention consiste en une composition de protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10%, en particulier pour une utilisation thérapeutique, de préférence dans la prévention et/ou le traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par une activation de la synthèse du FGF19.

#### 10 Art antérieur

[0002] Un fibroblaste est une cellule humaine présente dans le tissu conjonctif. Le rôle le plus important des fibroblastes est de maintenir la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs, et de réparer les lésions dues à un traumatisme. Ils servent aussi à réguler l'organisation et la différenciation des cellules des tissus environnants. Ces  
15 fibroblastes vont entre-autre sécréter la matrice extracellulaire, c'est-à-dire les protéines qui forment les fibres du tissu conjonctif et les glycoprotéines de la substance fondamentale. Ils interviennent également dans le métabolisme des lipoprotéines (LDL) et du cholestérol.

[0003] Les facteurs de croissance des fibroblastes (ou FGF, acronyme anglais de  
20 Fibroblast Growth Factor) forment une famille comportant 23 protéines identifiées à ce jour chez l'homme (FGF1, FGF2... FGF23) qui activent la migration et la multiplication des fibroblastes. Ces facteurs sont généralement sécrétés par des fibroblastes.

[0004] Le FGF19 (pour l'acronyme anglais de « Fibroblast growth factor 19 ») est  
25 une protéine appartenant à cette famille des facteurs de croissances des fibroblastes. Sa synthèse est activée par le FXR (pour l'acronyme anglais de « Farnesoid X receptor »), lui-même stimulé par les sels biliaries, ce qui a pour conséquence d'inhiber la néoglucogénèse et la synthèse des sels biliaries et

d'activer la synthèse protéique et du glycogène. Il joue également sur le métabolisme lipidique et du calcium.

**[0005]** Chez l'Homme, un taux sérique bas en FGF19 est en rapport avec des formes plus graves de stéatose hépatique non alcoolique ou NASH (*Alisi A, Ceccarelli S, Panera N et al. Association between serum atypical fibroblast growth factors 21 and 19 and pediatric nonalcoholic fatty liver disease, PLoS One, 2013;8:e6716*). Son utilisation afin de lutter contre la NASH a donc été étudiée. Sur un modèle animal, il semble hélas favoriser la formation d'un carcinome hépatocellulaire. Un analogue de la molécule a été développé, sans activité d'oncogénèse. Il semble être prometteur dans le traitement de la stéatose hépatique non alcoolique, diminuant le contenu en lipides des cellules hépatiques. L'utilisation d'un analogue est cependant contraignante du fait de la nécessité de la synthèse exogène dudit analogue et de sa consommation en tant que médicament. Il existe donc un besoin insatisfait de naturellement activer la synthèse *in-vivo* de FGF19 pour prévenir ou traiter la NASH.

**[0006]** La sarcopénie est un syndrome gériatrique se caractérisant dans un premier temps par une diminution des capacités musculaires due à l'âge et qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques. La sarcopénie observée chez la personne âgée est imputable au processus de vieillissement mais peut être accélérée par des facteurs pathologiques et comportementaux tels que la dénutrition et la sédentarité. Le FGF19 est récemment apparu comme une opportunité afin de lutter contre la prévalence de la sarcopénie (« *Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice.* » *Benoit & al., Nat Med. 2017 Aug;23(8):990-996*). Tout comme le traitement de la NASH, Il existe donc un besoin insatisfait de naturellement activer la synthèse *in-vivo* de FGF19 afin de lutter contre la prévalence de ce syndrome.

## Résumé

**[0007]** Il est du mérite de la demanderesse d'avoir mis en évidence qu'une composition de protéines de légumineuse, particulièrement de protéines de pois légèrement hydrolysées ou de protéines de féverole non hydrolysées permettait

d'activer la synthèse *in-vitro* de FGF19 dans des cultures cellulaires humaines, en particulier lorsque ces protéines représentent l'unique source protéique. Leurs ingestions quotidiennes dans la ration alimentaire permettent donc d'envisager de naturellement surexprimer la synthèse de FGF19 et donc lutter contre la prévalence  
5 ou le traitement de syndromes tels que la NASH ou la sarcopénie, citées ici de manière préférentielle et non exhaustives.

**[0008]** La présente invention consiste donc tout d'abord en une composition de protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% pour une utilisation thérapeutique chez un sujet qui  
10 en a besoin, de préférence pour une utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par une activation de la synthèse du FGF19, notamment une maladie associée à une dérégulation de la voie de signalisation du FGF19.

**[0009]** La présente invention consiste également en une composition  
15 pharmaceutique destinée à surexprimer le FGF19 comportant des protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% et optionnellement un excipient pharmaceutiquement acceptable.

**[0010]** L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée ci-dessous

## 20 **Brève description des dessins**

### **Fig. 1**

**[0011]** [Fig. 1] montre les effets des différents digestats sur l'expression du FGF19. Les cellules HT29 ont été exposées aux différents digestats protéiques (DP) seuls ou en combinaison avec un agoniste FXR.

### 25 **Fig. 2**

**[0012]** [Fig. 2a] montre l'augmentation de l'expression de l'ARNm FGF19 suite au traitement de cellules HT29 aux digestats RQ3 et RQ7. Les cellules HT29 ont été exposées à GW4064 à 0,1, 0,5 et 1  $\mu$ M et à un agoniste FXR naturel, l'acide

chenodeoxycholique (CDCA) à 50  $\mu$ M seul ou en combinaison pendant 6h avec les extraits RQ3 ou RQ7.

[0013] [Fig. 2b] montre l'augmentation de la production et la sécrétion de la protéine FGF19 suite au traitement de cellules HT29 aux digestats RQ3 et RQ7. Les cellules HT29 ont été exposées à GW4064 à 0,1, 0,5 et 1  $\mu$ M et à un agoniste FXR naturel, l'acide chenodeoxycholique (CDCA) à 50  $\mu$ M seul ou en combinaison pendant 6h (gauche) et 24h (droite) avec les extraits RQ3 ou RQ7.

### Fig. 3

[0014] [Fig. 3] montre l'augmentation du niveau d'expression du FGF19 (ARNm) suite au traitement de co-culture de cellules Caco-2 et HT29-MTX avec des digestats RQ3 et RQ7.

### Description détaillée

#### Composition de protéines de légumineuse selon l'invention

[0015] Les inventeurs ont montré qu'une composition de protéines de légumineuse, de préférence de pois ou de féverole dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% permettait d'activer l'expression du FGF19 dans des cellules humaines.

[0016] La présente invention consiste donc tout d'abord en une composition de protéines de légumineuse de préférence de pois ou de féverole dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% pour une utilisation thérapeutique chez un sujet qui en a besoin, de préférence pour une utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par une activation de la synthèse du FGF19, notamment une maladie associée à une dérégulation de la voie de signalisation du FGF19.

[0017] Le terme « protéine » ou « polypeptide » doit se comprendre dans la présente demande comme les macromolécules formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques constituées de l'enchaînement de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.

[0018] Par « légumineuse », on comprendra dans la présente demande la famille de plantes dicotylédones de l'ordre des *Fabales*. C'est l'une des plus importantes

familles de plantes à fleurs, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* par le nombre d'espèces. Elle compte environ 765 genres regroupant plus de 19 500 espèces. Plusieurs légumineuses sont d'importantes plantes cultivées parmi lesquelles le soja, les haricots, les pois, le pois chiche, la féverole, l'arachide, la  
5 lentille cultivée, la luzerne cultivée, différents trèfles, les fèves, le caroubier, la réglisse.

**[0019]** Dans le cadre particulier des protéines de pois, la présente invention concerne plus particulièrement les globulines (environ 50-60% des protéines du pois) et les albumines (20-25%). Les globulines de pois se subdivisent  
10 principalement en trois sous-familles : les légumineuses, les vicilines et les convicilines.

**[0020]** Les protéines extraites de ces légumineuses appartiennent majoritairement aux sous-groupes des globulines et des albumines. Dans la présente invention, la protéine de légumineuse est majoritairement constituée de globulines, en particulier elle contient plus de 90% en poids de globulines par rapport au poids total des  
15 protéines. Les globulines peuvent être distinguées des albumines par diverses méthodes bien connues de l'homme du métier, notamment par leur solubilité dans l'eau, les albumines étant solubles dans l'eau pure alors que les globulines sont uniquement solubles dans l'eau salée. On peut également identifier les albumines et globulines présentes dans un mélange par électrophorèse ou chromatographie.  
20 Une méthode préférée est décrite dans l'article « Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. » Fling SP, Gregerson DS, Anal. Biochem. 1986;155:83-88.

**[0021]** La protéine de légumineuse selon l'invention contient plus de 90% en poids de globulines par rapport au poids total des protéines.

**[0022]** Le terme « pois » étant ici considéré dans son acception la plus large et incluant en particulier toutes les variétés de « pois lisse » (« smooth pea ») et « de pois ridés » (« wrinkled pea »), et toutes les variétés mutantes de « pois lisse » et de « pois ridé » et ce, quelles que soient les utilisations auxquelles on destine  
25 généralement lesdites variétés (alimentation humaine, nutrition animale et/ou autres utilisations).  
30

**[0023]** Le terme « pois » dans la présente demande inclut les variétés de pois appartenant au genre *Pisum* et plus particulièrement aux espèces *sativum* et *aestivum*. Lesdites variétés mutantes sont notamment celles dénommées « mutants r », « mutants rb », « mutants rug 3 », « mutants rug 4 », « mutants rug 5 » et « mutants lam » tels que décrits dans l'article de C-L Heydley et al. intitulé « Developing novel pea starches » Proceedings of the Symposium of the Industrial Biochemistry and Biotechnology Group of the Biochemical Society, 1996, pp. 77-87.

**[0024]** Par « féverole », on entend le groupe des plantes annuelles de l'espèce *Vicia faba*, appartenant au groupe des légumineuses de la famille des Fabaceae, sous-famille des Faboideae, tribu des Fabeae. On distingue les variétés Minor et Major. Dans la présente invention, les variétés sauvages et celles obtenues par génie génétique ou sélection variétales sont toutes d'excellentes sources.

**[0025]** De manière préférée, les protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, possédant un degré d'hydrolyse inférieur à 10% sont la seule source protéique au sein de la composition. En effet, il est bien connu dans le domaine de l'invention que les protéines de légumineuses, sont caractérisées par un profil d'acides aminés déficient en certains acides aminés (methionine et cystéine) quand on le compare avec les profils requis en nutrition humaine. Cette déficience est souvent palliée en réalisant un mélange avec d'autres sources protéiques telles que les protéines animales ou les protéines de céréales comme le riz ou le blé. On peut citer par exemple « Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates » (Gorissen & al., Amino Acids 50, 1685–1695, 2018).

**[0026]** Dans ce mode préférentiel, la Demanderesse vise au contraire à exploiter au maximum l'effet des protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, possédant un degré d'hydrolyse inférieur à 10%, présente dans la composition afin de surexprimer au maximum le FGF19. Toute tentative de mélange avec d'autres sources protéiques afin de rétablir le profil en acides aminés aura pour conséquence un abaissement de l'effet sur la surexpression du FGF19.

**[0027]** Le degré d'hydrolyse peut être déterminé en mesurant la teneur en azote aminé libre par rapport à l'azote total selon le Test de degré d'hydrolyse décrit ci-

après. Son principe consiste tout d'abord en la détermination de la teneur en azote aminé (NH<sub>2</sub> libre) sur l'échantillon de protéines avec le kit MEGAZYME (référence K-PANOPA), suivi de la détermination de la teneur en azote protéique (azote total) de l'échantillon, enfin du calcul du degré d'hydrolyse à l'aide de ces deux teneurs.

5 - Détermination de la teneur en azote aminé :

**[0028]** Les groupes « azote aminé » des acides aminés libres de l'échantillon réagissent avec le N-acétyl-L-cystéine et l'OPhtaldialdéhyde (OPA) pour former des dérivés d'isoindole.

