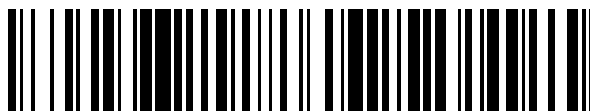


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 644**

51 Int. Cl.:

A23L 1/305 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2007** **E 07786738 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 2031986**

54 Título: **Inducción de tolerancia a las proteínas de huevo**

30 Prioridad:

15.06.2006 EP 06115533

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

20.05.2013

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:

**FRITSCHÉ, RODOLPHE y
SCHALLER, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 403 644 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inducción de tolerancia a las proteínas de huevo

5 Ámbito de la invención

Esta invención se refiere al uso de proteínas de huevos hidrolizados para inducir la tolerancia oral a las proteínas de huevos intactos en mamíferos, que probablemente son alérgicos a los huevos.

10 Antecedentes de la invención

Las alergias alimentarias, entre las cuales la más frecuente es la alergia a la leche de las vacas, están causadas en la mayoría de casos por una reacción a las proteínas del alimento. En los primeros años de vida, el sistema inmune está todavía en desarrollo y puede que no sea capaz de reconocer y tolerar algunas proteínas de los alimentos. El resultado es que el bebé humano o el animal lechón o joven trata la proteína alimenticia como sustancia ajena y desarrolla una respuesta alérgica contra ella. Las alergias alimenticias pueden afectar no solo a los humanos, sino también a otros animales, por ejemplo perros y gatos.

Las células de linfocitos T ayudadores (helper T) desempeñan un papel esencial en la inmunidad adaptativa. Las células Th1 son vitales para respuestas inmunes mediadas por las células y las células Th2 facilitan la inmunidad humoral. Las respuestas de las células Th1 y Th2 son contrarreguladoras, es decir, las citoquinas producidas por las células Th1 inhiben la función de las Th2 y viceversa. Se ha demostrado que la respuesta inmune oblicua (sesgada) de las Th2 es crucial para el mantenimiento del éxito de un embarazo y además prevalece durante el parto y los primeros meses de vida. La exposición postnatal a los antígenos microbianos provoca preferentemente respuestas de las Th1, lo cual se ha sugerido que contrarresta la producción de citoquinas polarizadas en las células Th2 de los recién nacidos. En el caso de una exposición microbiana inicial (temprana) insuficiente, la producción de las citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) se sigue propagando, lo cual conduce a la producción de la IgE y, por consiguiente, a las enfermedades alérgicas. Sin embargo, este paradigma de la IgE se ha comprobado rápidamente que es insuficiente para explicar toda la inmunopatología de las enfermedades atópicas y recientemente se ha lanzado la hipótesis de que más que una mayor activación de las Th2, los estados iniciales de las enfermedades atópicas podrían ser consecuencia de una activación deficiente de las células reguladoras T (Treg). Las células Treg son poblaciones pequeñas de células T, capaces de inducir la tolerancia inmune. Se han descrito varios subgrupos solapados de células Treg (Th3, Tr1, CD4+, CD25+) que se expresan en citoquinas supresoras (IL-10, TGF-β).

El fenómeno de la tolerancia oral es la capacidad, por la que la administración de antígenos por vía oral puede impedir (prevenir) las posteriores respuestas inmunes sistémicas al mismo antígeno administrado en forma inmunogénica. Si el mecanismo de la tolerancia oral no está suficientemente desarrollado, o si hay un fallo (interrupción) en el estado fisiológico de tolerancia a ciertos antígenos, esto puede traducirse en el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad. El mecanismo puede explicarse del modo siguiente: después de un primer contacto con el alérgeno se producen los anticuerpos IgE y estos migran a la superficie de los mastocitos y basófilos, donde se unen a receptores específicos. Después de un segundo contacto con el alérgeno, las IgE de superficie se entrecruzan con mastocitos o basófilos, lo cual conduce a la activación de las células y la liberación de mediadores químicos, incluida la histamina. Este fenómeno conduce a efectos patológicos, por ejemplo una vasodilatación local o sistémica.