**[0029]** La quantité de dérivé d'isoindole formée au cours de cette réaction est stœchiométrique avec la quantité d'azote aminé libre. C'est le dérivé d'isoindole qui est mesuré par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

**[0030]** Dans un bécher de 100 mL, on introduit une prise d'essai P\*, exactement pesée, de l'échantillon à analyser. Cette prise d'essai sera de 0,5 à 5,0 g en fonction de la teneur en azote aminé de l'échantillon. On ajoute environ 50 mL d'eau distillée, on homogénéise et on transvase dans une fiole jaugée de 100 mL. On ajoute 5 mL de dodécyle sulfate de sodium (SDS) à 20% et on complète avec de l'eau distillée pour atteindre un volume de 100 mL. On agite pendant 15 minutes avec un agitateur magnétique à 1000 rpm. On prépare une solution n°1 en dissolvant un comprimé du flacon 1 du kit Megazyme dans 3 mL d'eau distillée et on agite jusqu'à dissolution complète. Il faut prévoir un comprimé par essai. La solution n°1 est préparée extemporanément.

**[0031]** On prépare un blanc, un standard et un échantillon directement dans les cuves du spectrophotomètre dans les conditions suivantes :

- blanc : introduire 3,00 ml de la solution n°1 et 50 µl d'eau distillée
- 25 - standard : introduire 3,00 ml de la solution n°1 et 50 µl du flacon 3 du kit Megazyme
- échantillon : introduire 3,00 ml de la solution n°1 et 50 µl de la préparation de l'échantillon.

**[0032]** On mélange le contenu de chaque cuve et on lit la mesure d'absorbance (A1) des solutions après 2 mn environ au spectrophotomètre à 340 nm (spectrophotomètre équipé de cuves de 1,0 cm de trajet optique, pouvant mesurer à une longueur d'onde de 340 nm, et vérifié selon le mode opératoire décrit dans le manuel technique du constructeur qui s'y rapporte).

**[0033]** On amorce ensuite les réactions immédiatement en ajoutant 100 µL de la solution n°2 qui correspond à la solution d'OPA du flacon 2 du kit Megazyme dans chaque cuve de spectrophotomètre.

**[0034]** On mélange le contenu de chaque cuve et on les place environ 20 minutes dans l'obscurité.

**[0035]** On lit ensuite la mesure d'absorbance A2 du blanc, du standard et de l'échantillon au spectrophotomètre à 340 nm.

**[0036]** La teneur en azote aminé libre, exprimée en pourcentage en poids par rapport au poids du produit, est donnée par la formule suivante : [Math 1]

$$\% \text{ azote aminé} = \frac{(\Delta A_{ech} - \Delta A_{blc}) \times 3,15 \times 14,01 \times V \times 100}{6803 \times 0,05 \times m \times 1000}$$

$$\% \text{ azote aminé} = \frac{(\Delta A_{ech} - \Delta A_{blc}) \times 12,974 \times V}{m \times 1000}$$

où :

$\Delta A_{ech} = A_{ech2} - A_{ech1}$

$\Delta A_{blc} = A_{blc2} - A_{blc1}$

A<sub>ech2</sub> = absorbance de l'échantillon après ajout de la solution n°2

A<sub>ech1</sub> = absorbance de l'échantillon après ajout de la solution n°1

A<sub>blc2</sub> = absorbance du blanc après ajout de la solution n°2

A<sub>blc1</sub> = absorbance du blanc après ajout de la solution n°1

V = volume de la fiole

m = masse de la prise d'essai en g

6803 = coefficient d'extinction du dérivé d'isoindole à 340 nm (en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

14,01 = masse molaire de l'azote (en g.mol<sup>-1</sup>)

3,15 = volume final dans la cuve (en mL)

0,05 = prise d'essai dans la cuve (en mL)

- Détermination de la teneur en azote protéique :

La teneur d'azote protéique est déterminée selon la méthode de DUMAS selon la norme ISO 16634 - 2016. Elle est exprimée en pourcentage en poids par rapport au poids du produit.

5 - Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) est calculé avec la formule suivante : [Math 2]

$$DH = \frac{\% \text{ azote aminé}}{\% \text{ azote protéique}} \times 100$$

[0037] Comme il sera démontré plus loin dans la partie relative aux exemples de cette demande de brevet, il est important au sens de l'invention d'utiliser des protéines de pois, possédant un degré d'hydrolyse strictement compris entre 5% et 10%. En effet, si le degré d'hydrolyse est supérieur ou inférieur on constate que l'effet d'activation de la synthèse du FGF19 est moins performant.

#### **Procédé de préparation des protéines de légumineuse selon l'invention**

[0038] Dans un mode premier préférentiel de l'invention, les protéines de légumineuse sont des protéines de pois dont le degré d'hydrolyse est préférentiellement compris entre 5% et 10%.

[0039] Les protéines de pois, possédant un degré d'hydrolyse strictement compris entre 5% et 10% sont obtenues par tout moyen bien connu de l'homme de l'art.

[0040] La base de départ est une farine, préférentiellement un concentrat (plus de 50% de protéines sur la MS), encore plus préférentiellement un isolat (plus de 80% de protéines sur la MS). Tout procédé bien connu de l'homme du métier pour ce faire sera utilisé, que ce soit par voie sèche (extraction sans utilisation de solvant aqueux p.e. via turboséparation) ou par voie humide (obtention d'une farine par broyage, mise en suspension de la farine dans un solvant aqueux, extraction des composés insoluble en particulier l'amidon et les fibres internes, précipitation isoélectrique des protéines appartenant aux groupes des globulines, récupération de celle-ci par centrifugation). Les protéines de pois obtenues par voie humide sont particulièrement préférées car elle mène à l'obtention d'un isolat qui concentre au maximum les capacités de celui-ci à aller activer la synthèse du FGF19.

**[0041]** Les protéines de pois (farine, préférentiellement concentrat, encore plus préférentiellement isolat) seront ensuite hydrolysées. Toute méthode d'hydrolyse protéique qu'elle soit chimique, physique, enzymatique ou biologique bien connue de l'homme du métier est utilisable afin d'obtenir les protéines de légumineuse, 5 préférentiellement de pois, à utiliser pour l'invention. L'hydrolyse enzymatique sera préférée, en particulier une hydrolyse réalisée avec protéase appartenant au sous-groupe des aminopeptidase provenant d'*Aspergillus Orizae*.

**[0042]** La préparation de l'hydrolysate de protéines de pois adapté à l'invention comporte donc préférentiellement une hydrolyse par voie enzymatique ou non 10 enzymatique, de manière à ce que ledit isolat de protéines de pois présente un degré d'hydrolyse (DH) compris entre 5 % et 10 %, de préférence entre 6 % et 8 %, de manière encore plus spécifique de 6,5 % à 7 %.

**[0043]** Dans un premier mode de réalisation, l'hydrolyse est réalisée par une endopeptidase. Il est choisi une endopeptidase non spécifique, dérivée d'une 15 souche d'*Aspergillus* en particulier une souche de *Aspergillus spp* ou *Aspergillus Oryzae*. Il est choisi plus particulièrement une endopeptidase EC 3-4-11.

**[0044]** La quantité exacte d'enzyme ajoutée à la suspension pour obtenir les caractéristiques souhaitées des isolats de protéines de pois variera en fonction de caractéristiques spécifiques telles que l'enzyme ou le système enzymatique 20 utilisés ; le degré final désiré d'hydrolyse ; et/ou la distribution de poids moléculaire / final souhaité. Étant donné que ces paramètres sont connus, l'homme de l'art peut facilement déterminer les conditions appropriées pour obtenir les caractéristiques désirées de l'isolat de protéines de pois.

**[0045]** Dans un mode de réalisation particulier, les protéines de pois initiale 25 utilisées pour préparer l'isolat de protéines de pois selon l'invention est une composition de protéines de pois telle que décrites dans la demande WO 2007/17572 ou préparée par un procédé tel que décrit dans la demande WO 2007/17572 (l'enseignement étant incorporé par référence). Dans un mode de réalisation particulier, la composition de protéines de pois initiale est la composition 30 commercialisée par ROQUETTE FRERES sous le nom de marque NUTRALYS® S85F.

**[0046]** Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la suspension de protéines de pois est amenée à une valeur de 5 à 20 % en poids de matière sèche, en particulier de 15 à 20 %. La température de réaction est ajustée à une valeur comprise entre 50 et 60°C, de préférence de l'ordre de 55°C. En règle générale, le système d'enzyme ou une enzyme est ajouté à la suspension en des quantités dans la gamme d'environ 0,3 à 1 % poids/volume. La réaction d'hydrolyse est typiquement effectuée dans une durée souhaitée afin d'obtenir le degré d'hydrolyse et/ou le profil désiré de poids moléculaire désiré, en l'occurrence ici pendant une période d'environ 45 minutes à environ 2 h 30 minutes, de préférence d'environ 1 heure. Une fois encore, le temps nécessaire à la réaction d'hydrolyse dépend des caractéristiques comme indiqué ci-dessus, mais peut être facilement déterminée par l'homme du métier.

**[0047]** Dans d'autres réalisations, la suspension contenant des protéines de pois peut être hydrolysée en utilisant des moyens non enzymatiques, par exemple par hydrolyse mécanique (physique) et/ou chimique. Cette technique est également bien connue dans l'état de l'art.

**[0048]** Une fois que les protéines de pois ont été hydrolysées au degré souhaité, la réaction d'hydrolyse est arrêtée, par exemple, par inactivation de l'enzyme, ou par d'autres moyens classiques. Dans un mode de réalisation, l'inactivation de l'enzyme est effectuée par traitement thermique. Conformément à la pratique établie, la préparation d'enzyme peut convenablement être inactivée en augmentant la température de la suspension d'incubation à une température à laquelle les enzymes deviennent inactivées, par exemple à environ 70°C pendant environ 10 minutes. Les isolats de protéines de pois ainsi obtenus sont ensuite traités à haute température courte durée (HTST), puis pasteurisés, éventuellement concentrés à une matière sèche de 10 à 30 %, avant d'être séchés par atomisation. Par exemple, l'isolat peut être pasteurisé à une température comprise entre 130°C et 150°C pendant une période d'environ 1 seconde à environ 30 secondes.

**[0049]** Dans un second mode préférentiel alternatif de l'invention, les protéines de légumineuse sont des protéines de féverole dont le degré d'hydrolyse n'est pas

modifié par hydrolyse après son extraction, préférentiellement avec un degré d'hydrolyse compris entre 0% et 5%.

**[0050]** Comme il sera démontré plus loin dans la partie relative aux exemples de cette demande de brevet, il est préférable au sens de l'invention d'utiliser des protéines de féverole par rapport aux protéines de pois. En effet, l'effet d'activation de synthèse est plus important en particulier dans un contexte de coopération cellulaire. Cette constatation d'une efficacité plus importante a été démontrée à l'aide de protéines de féverole dont le degré d'hydrolyse n'a pas été augmenté avec une hydrolyse enzymatique, physique ou biologique.

10 **[0051]** La protéine de féverole est obtenue par tout moyen bien connu de l'homme de l'art que ce soit par voie sèche (extraction sans utilisation de solvant aqueux p.e. via turboséparation) ou par voie humide (obtention d'une farine par broyage, mise en suspension de la farine dans un solvant aqueux, extraction des composés insoluble en particulier l'amidon et les fibres internes, précipitation isoélectrique des protéines appartenant aux groupe des globulines, récupération de celle-ci par centrifugation). Les protéines de féveroles obtenues par voie humide sont particulièrement préférées car elle mène à l'obtention d'un isolat qui concentre ainsi au maximum les capacités de celui-ci à aller activer la synthèse du FGF19.

20 **[0052]** Un procédé particulièrement préféré pour l'obtention des protéines de féverole est le suivant :

**[0053]** La première étape consiste en la mise en œuvre de graines de féverole. Celles-ci comportent encore leurs fibres externes protectrices, appelées également « hulls » en anglais. Les graines peuvent subir un pré-traitement susceptible de comporter des étapes de nettoyage, de tamisage (séparation des graines des cailloux par exemple), de trempage, de blanchiment, de toastage. De manière préférée, si un blanchiment est effectué, le barème du traitement thermique sera de 3 minutes à 80°C. Des exemples non-limitatifs de variétés sont par exemple les variétés Tiffany, FFS ou YYY. De manière préférentielle, on utilisera des variétés de graines de féveroles dont la teneur en tanins et/ou polyphénols est naturellement basse telles que la variété Organdi. De telles variétés sont connues et susceptibles d'être obtenues par croisement variétal et/ou modifications génétiques.

**[0054]** La seconde étape vise la séparation la plus efficace possible des fibres externes et des cotylédons. Elle est initiée par exemple par un premier broyage des graines de féverole à l'aide d'un moulin à pierre. Un exemple particulier et particulièrement approprié d'un tel moulin à pierre est par exemple commercialisé par la société Alma®. Comme précédemment décrit, la graine va être introduite dans un espace constitué de deux disques en pierre, dont l'un est en rotation. La demanderesse s'est aperçue que cette technique est particulièrement d'intérêt car elle va provoquer une séparation très efficace des fibres externes et des cotylédons des graines. De manière préférée, l'espace inter-disque est ajustée entre 0,4 et 0,6 mm.

**[0055]** Le broyat obtenu subit ensuite l'application d'un flux d'air ascendant, à contre-courant. Les différentes particules solides vont être classifiées selon leur densité. Typiquement, après équilibre, on obtient deux fractions : une fraction légère contenant majoritairement les fibres externes ou « hulls » et une fraction « lourde » contenant majoritairement les cotylédons. Un exemple particulier et particulièrement approprié d'un appareillage adéquat est par exemple le MZMZ 1-40 commercialisé par la société Hosokawa-alpine®.

**[0056]** La fraction lourde, enrichie en cotylédons, va ensuite être broyée à l'aide d'un moulin à couteaux. Un exemple particulier et particulièrement approprié d'un tel moulin à couteaux est par exemple le SM300 commercialisé par la société Retsch®.

**[0057]** La succession des trois opérations ci-dessus citées au sein de la seconde étape vise à séparer de manière très fine les fibres externes et les cotylédons, en évitant de dégrader ces deux parties et mélanger celle-ci.

**[0058]** La troisième étape vise à réduire la granulométrie de la fraction lourde enrichie en cotylédons par leur broyage à l'aide d'un broyeur à rouleaux. Un exemple particulier et particulièrement approprié d'un tel broyeur à rouleaux est par exemple le MLU 202, commercialisé par la société Bühler®. Il est ici utilisé afin de réduire la granulométrie de la farine de manière globale, afin d'obtenir une poudre homogène et suffisamment fine afin de permettre à l'étape 4 suivante d'être facilitée. La granulométrie préférée est comprise entre 200 et 400 microns,

préférentiellement 300 microns. Afin de mesurer cette granulométrie, on utilise préférentiellement un appareil de granulométrie laser, bien que toute méthode soit possible telle que le tamisage.

**[0059]** De manière alternative, l'étape de réduction de la granulométrie de la fraction lourde enrichie en cotylédons peut être réalisée en présence de solvant aqueux, préférentiellement de l'eau. Dans ce cas, la quatrième étape ci-dessous est fusionnée avec la troisième étape qui sont alors réalisées de manière concomitante.

**[0060]** La quatrième étape vise à mettre en suspension la poudre obtenue dans la troisième étape précédente dans un solvant aqueux, préférentiellement dans de l'eau. Le but est ici de réaliser une extraction sélective de certains composés, majoritairement les protéines ainsi que les sels et les sucres, en les solubilisant. Le pH de la solution est avantageusement rectifié vers un pH neutre afin de limiter au maximum la solubilisation des tanins et polyphénols. Cette rectification de pH peut être effectuée avant et/ou après suspension de la poudre dans le solvant aqueux.

**[0061]** Le solvant aqueux est préférentiellement de l'eau. Celle-ci peut néanmoins être additivée, par exemple avec des composés permettant de faciliter la solubilisation. Le pH du solvant aqueux est ajusté entre 6 et 8, préférentiellement 7. Tout réactif acide ou basique tel que la soude, la chaux, l'acide citrique ou chlorhydrique est envisageable, mais la potasse et l'acide ascorbique sont préférés. La température est ajustée entre 2°C et 30°C, préférentiellement entre 10°C et 30°C, préférentiellement entre 15°C et 25°C, encore plus préférentiellement à 20°C. Cette température est régulée tout au long de la réaction d'extraction.

**[0062]** La poudre obtenue est délayée afin d'obtenir une suspension comprise entre 5% et 25%, préférentiellement entre 5% et 15%, préférentiellement entre 7% et 13%, encore plus préférentiellement entre 9% et 11%, le plus préféré étant 10%, le pourcentage étant exprimé en poids de poudre par poids total de suspension eau/poudre. La suspension est agitée à l'aide de tout appareillage bien connu de l'Homme du métier, par exemple une cuve équipée d'un agitateur, équipé de pales, d'hélices marines, ou de tout équipement permettant une agitation efficace. Le temps d'extraction, préférentiellement sous agitation, est compris entre 5 et 25

minutes, préférentiellement entre 10 et 20 minutes, encore plus préférentiellement 15 minutes.

**[0063]** La cinquième étape vise à séparer par centrifugation la fraction soluble et la fraction solide obtenues lors de la quatrième étape. On peut retrouver le principe industriel préféré dans la demande de brevet EP1400537 qui est incorporée ici par référence. Le principe de ce procédé est de commencer en utilisant un hydrocyclone afin d'extraire une fraction enrichie en amidon, puis d'utiliser une décanteuse horizontale afin d'extraire une fraction enrichie en fibres interne. Néanmoins, il est possible d'utiliser une centrifugeuse industrielle qui va extraire une fraction enrichie en amidon et en fibres internes. Dans tous les cas, on obtient des fractions solides et une fraction liquide qui concentre la majorité des protéines.

**[0064]** La sixième étape vise à acidifier au pH isoélectrique des protéines de féverole, autour de 4,5, puis de faire subir à la solution un chauffage afin de faire coaguler les protéines dites globulines, qui seront séparées par centrifugation.

**[0065]** L'acidification est réalisée à un pH entre 4 et 5, préférentiellement 4,5. Celle-ci est réalisée préférentiellement avec de l'acide chlorhydrique à 7% massique environ, mais tous types d'acides, minéraux ou organiques, sont utilisables tels que l'acide citrique. De manière encore plus préférentielle, l'utilisation d'acide ascorbique pur ou en combinaison avec un autre acide minéral ou organique, est également possible. L'utilisation d'acide ascorbique pour acidifier permet une amélioration de la coloration finale. Tout moyen de chauffage est ensuite possible, par exemple au moyen d'une cuve agitée équipée d'une double enveloppe et/ou serpentín ou un cuiseur en ligne par injection de vapeur (« jet cooker » en anglais). La température de chauffage est avantageusement comprise entre 45°C et 75°C, préférentiellement entre 50°C et 70°C, encore plus préférentiellement entre 55°C et 65°C, le plus préféré étant 60°C. Le temps de chauffage est avantageusement compris entre 5 minutes et 25 minutes, préférentiellement entre 10 et 20 minutes, le plus préféré étant 10 minutes.

**[0066]** La composition protéique, majoritairement de la globuline, va coaguler et précipiter au sein de la solution. Elle sera séparée par toute technique de centrifugation, comme par exemple le Sédicanteur Flottwegg®. La solution

résiduelle obtenue concentre sucres, sels et albumines, elle est appelée solubles de féverole. Elle sera traitée à part, préférentiellement évaporée et/ou séchée.

**[0067]** La combinaison de la précipitation isoélectrique avec un chauffage contrôlé proposé par l'invention permet l'obtention :

- 5 - d'un floc de protéines coagulées, donnant après traitement requis le produit revendiqué dans la présente demande, et
- de solubles résiduels contenant entre autres des protéines solubles (albumines), sels et sucres

**[0068]** Dans une septième étape, la composition protéique est ensuite diluée à  
10 environ 15-20% en poids de matière sèche et neutralisée à pH compris entre 5,5 et 6,5, préférentiellement 6,5, à l'aide de tout type d'agent basique, préférentiellement de la potasse à 20% massique.

**[0069]** La composition protéique peut ensuite subir un traitement thermique, préférentiellement à une température de 135°C par injection directe de vapeur par  
15 tuyère et refroidissement par effet flash sous-vide à 65°C.

**[0070]** La composition protéique obtenue peut être utilisée directement par exemple en étant hydrolysée par une protéase ou bien texturée par une extrudeuse.

**[0071]** Dans une huitième étape, la composition protéique utile pour l'invention est séchée. Le mode préféré de séchage est l'atomisation, en particulier à l'aide d'un  
20 atomiseur à multiple effets. Les paramètres typiques sont une température d'entrée de 200°C et une température des buées à 85-90°C.

#### **[0072] Utilisation thérapeutique**

**[0073]** La composition selon la présente divulgation permet d'activer la synthèse du FGF19 dans les cellules humaines.

25 **[0074]** Le FGF19 est un gène codant pour une protéine appartenant à la famille des facteurs de croissances des fibroblastes qui régissent le métabolisme des nutriments. Chez l'homme, Le gène FGF19 (Gene ID : 9965 mis à jour le 8-07-2021) code pour un transcrit de 1821 pb (NCBI Reference Sequence: NM\_005117.3, mis à jour le 29 juin 2021) qui code pour une protéine FGF19 (NCBI Reference

Sequence : NP\_0051108.1, mis à jour le 29 juin 2021). Le FGF19, également appelé FGF15 chez les rongeurs, est un membre d'une sous-famille de facteurs de croissance des fibroblastes qui régissent le métabolisme des nutriments. Le FGF19 est exprimé et sécrété dans l'intestin grêle distal, par les cellules de l'épithélium biliaire et intestinal, où sa synthèse est régulée positivement après l'absorption postprandiale des acides biliaires.

**[0075]** Le terme « activation de la synthèse » ou « surexpression du gène » doit se comprendre au sens de l'invention comme une activation exogène (c'est à dire par le biais d'un composé, d'une molécule étrangère) de la synthèse d'ARNm ou de protéine dans les cellules d'un organisme vivant, en particulier la synthèse du FGF19 dans le cadre de cette invention.

**[0076]** La synthèse des protéines est l'ensemble des processus biochimiques permettant aux cellules de produire leurs protéines à partir de leurs gènes. Elle recouvre les étapes de transcription de l'ADN en ARN messenger, d'aminocyclation des ARN de transfert, de traduction de l'ARN messenger en chaînes polypeptidiques, de modifications post-traductionnelles de ces dernières, et enfin de repliement des protéines ainsi produites. Elle est étroitement régulée à de multiples niveaux, principalement lors de la transcription et lors de la traduction. Pour le cas de l'être humain, le gène codant pour l'expression du FGF19 est situé sur le chromosome 11 humain.

**[0077]** L'activation de la synthèse du FGF19 peut être déterminée en mesurant le niveau d'expression du gène FGF19, en particulier en mesurant soit le niveau de l'expression de l'ARNm du FGF19, soit le niveau d'expression de la protéine de FGF19 par toutes méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, l'expression du FGF19 est augmentée lorsque le niveau d'expression est au moins 1.5 ou 2, 3, 4, 5 fois plus important que dans les cellules non traitées.

**[0078]** Le terme « protéine de FGF19 » ou « polypeptide de FGF19 » doit se comprendre au sens de l'invention comme un polypeptide, c'est-à-dire une chaîne d'acides aminés, ayant une homologie avec la séquence particulière d'acide aminé naturellement sécrétée chez les organismes mammifères.

**[0079]** Selon l'invention, les termes " polypeptide FGF19 ", "FGF19" et "FGF15/19" désignent la séquence native d'une forme naturelle d'un polypeptide FGF19 tel qu'exprimé dans n'importe quel organisme mammifère. Ce terme comprend n'importe quelle isoforme d'origine naturelle, qui englobe les formes variantes telles que des formes épissées alternativement, les formes de variants alléliques, et les formes non traitées et traitées de FGF19, telles que les formes de polypeptide FGF19 comprenant un peptide signal

**[0080]** Ce terme "polypeptide FGF19" comprend également des fragments d'une forme naturelle d'un polypeptide FGF19, en particulier des fragments recombinants ayant la même activité biologique que ladite forme naturelle

**[0081]** Dans le sens de l'invention, le terme "FGF19" comprend tous les polypeptides FGF19 présentant au moins 50 % d'identité avec la séquence humaine représentée dans SEQ ID NO 1. L'expression "un polypeptide FGF19 présentant au moins 50 % d'identité avec la séquence humaine représentée dans SEQ ID NO 1" désigne un polypeptide, membre de la famille FGF19, ayant une séquence d'acides aminés présentant au moins 50 % d'identité d'acide aminé avec la séquence de référence. Ceci nécessite que, après l'alignement, 50 % des acides aminés dans la séquence candidate sont identiques aux acides aminés correspondants dans la séquence de référence

**[0082]** Par « identité de l'acide aminé », on entend que le même acide aminé est observé sur les deux séquences. L'identité ne prend pas en compte les modifications post-traduction qui peuvent se produire sur les acides aminés. L'identité selon la présente invention est déterminée à l'aide d'une analyse informatique, telle que le programme d'alignement d'ordinateur ClustalW, et les paramètres par défaut suggérés dans celui-ci. Le logiciel ClustalW est disponible à partir du site Web <http://www.clust.org/clust2/>. En utilisant ce programme avec ses réglages par défaut, la partie d'une requête et d'un "polypeptide de référence" sont alignées. Le nombre de résidus totalement conservés est compté et divisé par la longueur du polypeptide de référence. Selon la présente invention, le "polypeptide de référence" présente la séquence telle que représentée dans SEQ ID NO 1

**[0083]** Les termes "au moins 50 % d'identité" indiquent que le pourcentage d'identité entre les deux séquences, la requête et le polypeptide de référence de SEQ ID 1, est d'au moins 50,55, 60,65,70, 75,80, 85, 86,87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 % par rapport à la séquence SEQ ID NO : 1.