Normalmente, la hipersensibilidad alimentaria aparece inmediatamente después de que el bebé humano o el animal lechón o joven prueba un nuevo alimento por primera vez. Las primeras proteínas alimenticias encontradas por lo general en los bebés humanos son por lo menos proteínas de leche de vacas y, tal como se ha mencionado antes, la alergia a la leche de las vacas es la alergia alimentaria más frecuente. Se acepta en general que los bebés humanos que padecen alergia consolidada a la leche de las vacas corren un mayor riesgo de desarrollar alergias a otras proteínas alimenticias, por ejemplo proteínas de huevos y de cereales, pero incluso aquellos bebés humanos que han desarrollado con éxito su tolerancia oral a las proteínas de la leche de las vacas pueden desarrollar con posterioridad alergias a otras proteínas alimenticias, por ejemplo proteínas de huevos y de cereales, que se introducen en su dieta en el momento de destete.

Desde el punto de vista dietético hay dos métodos para tratar la alergia consolidada: evitar por completo los alimentos que contienen el alérgeno, o tratar los alimentos para reducir su potencial alérgico, por ejemplo con una amplia hidrólisis. Con esta última finalidad se fabrican fórmulas infantiles que contienen proteínas de leche vacuna ampliamente hidrolizada (péptidos formados como máximo por cinco aminoácidos).

Sin embargo sigue habiendo demanda de productos que permitan reducir el riesgo de desarrollar la alergia y faciliten el desarrollo de tolerancia a las proteínas intactas, en especial en aquellos niños, de los que se cree que corren el mismo riesgo (es decir, niños que tienen por lo menos un pariente próximo que sufre una alergia). Por ejemplo, se ha propuesto administrar proteínas de leche de vaca parcialmente hidrolizada para inducir la tolerancia oral a proteínas de leche de vaca en los niños. Utilizando modelos animales, Fritsche y col. (J. Allergy Clin. Immunol., vol. 100, nº 2, páginas 266-273) han demostrado que los hidrolizados enzimáticos de proteínas de leche de vaca con un

grado de hidrólisis del 18% son capaces de inducir la tolerancia oral a las proteínas de leche de vaca intacta, mientras que los hidrolizados con un grado de hidrólisis del 28% no lo son. Los resultados de estos ensayos demuestran que la alimentación preventiva de ratas con dicha fórmula de leche de vaca moderadamente hidrolizada, cuyo potencial alergénico se ha reducido más de 100 veces con respecto a la fórmula estándar, suprime la liberación de la IgE específica y del mediador por parte de los mastocitos intestinales, ambas cosas son parámetros de reacción inmediata de tipo alérgico. Este trabajo demuestra que en el caso de las proteínas de leche de vaca es posible definir un grado de hidrólisis enzimática, en el que se mantiene la capacidad de los péptidos para inducir la tolerancia oral reduciendo al mismo tiempo sustancialmente su potencial alergénico.

Se han propuesto varias estrategias más para mejorar la inducción de la tolerancia oral a las proteínas de leche de vaca, incluida la administración de probióticos que se propone en WO 2003/099037 o la administración de un compuesto capaz de aumentar la actividad COX-2, que se propone en WO 02/051437. Sin embargo, se ha prestado relativamente poca atención a la inducción de la tolerancia a otras proteínas alimentarias, que suelen provocar reacciones alérgicas, por ejemplo las proteínas de huevo. Efectivamente, esta puede ser una necesidad incluso mayor, dado que la alergia a las proteínas de leche de vaca normalmente desaparece de modo espontáneo en una edad comprendida entre los dos y los cinco años, mientras que la alergia a las proteínas de huevo por lo general desaparece más lentamente e incluso puede persistir a lo largo de toda la vida. Es, pues, objeto de la presente invención proporcionar un método para inducir la tolerancia oral a las proteínas de huevo.

Resumen de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de proteínas de huevos hidrolizados enzimáticamente con un grado de hidrólisis entre el 15 y el 28% para la fabricación de una composición destinada a la inducción de la tolerancia oral a las proteínas de huevo en un mamífero.