5 **[0084]** Par conséquent, le polypeptide FGF19 est choisi parmi le polypeptide FGF15 exprimé chez les souris, le polypeptide FGF19 exprimé chez l'homme, ou les homologues de FGF15 et FGF19 exprimés chez d'autres mammifères tels que rat, chien, chat, mouton, bétail, cheval, porc, chèvre, lapin.

**[0085]** Les membres de la famille FGF19 comprennent notamment :

- 10 - le polypeptide FGF19 humain de 216 acides aminés (y compris 24 acides aminés constituant le peptide signal) dont la séquence est représentée dans SEQ ID NO 1 ;
- le polypeptide de *mus musculus* FGF15 de 218 acides aminés (y compris 25 acides aminés constituant le peptide signal) dont la séquence est représentée dans SEQ ID NO 10.
- 15 - l'une quelconque des autres séquences telles que représentées dans SEQ ID 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9, telle que présentées dans la table 1 ci-dessous : [tableau 1] :

Numéro de séquence	Espèce mammifère	Nombre d'acides aminés	Homologie avec SEQ ID NO 1 (en %)
SEQ ID 1	<i>Homo sapiens</i>	216	100%
SEQ ID 2	<i>Sus scrofa</i>	220	75.93%
SEQ ID 3	<i>Bos taurus</i>	218	73.95%
SEQ ID 4	<i>Equus caballus</i>	94	90.43%
SEQ ID 5	<i>Ovis montanus</i>	137	73.72%
SEQ ID 6	<i>Famille Canis familiaris</i>	193	80.31%
SEQ ID 7	<i>Felis catus</i>	219	81.94%
SEQ ID 8	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	219	72.56%
SEQ ID 9	<i>Rattus norvegicus</i>	218	53.11%
SEQ ID 10	<i>Mus musculus</i>	218	52.63%

**[0086]** La présente invention consiste plus particulièrement en l'utilisation thérapeutique d'une composition de protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% afin d'activer la  
 20 de synthèse du FGF19 chez un sujet et de prévenir ou traiter les maladies susceptibles

d'être traitées par une surexpression du FGF19, notamment les maladies associées à la dérégulation du FGF19.

**[0087]** Les sujets atteints de maladies associées à la dérégulation du FGF19 présentent une dérégulation de l'expression du gène FGF19, en particulier une  
5 réduction de la synthèse de FGF19 ou une diminution de la voie de signalisation du FGF19, notamment une diminution de l'activation des facteurs de la voie de signalisation en aval de FGF19 telle que ERK, PI3K, GSK3 $\beta$ .

**[0088]** Dans un mode de réalisation particulier, la composition telle que décrite précédemment est utilisée pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie, de  
10 préférence une maladie susceptible d'être traitée par une activation de la synthèse du FGF19, notamment une maladie associée à une dérégulation de la voie de signalisation du FGF19, de préférence la sarcopénie ou une maladie métabolique telle qu'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, la malabsorption des acides biliaires primaire, l'obésité ou la stéatopathie non alcoolique (NAFLD, de son acronyme anglais « *non alcoholic fatty liver disease* ») telle que la  
15 stéatohépatite non alcoolique (NASH, de son acronyme anglophone « *non-alcoholic steatohepatitis* ») chez un sujet.

**[0089]** Le terme « sujet » ou « patient » doit se comprendre au sens de l'invention comme tout être vivant appartenant au règne animal. De manière non exhaustive,  
20 on entend donc les chiens, les chats, les vaches, les porcs. De manière préférée, par « sujet » on entend un être humain, de manière encore plus préférée un être humain ayant une maladie ou un syndrome susceptible d'être traité par l'activation de la synthèse de FGF19.

**[0090]** De manière préférée, la méthode selon l'invention est caractérisée en ce  
25 que le sujet est un être humain, en particulier une personne âgée. Par « personne âgée » on entend un être humain ayant plus de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 ans.

**[0091]** De manière préférée, le sujet est un animal, en particulier sélectionné dans la liste des chats, chiens, vaches, des moutons, des porcs, des poulets et des  
30 dindes

**[0092]** Le terme « traitement » inclut un traitement curatif aboutissant à une guérison ou un traitement allégeant, améliorant, éliminant, réduisant et/ou stabilisant les symptômes d'une maladie ou la souffrance qu'elle provoque. Le terme « prévention » correspond à un traitement prophylactique ou préventif, qui  
5 comprend aussi bien un traitement aboutissant à la prévention d'une maladie qu'un traitement réduisant et/ou retardant l'incidence d'une maladie ou le risque qu'elle survienne.

**[0093]** Dans un premier mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention vise à augmenter l'anabolisme de fibre musculaire via l'activation de la  
10 synthèse du FGF19 et à prévenir ou traiter des maladies associées à une perte musculaire, en particulier la sarcopénie. La sarcopénie est un syndrome gériatrique se caractérisant par une diminution des capacités musculaires due à l'âge et qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques.

**[0094]** La composition selon l'invention permet de préférence de prévenir ou traiter la sarcopénie et d'améliorer ou éradiquer la maladie ou les symptômes associée à la maladie, telle que la détérioration de la force musculaire et des performances  
15 physiques.

**[0095]** La consommation de protéine de légumineuse est déjà bien connue mais  
20 dans ce but il est clairement recommandé de combiner avec d'autres sources de protéines afin d'améliorer le profil des acides aminés. La stratégie préférentielle innovante découverte par la demanderesse simplifie la chose en se concentrant sur l'activité propre sur la surexpression du FGF19. Cette surexpression est maximale pour les protéines de légumineuses, préférentiellement de pois et ou de féverole,  
25 quand le degré d'hydrolyse est très précisément sélectionné. Cette approche est donc en complète opposition avec les stratégies couramment utilisées dans l'art antérieur.

**[0096]** Dans un autre mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention permet de prévenir ou traiter une maladie métabolique via l'activation de la synthèse  
30 du FGF19, en particulier la stéatohépatite non alcoolique (ou NASH).

**[0097]** La NASH est une atteinte hépatique qui résulte d'une accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes entraînant une lipotoxicité et des lésions inflammatoires des hépatocytes. La physiopathologie implique l'accumulation de graisse (stéatose), une inflammation et, de manière variable, une fibrose.

5 **[0098]** La composition selon l'invention permet de prévenir ou traiter la NASH et d'améliorer ou éradiquer la maladie ou les symptômes associée à la NASH, telle qu'une diminution de l'accumulation des lipides dans les hépatocytes et des lésions inflammatoires des hépatocytes chez le patient.

**[0099]** A ce jour, peu voire aucun traitement n'existe. Une alimentation réduite et  
10 équilibrée, de l'exercice, la consommation de café ou de vitamine E sont pour le moment les seules traitement conseillés par l' « American Liver Foundation » (<https://liverfoundation.org/for-patients/about-the-liver/diseases-of-the-liver/nonalcoholic-steatohepatitis-information-center/nash-treatment/>). Ces recommandations sont hélas bien maigres et parfois difficilement applicables  
15 (exercice physique impossible, consommation de caféine). La composition selon l'invention permet donc d'envisager via la stimulation de synthèse du FGF19 une voie afin de lutter contre la prévalence de cette NASH.

**[0100]** La présente divulgation consiste également en l'utilisation d'une composition comprenant une protéine de légumineuse telle que décrite  
20 précédemment pour la préparation d'un médicament pour l'utilisation dans le traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par l'activation de la synthèse du FGF19 telle que décrite précédemment, de préférence la sarcopénie ou la NASH.

**[0101]** Dans un autre mode de réalisation particulier, la présente divulgation est  
25 une méthode de traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par l'activation de la synthèse du FGF19 telle que décrite précédemment, de préférence la sarcopénie ou la NASH chez un sujet dans le besoin comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une composition comprenant une protéine de légumineuse telle que décrite précédemment chez un sujet.

**[0102]** Dans le contexte de la divulgation, une quantité thérapeutiquement efficace  
30 fait référence à une dose suffisante pour inverser, soulager ou inhiber la progression

du trouble ou de l'état auquel ce terme s'applique, ou inverser, soulager ou inhiber la progression d'un ou plusieurs symptômes du trouble ou de l'état auquel ce terme s'applique.

**[0103]** La dose efficace est déterminée et ajustée en fonction de facteurs tels que la composition utilisée, la voie d'administration, les caractéristiques physiques de l'individu considéré telles que le sexe, l'âge et le poids, la médication concomitante, et d'autres facteurs, que les personnes compétentes dans le domaine médical reconnaîtront.

**[0104]** Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition comprend en outre au moins un agoniste de FXR (acronyme pour le terme anglais « Farnesoid X receptor »). Les agonistes de FXR sont bien connus par l'homme du métier et peuvent être choisis à titre d'exemples non limitatifs parmi : obeticholic acid (OCA), Chenodeoxycholic acid (CDCA), 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), Alisol B 23-acetate (AB23A), Cafestol, Fexaramine, GW4064 (3-(2,6-Dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chlorostilben-4-yl)oxymethyl-5-isopropylisoxazole) et Tropicfexor, de préférence GW4064 et Chenodeoxycholic acid (CDCA).

**[0105]** La composition selon la présente divulgation peut être inclus dans une composition pharmaceutique, optionnellement en combinaison avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

**[0106]** La présente divulgation consiste ainsi en une composition pharmaceutique destinée à activer la synthèse du FGF19 comprenant des protéines de légumineuse, préférentiellement sélectionnée parmi le pois ou la féverole, dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% tel que décrit précédemment, optionnellement en combinaison avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

**[0107]** Les premiers constituants primordiaux pour la composition pharmaceutique destinée à activer la synthèse du FGF19 sont les protéines de légumineuse, préférentiellement de pois ou de féverole, dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% telles que décrites dans les paragraphes précédents. En particulier, les deux modes alternatifs préférentiels utilisent respectivement une protéine de pois dont le degré d'hydrolyse est préférentiellement compris entre 5% et 10% ou une protéine de féverole dont le degré d'hydrolyse n'est pas modifié par hydrolyse après son

extraction, préférentiellement avec un degré d'hydrolyse compris entre 0% et 10%, préférentiellement entre 0% et 5%.

**[0108]** Dans un mode préférentiel, ces protéines constituent les seules sources de protéines de la composition selon l'invention. A l'inverse des solutions bien connues dans l'art antérieur la composition n'utilise pas de combinaison avec d'autres sources protéiques par exemple des protéines de riz ou de blé. La composition dans ce mode préférentiel vise à maximiser la capacité des protéines de légumineuse afin d'activer la synthèse du FGF19. Il est possible d'ajouter des acides aminés afin d'améliorer le profil de la composition, bien que cela ne soit pas nécessaire.

10 **[0109]** Le terme « composition pharmaceutique » doit se comprendre comme toute composition destinée à soigner un sujet. Des exemples non limitatifs de telles compositions pharmaceutiques sont données dans la suite de cette présente demande.

15 **[0110]** Un "excipient pharmaceutiquement acceptable" se réfère à un véhicule qui ne produit pas de réaction indésirable, allergique ou autre réaction fâcheuse lorsqu'il est administré à un mammifère, en particulier un humain, selon le cas. Un support ou excipient pharmaceutiquement acceptable désigne une charge solide, semi-solide ou liquide non toxique, un diluant, un matériau d'encapsulation ou un auxiliaire de formulation de tout type.

20 **[0111]** De préférence, la composition pharmaceutique contient des véhicules, qui sont pharmaceutiquement acceptables pour une formulation susceptible d'être administré oralement.

La composition peut être toute composition bien connue de l'homme du métier comme par exemple (et de manière non limitative) des boissons prêtes à être consommées (RTD), des poudres à réhydrater (powder-mix), des compotes, des gels, des produits de panification, des produits laitiers, .....

**[0112]** Plus particulièrement, l'invention concerne l'application de ces formulations en boissons, par le biais de mélanges de poudres à reconstituer, pour la nutrition diététique (sport, minceur), et en boissons prêtes-à-boire pour la nutrition clinique

(voie orale ou poche entérale) et diététique, où l'on recherche une faible viscosité de la boisson et une amélioration de la solubilité de la protéine de légumineuse

**[0113]** Également, l'invention concerne l'application de ces formulations nutritionnelles en boissons lactières ou végétales, en laits fermentés de type yaourts  
5 (brassés, à la grecque, à boire) et en crèmes lactières ou végétales, desserts glacés ou sorbets.

**[0114]** Enfin, l'invention concerne l'application de ces formulations nutritionnelles en biscuits, muffins, pancakes, barres nutritionnelles (destinés à la nutrition spécialisée / minceur ou sportif), en pains ou pains sans gluten enrichis en protéines,  
10 en petites céréales obtenues par cuisson extrusion (« crisps ») hyperprotéinés, où l'on recherche plus particulièrement des solutions hyperprotéinées sans impact négatif sur le procédé de préparation ou la texture des préparations ou produits finis.

**[0115]** Au sens de l'invention, on entend par « formulations nutritionnelles en poudre », des formulations en poudre comprenant au moins, préférentiellement  
15 uniquement, une protéine de légumineuse, et en particulier de pois ou de féverole, selon l'invention, qui sont reconstituables avec un liquide aqueux, et qui conviennent pour l'administration orale à un être humain.

**[0116]** L'expression « mélange à sec » tel qu'utilisé ici, sauf indication contraire, se réfère au mélange des composants ou des ingrédients pour former une poudre  
20 nutritionnelle de base ou, à l'addition d'un composant sec, en poudre ou granulé ou d'un ingrédient à base poudre pour former une formulation nutritionnelle en poudre.

**[0117]** Tous les pourcentages, parties et rapports, tel qu'utilisé ici, se rapportent au poids de la formulation totale, sauf indication contraire.

**[0118]** Les formulations orales en poudre de la présente invention sont  
25 généralement sous la forme de compositions particulières aptes à l'écoulement ou sensiblement fluides, ou au moins des compositions particulières qui peuvent être facilement moulées et mesurées à l'aide d'une cuillère ou d'un autre dispositif similaire, dans lequel les compositions peuvent facilement être reconstitués par l'utilisateur prévu avec une solution aqueuse, typiquement de l'eau, pour former une  
30 formulation liquide pour utilisation orale ou entérale immédiate. Dans ce contexte,

l'utilisation « immédiatement » signifie généralement pendant environ 48 heures, plus typiquement pendant environ 24 heures, de préférence juste après la reconstitution.

**[0119]** Les formulations en poudre peuvent être formulées avec tous types et quantités de nutriments suffisants de manière à former un complément alimentaire, ou une formulation nutritionnelle spécialisée destinée à être utilisée chez les personnes suivant un régime alimentaire particulier destiné à la diététique du sport et de la minceur.

**[0120]** Dans des exemples de réalisations, la formulation nutritionnelle en poudre peut être formulée pour une utilisation :

- pour l'alimentation d'une personne en surcharge pondérale suivant un régime amaigrissant et souhaitant limiter la perte de poids musculaire,
- pour réparer les muscles après un effort intense, par exemple chez le sportif,
- pour assurer chez le sportif le maintien ou la construction de la masse musculaire, ou
- comme substitut de repas pour des personnes désirant perdre du poids via un effet satiétogène.

**[0121]** Les formulations en poudre peuvent avoir une densité calorique adaptée aux besoins nutritionnels de l'utilisateur final, bien que dans la plupart des cas, les poudres reconstituées comprennent d'environ 350 à environ 400 kcal / 100 ml.

**[0122]** Les formulations en poudre peuvent présenter un taux protéique adapté aux besoins nutritionnels de l'utilisateur final, bien que dans la plupart des cas, les poudres reconstituées comprennent d'environ 20 à environ 91 g de protéines / 100 g, y compris d'environ 40 à environ 65 g de protéines / 100g.

**[0123]** Ainsi, la formulation peut comprendre entre 20 et 95 % de protéines par rapport au poids totale de la formulation, par exemple entre 20-90%, 30-80%, ou 40-60%.

**[0124]** Par exemple, l'isolat de protéines de légumineuses, préférentiellement de pois ou de féverole, selon la présente invention peut représenter 40-50%, 50-60%,

60-70%, 70-80%, 80-90% ou 90-100% de la protéine totale de la formulation, ou une quelconque combinaison de ces gammes de pourcentages. 100% représentant le mode préférentiel ultime afin de maximiser l'effet de surexpression du FGF19

- [0125]** Par ailleurs, les formulations alimentaires en poudre peuvent présenter un
- 5   taux de matière grasse adapté aux besoins nutritionnels de l'utilisateur final, bien que dans la plupart des cas, les poudres reconstituées comprennent d'environ 0,5 à environ 13 g /100 g, y compris d'environ 3 à environ 7 g /100 g. Ainsi, la formulation peut comprendre entre 0 et 20 % de lipides par rapport au poids totale de la formulation, par exemple entre 0,5-15%, 1-10%, ou 3-7% (en particulier % en poids).
- 10   **[0126]** Les formulations nutritionnelles en poudre de la présente invention peuvent être emballées et scellées dans des conteneurs simples ou multi-usage, puis stockées dans des conditions ambiantes jusqu'à environ 36 mois ou plus, plus typiquement d'environ 12 à environ 24 mois.

- [0127]** Pour multi-utilisation des conteneurs, ils peuvent être ouverts et couverts
- 15   pour une utilisation répétée par l'utilisateur final, à condition que le paquet recouvert soit ensuite stocké dans des conditions ambiantes (par exemple, éviter les températures extrêmes) et les contenus utilisés dans environ un mois ou deux.

**[0128]** Les domaines d'applications des formulations nutritionnelles selon l'invention sont notamment :

- 20   -       la nutrition diététique (sport, minceur),
- la nutrition clinique (sous forme de boisson, de crème dessert ou de poche entérale),
- les produits laitiers (sous forme de yaourts, boissons lactières, crèmes lactières, desserts glacés ou sorbets).
- 25   -       les produits de biscuiterie, produits de pâtisserie, produits de panification et produits céréaliers hyperprotéinés.

**[0129]** Dans le domaine du sport, il est connu que les protéines participent à l'entretien et à la croissance du muscle. L'apport en protéines est également

important pour les athlètes qui pratiquent la musculation ou le renforcement musculaire.

**[0130]** Les boissons protéinées ou hyperprotéinées prêtes à boire permettent alors de faire bénéficier l'organisme d'un apport protéique de choix, les calories en moins.

- 5 **[0131]** Ces boissons hyperprotéinées doivent :
- être riches en protéines, pauvres en glucides et en graisses ;
  - avoir bon goût ;
  - être conçues pour aider à perdre du poids, en stimulant la perte de graisse et en aidant à la récupération musculaire ;
- 10 - être satiétogènes ;
- permettre de faire face aux fringales, sans sucres ni graisses ajoutées ;
  - présenter un contenu équilibré en acides aminés essentiels, en fibres, en vitamines et minéraux ;
  - être hypocaloriques.
- 15 **[0132]** Ces boissons prêtes-à-boire peuvent être avantageusement préparées avec les isolats de protéines de légumineuses, préférentiellement de féveroles ou de pois, conformément à l'invention. Elles peuvent être d'ailleurs utilisées comme seule source de protéines, de manière préférée car maximisant l'effet de surexpression du FGF19.
- 20 **[0133]** Par exemple, les boissons végétales alternatives au lait de vache, contiennent en moyenne de 4,5 à 11 g de protéines pour 100 ml de boisson, de préférence de l'ordre de 7 g de protéines pour 100 ml, et sont très pauvres en fibres (de l'ordre de 0,5 à 1 g pour 100 ml).
- [0134]** Ainsi, la boisson peut comprendre entre 1 et 20 % de protéines par rapport
- 25 au poids totale de la boisson, par exemple entre 3-15%, ou 6-8%.
- [0135]** Par exemple, l'isolat de protéines de pois selon la présente invention peut représenter 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% ou 90-100% de la protéine totale, ou une quelconque combinaison de ces gammes de pourcentages. De préférence,

il représente au moins 52 %. Notamment, l'apport en protéines de pois est compris entre 52 et 100 % de l'apport en protéines totales.

**[0136]** Pour les boissons prêtes à boire, l'apport en protéines de pois peut aller de 0 à 100%, de préférence de 0,01 ou 0,1 à 100 %. Par exemple, l'isolat de protéines  
5 de pois selon la présente invention peut représenter 0,1-10%, 10-20%, 20-30%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% ou 90-100% de la protéine totale, ou une quelconque combinaison de ces gammes de pourcentages.

**[0137]** Dans le domaine des boissons « minceur », i.e. destinées à être utilisées dans des régimes hypocaloriques ou destinées à la perte de poids, comme  
10 mentionné précédemment, ces boissons protéinées ou enrichies en protéines ne sont pas uniquement efficaces pour une prise rapide de muscles. Ce type de boisson est également très avantageux dans le cadre d'un régime minceur basé sur la consommation de protéines.

**[0138]** Il est connu que les boissons minceurs sont idéales pour aider à la perte  
15 de poids. Elles permettent plus particulièrement de :

- procurer un effet de satiété
- protéger les muscles et de tonifier le corps, évitant la reprise de poids.

**[0139]** Comme pour les boissons « sport », ces boissons minceurs présentent :

- un contenu équilibré en acides aminés essentiels, en fibres, en vitamines et  
20 minéraux
- un contenu réduit en sucres, en matières grasses et en calories.

**[0140]** C'est ainsi que les boissons protéinées sont en effet d'une grande efficacité pour perdre rapidement quelques kilos. Ces préparations riches en protéines réduisent ou stoppent simplement la sensation de faim chez la personne qui en  
25 consomme. En prenant par exemple une telle boisson, l'utilisateur peut réduire de manière considérable la quantité de nourriture à consommer, et permettre une perte de poids rapide (dans le cadre d'un processus de substitut de repas pour contrôle du poids, ou substitut de la ration journalière totale pour contrôle du poids).

**[0141]** En nutrition clinique, il est connu que la nutrition entérale est une solution thérapeutique de nutrition par sonde qui est utilisée lorsque le tube digestif est fonctionnel et accessible mais lorsque le patient ne peut s'alimenter normalement ou encore dans les cas de dénutrition sévère.

5 **[0142]** Cette technique permet d'apporter directement les nutriments dans le tube digestif. Elle remplace, de manière totale ou partielle, l'alimentation orale traditionnelle par des formules nutritives « complètes » apportant l'ensemble des nutriments nécessaires à l'organisme.

**[0143]** Ces formules sont généralement conditionnées dans des poches souples  
10 (en PVC) et administrées au moyen de sondes naso-gastriques ou, gastrostomies, naso-jéjunale, naso-duodénale, jéjunostomie.

**[0144]** Ces mélanges nutritionnels sont composés de protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux avec ou sans fibres.

**[0145]** On distingue plusieurs catégories : les mélanges polymériques (standards)  
15 et les mélanges semi-élémentaires (« prédigérés »), ces derniers étant indiqués dans des cas bien spécifiques (syndrome du grêle court, insuffisance pancréatique exocrine, etc.) :

\* Mélanges polymériques :

- hypocaloriques (0,5 – 0,75 kcal / ml), normo ou hyperprotéinés, avec ou sans fibres  
20 - isocaloriques (1 kcal / ml), normo ou hyperprotéinés, avec ou sans fibres

- hypercaloriques (1,25 -1,5 kcal / ml) normo ou hyperprotéinés, avec ou sans fibres

\* formules spécifiques (troubles du métabolisme glycémique, insuffisance respiratoire).

**[0146]** Les semi-élémentaires sont des mélanges iso ou hypercaloriques normo ou  
25 hyperprotéinés, à base de peptides et de triglycérides à chaînes moyennes.