La invención se refiere a un método para inducir la tolerancia oral a las proteínas de huevo proporcionando a un mamífero que lo necesite una composición que contiene una cantidad terapéuticamente suficiente de proteínas de huevos hidrolizados con un grado de hidrólisis entre el 15 y el 28%.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se representa la antigenicidad residual específica de OVA de los hidrolizados de huevo
En la figura 2 se representa la alergenicidad reducida de un ensayo funcional de activación de mastocitos
En la figura 3 se representa la capacidad de diferentes hidrolizados de proteínas de huevo para suprimir la respuesta de la proteína IgE específica anti-huevo
En la figura 4 se representa la capacidad de diferentes hidrolizados de huevo para regular en sentido decreciente la activación de los mastocitos intestinales
En la figura 5 se representa que las proteínas de huevos hidrolizadas ampliamente son incapaces de suprimir una respuesta de proteína IgE específica anti-huevo o de regular en sentido decreciente la activación de los mastocitos intestinales.

Descripción detallada de la invención

En esta descripción, los términos empleados tienen los significados siguientes:

“grado de hidrólisis” o “DH” de una proteína significa la cantidad de nitrógeno de los grupos NH_2 libres dividida por la cantidad total de nitrógeno (grupos NH y NH_2), expresada como porcentaje

“tolerancia oral” significa un estado activo de la capacidad de hiporrespuesta inmunológica a los antígenos suministrados por vía oral.

Todas las referencias a los porcentajes son porcentajes en peso, a menos que se indique otra cosa.

Con preferencia, el grado de hidrólisis se sitúa entre el 18 y el 25%, con mayor preferencia entre el 23 y el 25%.

El éxito en la inducción de la tolerancia oral a las proteínas de huevos intactos empleando proteínas de huevos hidrolizados requiere encontrar un equilibrio entre la antigenicidad residual de las proteínas hidrolizadas y su capacidad para inducir la tolerancia oral. En general, la antigenicidad residual de las proteínas hidrolizadas debería ser por lo menos 100 veces menor que la de las proteínas intactas.

Se ha encontrado que las proteínas de huevos hidrolizados, que tienen un grado de hidrólisis entre el 20 y 28%, tienen un potencial alergénico reducido por lo menos en un factor de 100 comparadas con las proteínas de huevos intactos cuando se determina por la técnica descrita por Fritsche y col. (Int. Arch. Aller. and Appl. Imm. 93, 289-293, 1990).

Las proteínas de huevo pueden hidrolizarse enzimáticamente por cualquier proceso adecuado, ya conocido de la

técnica. Un ejemplo de proceso adecuado de hidrólisis es la hidrólisis enzimática en dos pasos del huevo entero líquido pasteurizado. Se calienta el huevo líquido a una temperatura comprendida entre 60 y 65°C durante unos 10 minutos, después se enfría a 55°C. Se añade una proteasa, por ejemplo la subtilisina, que es una endoproteasa de serina bacteriana (suministrada por ejemplo con el nombre comercial de Alcalase®) y se mantiene la mezcla en torno a 55°C durante por lo menos dos horas para efectuar una hidrólisis parcial. Después se eleva la temperatura de la mezcla a 70 - 75°C y se mantiene durante unos 10 minutos. Se enfría de nuevo la mezcla a 55°C y se añade más cantidad de enzima. Se mantiene la mezcla aprox. a 55°C durante por lo menos dos horas más para lograr el grado de hidrólisis requerido. Después se eleva la temperatura entre 85 y 95°C y se mantiene durante un período de hasta 30 minutos para inactivar las enzimas y terminar la hidrólisis. El huevo hidrolizado líquido resultante puede utilizarse en este estado o, si se prefiere, puede secarse por atomización para obtener un producto pulverulento. Una composición apropiada para utilizar en la presente invención puede ser cualquier producto alimentario, al que se incorpora de modo convencional el huevo entero, pero reemplazando el huevo entero por el huevo hidrolizado, en el que las proteínas de huevo tienen un grado de hidrólisis entre el 20 y el 28%. El polvo de huevo hidrolizado producido del modo recién descrito puede utilizarse por ejemplo en lugar del polvo de huevo entero en recetas del tipo natillas (custards) al horno, empanadillas (quiches), crema con superficie caramelizada (creme caramel). Como alternativa, el polvo de huevo hidrolizado puede reconstituirse con agua y utilizarse para preparar platos, por ejemplo tortillas francesas y huevos revueltos. El polvo de huevo hidrolizado es un ingrediente especialmente indicado para alimentos de bebés y niños pequeños, en especial para alimentos destinados al uso en las primeras etapas después del destete. Además, el polvo de huevo hidrolizado puede utilizarse en lugar del polvo de huevo entero que se emplea convencionalmente para preparar los productos de este tipo.

Tal como se ha mencionado previamente, las alergias a proteínas alimentarias no se limitan a los humanos y el método de la presente invención puede aplicarse también para inducir la tolerancia oral a las proteínas de huevo en otros mamíferos, en particular en los animales de compañía, como son los perros y los gatos. Las proteínas de huevos hidrolizados con un grado de hidrólisis entre el 15 y el 28% pueden utilizarse, pues, para reemplazar al huevo entero en los piensos destinados a animales de compañía, en especial los piensos destinados a perritos y gatitos, por ejemplo.

La invención se describe a continuación con referencia a los ejemplos que siguen.

Preparación de hidrolizados de huevo

El material de partida es huevo entero líquido pasteurizado, FT/OVO/0105 R, ABCD SA, Avicole Bretonne Cecab Distribution (Ploërmel, Francia).

Ejemplo 1

Se calientan a 65°C durante 10 min 30 kg de huevo entero líquido con agitación a 250 rpm. Después de enfriar a 55°C se añade un 2% de enzimas Protamex® (lote PW2A 1006, NOVOZYMES A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y se mantiene la mezcla a 55°C durante 2 horas. Después de este primer paso de hidrólisis se añade un 1 % de enzimas Flavourzyme® 1000 L (lote 400904, NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y se calienta la mezcla a 75°C durante 10 min. Se enfría la mezcla a 55°C, se añade otro 1 % de enzimas Flavourzyme y se mantiene la mezcla a 55°C durante 2 horas. Después de este segundo paso de hidrólisis se calienta la mezcla a 90°C durante 30 min y se seca por atomización, obteniéndose un polvo de huevo hidrolizado, que se acondiciona en una bolsa de aluminio.

Ejemplo 2

Se calientan a 65°C durante 10 min agitando a 250 rpm 35 kg de huevo entero líquido. Se enfrían a 55°C, se les añade un 5% de enzimas Protamex® (lote PW2A 1006, NOVOZYMES A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y se mantiene la mezcla a 55°C durante 2 horas. Después de este primer paso de hidrólisis se añade un 1 % de enzimas Flavourzyme® 1000 L (lote 400904, NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y se calienta la mezcla a 75°C durante 10 min. Se enfría la mezcla a 55°C, se añade otro 4 % de enzimas Flavourzyme y se mantiene la mezcla a 55°C durante 2 horas. Después de este segundo paso de hidrólisis se calienta la mezcla a 90°C durante 30 min y se seca por atomización, obteniéndose un polvo de huevo hidrolizado, que se acondiciona en una bolsa de aluminio.

Ejemplo 3

Se calientan a 65°C durante 10 min agitando a 250 rpm 30 kg de huevo entero líquido. Se enfrían a 55°C, se les añade un 10% de enzimas Alcalase® 2.4L (lote 500357, NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y se mantiene la mezcla a 55°C durante 2 horas. Después de este primer paso de hidrólisis, se calienta la mezcla a 75°C durante 10 min. Se enfría la mezcla a 55°C, se añade otro 10 % de enzimas Alcalase y se mantiene la mezcla a 55°C durante 2 horas. Después de este segundo paso de hidrólisis se calienta la mezcla a 90°C durante 30 min y se seca por atomización, obteniéndose un polvo de huevo hidrolizado, que se acondiciona en una bolsa de aluminio.