**[0147]** Les isolats de protéines de pois, comme source de protéines, par leurs propriétés fonctionnelles sont particulièrement bien adaptés à cet usage.

**[0148]** Par ailleurs, ils permettent de préserver les mêmes propriétés que les protéines de lait, et ce pour un coût moindre.

[0149] L'invention sera mieux comprise avec les exemples suivants qui n'ont pour but que de mieux faire comprendre celle-ci. Ceux-ci n'ont aucune portée limitative.

## Exemples

5 [0150] Exemple 1 : Préparation d'une composition comportant une protéine de pois hydrolysée dont le degré d'hydrolyse (DH) est compris entre 5% et 10%

[0151] De la protéine de pois (commercialisée par la société demanderesse sous le nom de marque NUTRALYS® S85F) est mise en suspension à 15% p/p dans 8500 litres d'eau préchauffée à 55°C.

10 [0152] Après agitation 3h à 55°C, on ajoute 0,5 % (poids/poids) de d'endoprotéase FLAVORPRO 750 MDP (de la société BIOCATALYST) et on laisse s'établir la réaction enzymatique durant 1 h à 55°C. On inhibe ensuite la réaction par chauffage du milieu à 70°C et on maintient à cette température pendant 10 minutes minimum.

[0153] On réalise enfin un traitement UHT (barème 140°C - 10 s) et un séchage par atomisation.

15 La poudre obtenue est caractérisée par un degré hydrolyse de 7 et une matière sèche de 95%

[0154] Exemple 2 : Préparation d'une composition alimentaire comportant une protéine de féverole non hydrolysée

20 [0155] Des graines de féverole de la variété Tiffany ont d'abord été traitées à l'aide d'un moulin à pierre (Alma®). Le broyat a ensuite été traité par turboséparation à l'aide d'un système dit « zig-zag » (MZM 1-40, Hosokawa-alpine®) avec une vitesse d'air de 4.0 m.s-1 (23 m3.h-1). On obtient ainsi une fraction légère contenant les fibres externes et une fraction lourde contenant les cotylédons. La fraction lourde est ensuite traitée à l'aide d'un moulin à couteaux (SM300, Retsch®) dont la rotation  
25 est de 700 tr/min et la sortie équipée d'une grille de 6 mm. La fraction lourde est ensuite broyée à l'aide d'un broyeur à rouleaux (MLU 202, Bühler®). On obtient finalement une farine dont la taille de particules est inférieure à 300 µm.

[0156] Cette farine est mise en suspension à 10% en poids de matière sèche dans de l'eau potable à 20°C. Le pH est ajusté à 7 par ajout de potasse. On pratique une

homogénéisation pendant 15 minutes toujours à 20°C. La solution est ensuite envoyée sur un décanteur Sedicanter de la société Flottweg (Vitesse du bol : 60% (environ 3500g), Vitesse de la vis à 60% pour une  $V_r = 18.8$ , Pipette pour le surnageant (overflow) à 140 mm, Alimentation à  $1\text{m}^3/\text{h}$ ) et on récupère le  
5 surnageant liquide contenant les protéines.

**[0157]** Ce surnageant est acidifié à pH 4.5 par ajout d'acide chlorhydrique à 7% massique environ. On chauffe à 60°C par injection de vapeur dans une double enveloppe de la cuve, où l'on pratique une homogénéisation pendant 15 minutes. On utilise une seconde fois le Sedicanter de Flottweg (Vitesse du bol à 60%,  
10 (environ 3500g) Vitesse de la vis à 10% pour une  $V_r = 3.5$  jusqu'à 40% ( $V_r = 12.6$ ) Pipette pour l'overflow à 140 mm au départ jusqu'à 137 Alimentation à 700 l/h) mais cette fois ci pour récupérer le sédiment où se trouvent les protéines coagulées.

**[0158]** Le sédiment est dilué à environ 15-20% en poids de matière sèche et neutralisé à pH 6,5 par ajout de potasse à 20%. On pratique un traitement thermique  
15 à 135°C à l'aide d'une tuyère et on réalise un refroidissement par effet flash sous-vide à 65°C. Le produit est enfin atomisé (température d'entrée de 200°C et température des buées à 85-90°C)

**[0159]** Exemple 3 : Matériels et Méthodes

**[0160]** En plus des deux échantillons décrits dans les exemples 1 et 2 ci-dessus et  
20 dénommé respectivement RQ3 et RQ7, les protéines listées ci-dessous ont été utilisées à titre comparatif :

- RQ1 : protéine de lactosérum PRODIETF90 (INGREDIA)
- RQ2 : Albumine d'œuf standard
- RQ4 : Nutralys® W (isolat de protéine de blé)
- 25 - RQ5 : Nutralys® H85 (hydrolysate de protéine de pois dont le DH mesuré selon le protocole décrit dans la présente demande est égale à 22)
- RQ6 : PROATEIN® (concentrat de protéine d'avoine)
- RQ8 : Tubermine GP (isolat de protéine de pomme de terre)
- RQ9 : Solulys® 095<sup>E</sup> (corn steep)

- RQ10 : albumine de pois obtenue selon l'exemple 2 du brevet WO 2018/197822
- RQ11 : protéines totales de pois (albumines + globulines) obtenues selon les exemples 1 et 2 du brevet WO2019/068998, dont le degré d'hydrolyse n'a pas été modifié

5 **[0161]** Les échantillons sont tout d'abord hydrolysés *in vitro* afin de simuler leur digestion consécutive à leur absorption par un sujet. Le protocole utilisé est le suivant :

**[0162]** Le modèle de digestion *in vitro* utilisé simule la digestion des aliments en mimant trois différentes phases de la digestion: la phase orale, la phase gastrique  
10 et la phase intestinale. Afin de simuler la mastication et l'humidification par la salive, une phase d'hydratation est d'abord réalisée. 6g de protéines sont solubilisées, dans un tampon composé de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) à une concentration finale de 2.6 mM, pendant une heure à 37°C sous agitation. La simulation de la phase  
15 gastrique se fait avec l'ajout d'une solution tampon contenant du chlorure d'hydrogène (HCl) à 157.8 mM, et du CaCl<sub>2</sub> à 157.8 µM. Le mélange réactionnel est ajusté à un pH 2 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 4M ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) 4M. Puis 0.6g de pepsine porcine (P7000, Sigma) sont ajoutés dans le reste du mélange réactionnel afin d'entamer la digestion des  
20 protéines. Les réactifs sont placés 2 heures sous agitation à 37°C avec des ajustements de pH réguliers au cours du temps (pH = 2 ± 0.5). La digestion par la phase intestinale se poursuit avec l'ajout d'une solution contenant 210 mL de tampon phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, du CaCl<sub>2</sub> à 558 µM et du NaOH à 20.9 mM. Le pH du mélange réactionnel est ensuite ajusté à 6.8. Puis 1.2 g de pancréatine d'origine porcine (P7545, Sigma) est ajouté pour terminer l'hydrolyse  
25 des protéines en petits peptides. Le mélange est incubé 4 heures sous agitation à 37°C avec des ajustements de pH au cours du temps (pH = 6.8 ± 0.5). Les enzymes sont par la suite inactivées en plaçant le mélange 10 minutes au bain-marie à 90°C. Les digestats obtenus sont congelés puis lyophilisés. L'ensemble des protéines digérées *in vitro* ont ensuite subi un post-traitement décrit ci-après :

- 30 - Dissolution dans une solution de PBS stérile à une concentration de 100 mg/mL

- Homogénéisation pendant 1 heure à 40°C sous agitation (80 tr/min)
- Centrifugation 15 min à 5000g
- Filtration sur filtres de porosité 0,45 microns

**[0163]** Des aliquots baptisés digestats protéiques (ou DP dans la suite de cette  
5 demande) d'1 mL sont préparés et stockés à -20°C

**[0164]** On utilisera également les réactifs suivants dissous dans du DMSO Hybri-  
Max™ filtré stérile:

- FXR receptor agonist GW4064,
- chenodeoxycholic acid (CDCA),
- 10 - dexamethasone (glucocorticoid receptor agonist)

**[0165]** Pour les cultures cellulaires, on utilisera les lignées HT29 (ECACC  
91072201), HT29-MTX and Caco-2 dérivées d'un adenocarcinoma humain  
colorectal, classiquement utilisés comme lignées cellulaires représentatives  
d'entérocytes humains. Les cellules sont systématiquement cultivées dans le milieu  
15 Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) 4,5 g/L de glucose additionné de 1 % de  
pyruvate de sodium, de 1 % de pénicilline-streptomycine et de 10 % de sérum  
foetal-bovin (FBS) décomposé (Eurobio, Les Ulis, France). Pour les expériences sur  
plaques de 12 et 96 puits, les cellules HT29 ont étéensemencées à une densité de  
7,5 x 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> avec un milieu changé tous les 2 jours et les cellules ont été  
20 exposées aux différentes conditions expérimentales 2 jours après la confluence avec  
un milieu complet épuisé dans FBS. Pour les plaques 12 puits (Costar®, Cambridge,  
MA), les cellules Caco-2 et HT29-MTX ont étéensemencées dans un rapport de 1:1  
à une densité de 2,5 x 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été cultivées pendant 14  
jours en milieu complet pour permettre la différenciation. Le milieu a été changé  
25 dans les deux compartiments tous les deux jours jusqu'à ce que l'exposition au  
milieu complet soit épuisée dans le FBS. L'intégrité de la monocouche cellulaire a  
été évaluée en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) à l'aide d'un  
Millicell-ERS (Millipore Corp., Billerica, MA). L'approvisionnement en culture

cellulaire provenait de Dutscher (Issy-les-Moulineaux, France), sauf indication contraire.

**[0166]** Le protocole d'exposition de ces cultures cellulaires aux différents échantillons et agonistes est le suivant : les cellules ont été traitées pendant 6 h  
5 avec (i) soit de l'DP à 1 mg/mL (cette concentration n'a montré aucun effet toxique sur les cellules HT29) ou des agonistes des récepteurs nucléaires, et (ii) la combinaison du DP et des agonistes des récepteurs nucléaires. Les différentes conditions du véhicule comme DP ont été dissous dans du PBS et les agonistes dans du DMSO. Après l'exposition, les surnageants cellulaires ont été stockés à -80 °C  
10 pour les mesures de la sécrétion de protéines FGF19, et les monocouches cellulaires ont été maintenues à -80 °C jusqu'à l'extraction totale de l'ARN.

**[0167]** On mesure l'effet de cette exposition en quantifiant l'ARN messager du FGF19 à l'aide du protocole suivant : L'expression des gènes cibles a été évaluée par la quantification de leur niveau d'ARNm dans les cellules par RT-qPCR. Les  
15 ARN totaux ont été isolés avec la solution TRI-Reagent (Sigma Aldrich). Des ADN complémentaires de premier rang ont été synthétisés à partir de 1 µg d'ARN totaux avec le kit de réactifs TAKARA Prime Script<sup>MC</sup> RT (TAKARA Bio, Saint-Germain-en-Laye, France). Les essais qPCR ont été effectués à l'aide du kit SYBR<sup>®</sup> Premix Ex-Taq<sup>™</sup> (TAKARA Bio) sur Rotor-Gene<sup>™</sup> 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Les niveaux d'ARNm de la protéine de liaison TATA humaine (TBP) ont  
20 été utilisés pour normaliser les données.

#### **[0168]**

#### **[0169]** Exemple 4 : Evaluation de la viabilité cellulaire

**[0170]** La toxicité des DP, préalablement préchauffés pendant 10 min à 90 °C, a  
25 été évaluée sur les cellules HT29 dans des plaques de 96 puits après 6 heures d'exposition, à 1 et 2 mg/mL, afin de définir la concentration la plus élevée qui n'entraîne ni dégradation ni lyse des cellules. Dans de telles conditions, aucun DP n'a montré d'effet toxique (tel qu'évalué par la libération de la LDH) à 1 ou 2 mg/mL sauf le DP n°3 (RQ3) qui a induit l'apparition de cellules de forme ronde prédisant

le détachement cellulaire à 2 mg/mL. Il a donc été décidé de choisir la dose de 1 mg/mL pour poursuivre les tests sur l'expression FGF19.