Productos que contienen huevo entero hidrolizado

Ejemplo 4

5 Un ejemplo de ingredientes de un pudín dulce de huevo que contiene huevo hidrolizado es el siguiente:

	Ingrediente	%
	leche entera (3,5% de grasas)	62,0
	agua	24,3
10	azúcar	5,5
	polvo de huevo hipoalérgico	2,5
	almidón de maíz	3,0
	almidón de tapioca	2,0
	saborizante de vainilla	0,7

15 El pudín puede fabricarse por cualquier método adecuado ya conocido de la técnica.

Ejemplo 5

20 Un ejemplo de ingredientes de pudín sabroso (savoury) de huevo que contiene huevo hidrolizado es el siguiente:

	Ingrediente	%
	leche entera (3,5% de grasas)	62,0
	agua	21,5
25	cubos de zanahoria congelados	10,0
	polvo de huevo hipoalérgico	1,5
	almidón de maíz	3,0
	almidón de tapioca	2,0

30 El pudín puede fabricarse por cualquier método adecuado ya conocido de la técnica.

Ejemplo 6

35 Un ejemplo de ingredientes de un producto de pasta al huevo que contiene huevo hidrolizado es el siguiente:

	Ingrediente	%
	sémola de trigo duro	70,6
	agua	21,6
	polvo de huevo hipoalérgico	5,9
40	aceite de girasol	1,9

La pasta puede fabricarse por cualquier método adecuado ya conocido de la técnica.

Antigenicidad residual de hidrolizados de huevo

45 La antigenicidad residual de la proteína ovalbúmina (OVA) en los hidrolizados de los ejemplos 1, 2 y 3 se determina en un ensayo de inhibición ELISA con un antisuero policlonal de conejo anti-proteína OVA. Se depositan en los hoyos de las placas de microvaloración 100 µl de OVA en 50 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato y se incuban a 4°C durante 24 horas. Se lavan las placas 4 veces en un tampón PBS-Tween y se bloquean los sitios reactivos libres añadiendo 200 µl/hoyo de gelatina de pescado (al 0,5 % en PBS-Tween). Se incuban las placas a temperatura ambiente (t.amb. = RT) durante 1 hora y se lavan de nuevo, 4 veces, con PBS-Tween.

50 En tubos separados se incuban 1 parte de una preparación estándar de OVA o una muestra a ensayar durante 1 hora a t.amb. con 1 parte de anticuerpo de conejo anti-proteína OVA (diluido 1:20.000). Después de la incubación se añaden 100 µl de esta mezcla de inhibición a los hoyos de microvaloración anteriores, recubiertos y bloqueados, y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavan las placas 4 veces con PBS-Tween. Se añade un conjugado marcado con peroxidasa de cabra anti-conejo (0,1 ml de una dilución 1:2000), se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavan 4 veces con PBS-Tween. Se añade el sustrato cromogénico (0,1 ml de o-fenilenodiamina). Después de 15 minutos de incubación, se lee la densidad óptica a 492 nm en un lector de placas ELISA.

Los resultados se representan en la figura 1, de ellos se desprende que la antigenicidad específica de la OVA de los hidrolizados de los ejemplos de 1 a 3 se ha reducido en un factor superior a 10.000 si se compara con la proteína de huevo intacto.