**[0171]** Exemple 5 : Effets des échantillons sur l'expression du FGF19

**[0172]** La [fig. 1] résume les résultats obtenus. Les cellules HT29 ont été exposées  
5 aux différents DP seuls ou en combinaison avec un agoniste FXR pour déterminer leur capacité potentielle à augmenter l'expression du gène FGF19. En tant qu'agoniste FXR, GW4064 aux doses de 0,1 et 1  $\mu$ M, a augmenté l'expression du gène FGF19 de façon dose-dépendante de 2 et 6,2 fois, respectivement, par comparaison à la condition contrôle (véhicule=DMSO) L'exposition au DP seul n'a  
10 révélé aucun changement dans l'expression FGF19 par comparaison à la condition contrôle (véhicule=PBS). Cependant, le DP co-incubé avec GW4064 à 0,1  $\mu$ M a potentialisé l'expression du FGF19 induite par l'agoniste FXR, avec une augmentation de 2,5 (RQ1) à 4 fois (RQ3 et RQ7) par rapport à leur condition contrôle (PBS/DMSO) et une augmentation de 1,3 à 2 fois par rapport à la condition  
15 0,1  $\mu$ M GW4064.

**[0173]** On peut voir que RQ3 et RQ7 possède la capacité maximale de surexpression du gène codant pour le FGF19 par rapport aux autres protéines et en particulier par rapport aux protéines issues du monde animal telle que RQ1 et RQ2.

20 **[0174]** On peut également noter que :

– RQ3 est plus efficace que RQ5, qui est également un isolat de protéine de pois mais avec un degré d'hydrolyse de 22 donc supérieur à 10.

- RQ3 est également plus efficace que RQ 11 (protéine de pois totales non hydrolysées)

25 Ces résultats démontrent bien que pour l'isolat de protéine de pois selon l'invention, la sélection d'un degré d'hydrolyse compris entre 5% et 10% est donc importante afin de maximiser l'effet

**[0175]** Exemple 6 : Confirmation de l'effet

**[0176]** La capacité des digestats RQ3 et RQ7 à augmenter le niveau d'expression de l'ARNm FGF19 ainsi que la production et la sécrétion de protéines a ensuite été évalué . Les cellules HT29 ont été exposées à GW4064 à 0,1, 0,5 et 1  $\mu\text{M}$  et à un agoniste FXR naturel, l'acide chenodeoxycholique (CDCA) à 50  $\mu\text{M}$  seul ou en  
5 combinaison avec les extraits RQ3 ou RQ7. Confirmant la première série d'expériences, GW4064 de 0,1 à 1  $\mu\text{M}$  a augmenté l'expression du gène FGF19 de façon dose-dépendante de 2,3 à 6,6 fois, respectivement, par comparaison à la condition contrôle (véhicule=DMSO) [Fig. 2a]. L'exposition au CDCA à 50  $\mu\text{M}$  a montré une augmentation similaire de l'expression du gène GW4064 à 0,1  $\mu\text{M}$  (le  
10 GW4064 étant donc plus puissant que le CDCA, en accord avec les données de la littérature). Les RQ3 et RQ7 co-incubés avec le CDCA à 50  $\mu\text{M}$  ont tous les deux montré une augmentation de 5,3 fois par rapport à la condition contrôle (PBS/DMSO). Le digestat RQ3 co-incubé avec GW4064 à 0,1, 0,5 et 1  $\mu\text{M}$  a induit une augmentation de 4,5 ; 7 et 8,5 fois de l'expression du gène FGF19,  
15 respectivement. Le digestat RQ7 a induit une augmentation de 5,6 ; 7 et 7,3 fois, respectivement. Les deux digestats RQ3 et RQ7 co-incubés avec des agonistes FXR potentialisent l'effet observé avec l'agoniste seul sur l'expression de FGF19, avec un effet plus important pour les faibles doses d'agonistes.

**[0177]** Le niveau d'expression de la protéine est semblable à celui de l'expression  
20 du transcrit, bien que la co-incubation de RQ3 et RQ7 avec des agonistes FXR ait montré moins de potentialisation de l'expression de la protéine FGF19 que l'ARNm. Le digestat RQ3 co-incubé avec CDCA à 50  $\mu\text{M}$  et GW4064 à 0,1 et 1  $\mu\text{M}$  a provoqué une augmentation respective du niveau de protéines FGF19 de 3,1, 3,3 et 4,8 fois par rapport à la condition contrôle (véhicule) ([Fig. 2b], gauche). Le  
25 digestat RQ7 a quant à lui induit une augmentation de 2,5, 3 et 4,2 fois, respectivement. Comme on l'a observé au niveau de l'expression des gènes, une plus grande potentialisation de la synthèse de protéines FGF19 se produit à la dose la plus faible d'agonistes, avec presque aucune potentialisation induite par le DP à 1  $\mu\text{M}$  de GW4064 par rapport à l'agoniste seul, ce qui suggère que l'effet maximal  
30 a été atteint.

**[0178]** Les mêmes tendances ont été observées lorsque les cellules ont été incubées pendant 24 h avec les DP ([Fig. 2b], droite). RQ3 et RQ7 ont montré une potentialisation de la production de protéines FGF19, avec un effet maximal avec le GW4064 à 0,1  $\mu$ M.

5 **[0179]** Exemple 7 : Effet sur une co-culture

**[0180]** La capacité de RQ3 et RQ7 à induire l'expression de FGF19 a été évaluée dans un modèle de co-culture en insert pour se rapprocher des conditions physiologiques intestinales avec des échanges apicaux et basolatéraux. Les cellules Caco-2 permettent l'établissement de jonctions intercellulaires fournissant  
10 une barrière sélectivement perméable et les cellules HT29-MTX ont la capacité de produire du mucus au sommet de la monocouche. Ce type de co-culture des deux lignées cellulaires fournit donc un modèle constituant les deux types cellulaires les plus représentés dans un épithélium normal, des entérocytes et des cellules  
15 caliciformes. RQ3 et RQ7 ont montré une potentialisation de l'expression FGF19 lorsqu'ils ont été co-incubés avec GW4064 à 0,2  $\mu$ M [Fig. 3], bien que cet effet soit moins puissant que celui observé précédemment dans des expériences sur plaques contenant uniquement des cellules HT29.

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; ROQUETTE FRERES

&lt;120&gt; METHODE D'ACTIVATION DE LA SYNTHESE DU FGF19

&lt;130&gt; B21101298

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Arg Ser Gly Cys Val Val Val His Val Trp Ile Leu Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Trp Leu Ala Val Ala Gly Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro  
 20 25 30

His Val His Tyr Gly Trp Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr  
 35 40 45

Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala  
 50 55 60

Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu  
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His  
 85 90 95

Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu  
 100 105 110

Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro  
 115 120 125

Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser  
 130 135 140

Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu



Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Trp Ser Lys Lys His His  
 130 135 140

Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Arg Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Gly  
 145 150 155 160

Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Ser Thr Leu  
 165 170 175

Pro Ala Glu Pro Glu Asp Leu Gln Asp Pro Phe Lys Ser Asp Leu Phe  
 180 185 190

Ser Leu Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Arg Ile Ala Ala  
 195 200 205

Lys Leu Gly Ala Val Lys Ser Pro Ser Phe Tyr Lys  
 210 215 220

<210> 3  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<400> 3

Met Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Ala Val Ala Arg Ala Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Trp Leu Ala Ala Ala Gly Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp  
 20 25 30

Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp Gly Glu Ser Val Arg Leu Arg  
 35 40 45

His Leu Tyr Thr Ala Gly Pro Gln Gly Leu Tyr Ser Cys Phe Leu Arg  
 50 55 60

Ile His Ser Asp Gly Ala Val Asp Cys Ala Gln Val Gln Ser Ala His  
 65 70 75 80

Ser Leu Met Glu Ile Arg Ala Val Ala Leu Ser Thr Val Ala Ile Lys  
 85 90 95

Gly Glu Arg Ser Val Leu Tyr Leu Cys Met Asp Ala Asp Gly Lys Met  
 100 105 110

Gln Gly Leu Thr Gln Tyr Ser Ala Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu  
 115 120 125

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Trp Ser Arg Lys His His Leu  
 130 135 140

Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Arg Gln Arg Gln Leu Phe Lys Ser Arg  
 145 150 155 160

Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Ser Thr Ile Pro  
 165 170 175

Ala Glu Pro Glu Asp Leu Gln Glu Pro Leu Lys Pro Asp Phe Phe Leu  
 180 185 190

Pro Leu Lys Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Ala Thr Lys Leu  
 195 200 205

Gly Ser Val Lys Ser Pro Ser Phe Tyr Asn  
 210 215

<210> 4  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> Equus Caballus

<400> 4

Ala Ala Gly Arg Pro Leu Ala Leu Ser Asp Ala Gly Pro His Val His  
 1 5 10 15

Tyr Gly Trp Gly Glu Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ala Gly  
 20 25 30

Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Ala  
 35 40 45

Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Val Glu Ile Arg  
 50 55 60

Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg  
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Arg Met Gln Gly Leu Val  
85 90

<210> 5

<211> 137

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 5

Leu Met Glu Ile Arg Ala Val Ala Leu Ser Thr Val Ala Ile Lys Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ser Val Leu Phe Leu Cys Met Asp Ala Asp Gly Lys Met Gln  
20 25 30

Gly Leu Thr Gln Tyr Ser Ala Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile  
35 40 45

Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Trp Ser Arg Lys His His Leu Pro  
50 55 60

Val Ser Leu Ser Ser Ser Arg Gln Arg Gln Leu Phe Lys Ser Arg Gly  
65 70 75 80

Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Ser Thr Ile Pro Ala  
85 90 95

Glu Pro Glu Asp Leu Gln Glu Pro Leu Lys Pro Asp Phe Phe Leu Pro  
100 105 110

Leu Lys Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Ala Thr Lys Leu Gly  
115 120 125

Ser Val Lys Ser Pro Ser Phe Tyr Thr  
130 135

<210> 6

<211> 193

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 6

Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ala Gly Pro His Gly Leu  
 20 25 30

Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Gly Val Asp Cys Ala  
 35 40 45

Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Met Glu Met Arg Ala Val Ala Leu  
 50 55 60

Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Gly Arg Tyr Leu Cys Met  
 65 70 75 80

Gly Ala Asp Gly Arg Met Gln Gly Leu Pro Gln Tyr Ser Ala Gly Asp  
 85 90 95

Cys Thr Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Trp  
 100 105 110

Ser Lys Lys His His Leu Pro Ile Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg  
 115 120 125

Gln Leu Tyr Lys Gly Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro  
 130 135 140

Ile Leu Pro Gly Ser Pro Thr Glu Pro Arg Asp Leu Glu Asp His Val  
 145 150 155 160

Glu Ser Asp Gly Phe Ser Ala Ser Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro  
 165 170 175

Phe Gly Ile Ala Thr Lys Ile Gly Leu Val Lys Ser Pro Ser Phe Gln  
 180 185 190

Lys

<210> 7

<211> 219

<212> PRT  
 <213> Felis catus

<400> 7

Met Arg Ser Ala Pro Ser Gln Cys Ala Val Thr Arg Ala Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Trp Leu Ala Ala Ala Gly Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp  
 20 25 30

Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp Gly Glu Pro Ile Arg Leu Arg  
 35 40 45

His Leu Tyr Thr Ala Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg  
 50 55 60

Ile Arg Ala Asp Gly Gly Val Asp Cys Ala Arg Ser Gln Ser Ala His  
 65 70 75 80

Ser Leu Val Glu Ile Arg Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys  
 85 90 95

Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Arg Met  
 100 105 110

Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Ala Gly Asp Cys Ala Phe Gln Glu Glu  
 115 120 125

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu  
 130 135 140

Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Ile Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Gly Arg  
 145 150 155 160

Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Gly Ser Pro  
 165 170 175

Ala Glu Pro Arg Asp Leu Gln Asp His Val Glu Ser Glu Arg Phe Ser  
 180 185 190

Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Ile Ala Thr Lys  
 195 200 205

Met Gly Leu Val Lys Ser Pro Ser Phe Gln Lys  
 210 215

<210> 8  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus  
 <400> 8

Met Arg Arg Ala Pro Ser Gly Gly Ala Ala Ala Arg Ala Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Trp Leu Ala Ala Ala Ala Arg Pro Leu Ala Leu Ser Asp  
 20 25 30

Ala Gly Pro His Leu His Tyr Gly Trp Gly Glu Pro Val Arg Leu Arg  
 35 40 45

His Leu Tyr Ala Thr Ser Ala His Gly Val Ser His Cys Phe Leu Arg  
 50 55 60

Ile Arg Ala Asp Gly Ala Val Asp Cys Glu Arg Ser Gln Ser Ala His  
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Glu Ile Arg Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Phe Lys  
 85 90 95

Gly Val His Ser Ser Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Arg Met  
 100 105 110

Arg Gly Gln Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Gln Glu Glu  
 115 120 125

Ile Ser Ser Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Thr Thr His His Leu Pro  
 130 135 140

Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg His Leu Tyr Lys Thr Arg Gly  
 145 150 155 160

Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Val Leu Pro Leu Ala Ser Glu  
 165 170 175

Glu Thr Ala Ala Leu Gly Asp His Pro Glu Ala Asp Leu Phe Ser Pro  
 180 185 190

Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Met Ala Thr Lys Leu  
 195 200 205

Gly Pro Val Lys Ser Pro Ser Phe Gln Lys  
 210 215

<210> 9  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 9

Met Ala Arg Lys Trp Ser Gly Arg Ile Val Ala Arg Ala Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Leu Trp Leu Ala Val Ser Gly Arg Pro Leu Val Gln Gln Ser  
 20 25 30

Gln Ser Val Ser Asp Glu Gly Pro Leu Phe Leu Tyr Gly Trp Gly Lys  
 35 40 45

Ile Thr Arg Leu Gln Tyr Leu Tyr Ser Ala Gly Pro Tyr Val Ser Asn  
 50 55 60

Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ser Asp Gly Ser Val Asp Cys Glu Glu Asp  
 65 70 75 80

Gln Asn Glu Arg Asn Leu Leu Glu Phe Arg Ala Val Ala Leu Lys Thr  
 85 90 95

Ile Ala Ile Lys Asp Val Ser Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Ser Ala  
 100 105 110

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

Phe Arg Glu Glu Met Asp Cys Leu Gly Tyr Asn Gln Tyr Arg Ser Met  
 130 135 140

Lys His His Leu His Ile Ile Phe Ile Lys Ala Lys Pro Arg Glu Gln



Phe Arg Glu Glu Met Asp Cys Leu Gly Tyr Asn Gln Tyr Arg Ser Met  
130 135 140

Lys His His Leu His Ile Ile Phe Ile Gln Ala Lys Pro Arg Glu Gln  
145 150 155 160

Leu Gln Asp Gln Lys Pro Ser Asn Phe Ile Pro Val Phe His Arg Ser  
165 170 175

Phe Phe Glu Thr Gly Asp Gln Leu Arg Ser Lys Met Phe Ser Leu Pro  
180 185 190

Leu Glu Ser Asp Ser Met Asp Pro Phe Arg Met Val Glu Asp Val Asp  
195 200 205

His Leu Val Lys Ser Pro Ser Phe Gln Lys  
210 215

## Revendications

**[Revendication 1]** Composition de protéines de légumineuse dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10%, contenant de préférence plus de 90% en poids de globulines par rapport au poids total des protéines, pour une utilisation dans la  
5 prévention et/ou le traitement d'une maladie susceptible d'être traitée par une activation de la synthèse du FGF19 chez un sujet, caractérisée en ce que ladite maladie est la sarcopénie ou la stéatohépatite non alcoolique.

**[Revendication 2]** Composition pour l'utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que lesdites protéines de légumineuse sont la seule source  
10 protéique au sein de la composition.

**[Revendication 3]** Composition pour l'utilisation selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que les protéines de légumineuse sont des protéines de pois dont le degré d'hydrolyse est préférentiellement compris entre 6% et 8%.

**[Revendication 4]** Composition pour l'utilisation selon la revendication 1 ou 2  
15 caractérisée en ce que les protéines de légumineuse sont des protéines de féverole dont le degré d'hydrolyse est compris entre 0% et 5%.

**[Revendication 5]** Composition pour l'utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, de préférence un être humain, préférentiellement une personne ayant plus de 40 ans.

**[Revendication 6]** Composition pour l'utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comprenant en outre un agoniste de FXR choisis parmi :  
20 obeticholic acid (OCA), Chenodeoxycholic acid (CDCA), 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), Alisol B 23-acetate (AB23A), Cafestol, Fexaramine, GW4064 (3-(2,6-Dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chlorostilben-4-yl)oxymethyl-5-isopropylisoxazole) et Tropifexor, de préférence GW4064 et Chenodeoxycholic acid (CDCA).  
25

**[Revendication 7]** Composition pharmaceutique apte à surexprimer la synthèse du FGF19 comportant des protéines de légumineuse dont le degré d'hydrolyse est inférieur à 10% et optionnellement un excipient pharmaceutique acceptable, de

préférence caractérisée en ce que lesdites protéines de légumineuse sont la seule source protéique au sein de ladite composition.

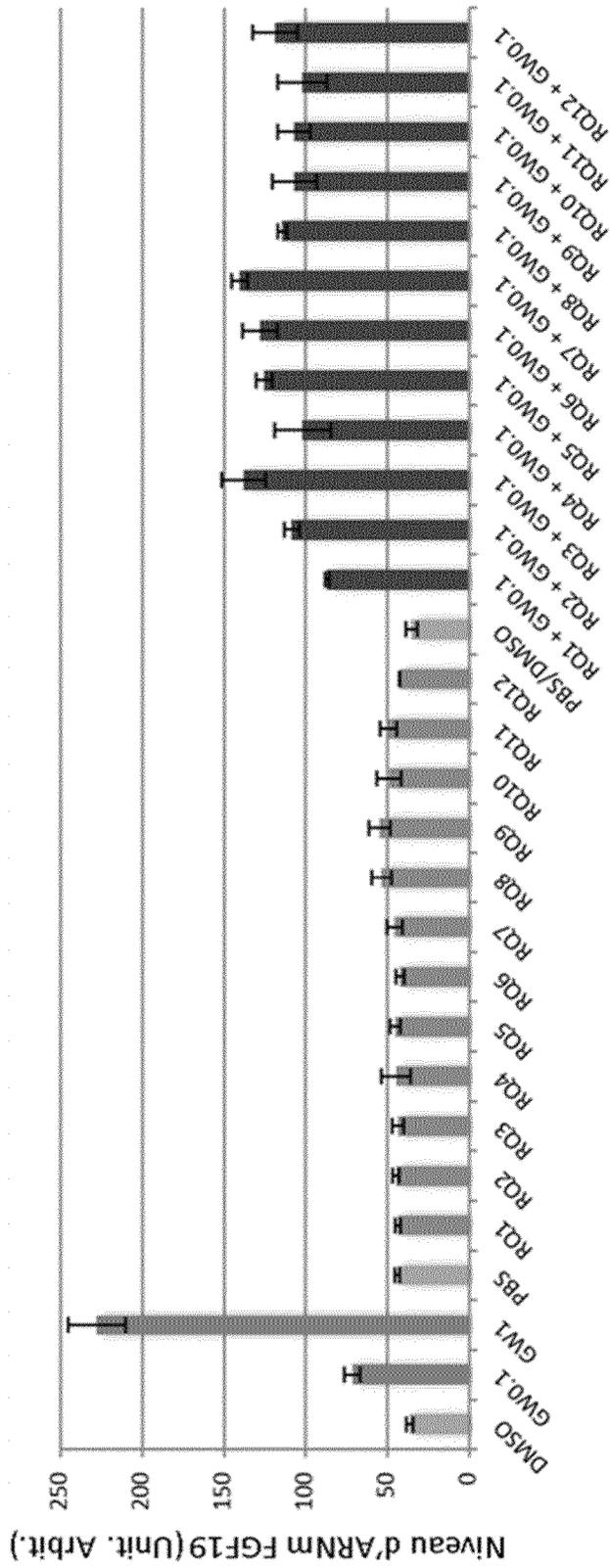
**[Revendication 8]** Composition pharmaceutique selon la revendication 7 caractérisée en ce que les protéines de légumineuse sont :

- 5 - des protéines de pois dont le degré d'hydrolyse est préférentiellement compris entre 6% et 8%, ou
- des protéines de féverole dont le degré d'hydrolyse est compris entre 0% et 5%.

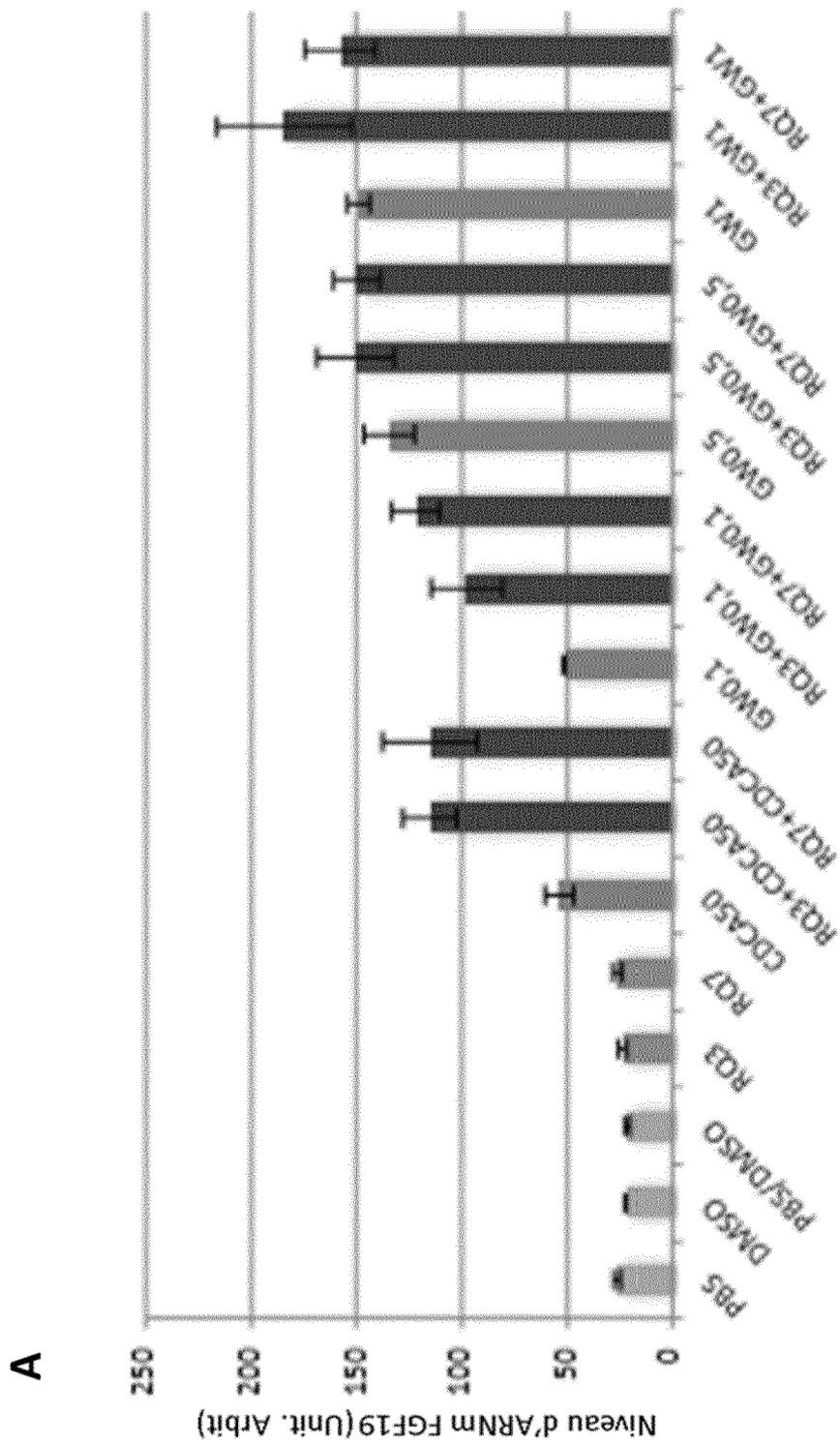
**[Revendication 9]** Composition pharmaceutique selon la revendication 7 ou 8  
10 comprenant en outre un agoniste de FXR choisis parmi : obeticholic acid (OCA), Chenodeoxycholic acid (CDCA), 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), Alisol B 23-acetate (AB23A), Cafestol, Fexaramine, GW4064 (3-(2,6-Dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chlorostilben-4-yl)oxymethyl-5-isopropylisoxazole) et Tropicexor, de préférence GW4064 et Chenodeoxycholic acid (CDCA).

1/4

[Fig. 1]



[Fig. 2a]





4/4

[Fig. 3]