Alergenicidad residual de hidrolizados de huevo

Se realiza un ensayo funcional "in vitro" de liberación de serotonina tritiada por parte de mastocitos de rata sensibilizados para determinar la alergenidad dependiente de la IgE de una molécula antigénica (OVA) del modo descrito previamente (Fritsche y col. J. Allergy Clin. Immunol., vol. 100, nº 2, páginas 266-273). Resumiendo, los mastocitos se obtienen de ratas Sprague-Dawley normales por lavados peritoneales con un medio del tipo Dulbecco's modified Eagle's que contiene un 10% suero bovino fetal. Se lavan las células con este medio y se mantienen a 4°C durante una noche. Después de dos lavados con tampón fosfato-HEPES-gelatina de pescado (PHG) de pH 7,0, se suspenden de nuevo las células en el mismo tampón a razón de 5×10^5 células/ml y se diluyen con un volumen de suero de rata rico en anticuerpos IgE anti-OVA que contienen 5 μ Ci de serotonina- H^3 /ml. Después de la incubación a 37°C durante 2 horas, se lavan de nuevo las células tres veces con PHG y se suspenden otra vez en PHG a razón de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Se distribuyen los mastocitos sensibilizados en placas de microvaloración (0,1 ml/hoyo) y se mezclan con 0,05 ml de diluciones en serie de proteínas de huevos hidrolizados producidas con arreglo al ejemplo 2 (1/10 a partir de 10 mg/ml). Se incuba la mezcla a 37°C durante 60 minutos y se centrifuga. Se mezcla una parte alícuota (0,05 ml) del líquido sobrenadante con 2 ml de líquido de centelleo y se determina la liberación de H^3 en un contador β de Packard.

Los resultados se recogen en la figura 2, de ellos se desprende que el huevo hidrolizado tiene una alergenidad mucho más reducida (equivalente a 25 μ g de OVA/g proteína) y que este valor bajo se mantiene cuando el huevo hidrolizado se incorpora a un postre de tipo tarta rellena (flan).

Inducción de la tolerancia oral a proteínas de huevo por alimentación de hidrolizado de proteína de huevo

La capacidad de los productos de huevo de inducir tolerancia oral se investiga "in vivo" en un modelo de rata. Se alimentan seis grupos de ratas Sprague-Dawley (6 animales/grupo) con una dieta sin proteína de huevo y se les administra como pienso experimental diferentes proteínas de huevo líquido / hidrolizados de huevo o agua (control), para que puedan beber a satisfacción de sus botellas y una dieta de perdigones de proteína de huevo sólido desde los días 1 a 19 del ensayo. Se administran a los animales los productos siguientes:

Grupo A, polvo de huevo entero (20 g/l);
 Grupo B, polvo de huevo hidrolizado del ejemplo 3 (120 g/l), DH = 25%;
 Grupo C, polvo de huevo hidrolizado del ejemplo 2 (120 g/l), DH = 23%;
 Grupo D, polvo de huevo hidrolizado del ejemplo 1 (120 g/l), DH = 20%;
 Grupo E, polvo de huevo hidrolizado ultrafiltrado del ejemplo 3 (120 g/l), DH = 31 %;
 Grupo F, H₂O (control).

El polvo de huevo hidrolizado ultrafiltrado, administrado al Grupo E, se obtiene del modo siguiente. El sustrato de huevo líquido hidrolizado obtenido en el ejemplo 3 se microfiltra empleando un módulo de filtración (Sefiltec, FBF 0102) con un filtro de tipo bolsa de 100 μ m (PGF 51 E 02). Después de este paso de microfiltración, se somete el líquido filtrado a ultrafiltración empleando un módulo UF fabricado en el mismo laboratorio con membranas de 4000 daltones (ES404, PES, 4000 MWCO, PCI Membrane Systems). A continuación se seca el líquido filtrado por liofilización.

El nitrógeno total de los hidrolizados se determina por el procedimiento de Dumas (método Carlo Erba). El grado de hidrólisis se determina por el método TNBS según Adler-Nissen (J. Agric. Food Chem. 27, 1256-1262, 1979).

Se inmunizan todas las ratas el día 5 del ensayo por inyección subcutánea de 0,1 mg de ovalbúmina + 0,2 ml de Al(OH)₃ del 3%. El día 19 se sacrifican todos los animales. Se extrae la sangre y se analizan los sueros para determinar los anticuerpos IgE específicos (anti-ovalbúmina) con un ensayo ELISA, del modo descrito previamente (Fritsche, R., Bonzon, M., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 93, 289-93, 1990). Resumiendo, se deposita en las placas de microvaloración la OVA a 4°C durante 24 horas. Se lavan las placas con PBS-Tween 20 y se saturan durante 1 h con gelatina de pescado. Después de añadir los sueros a analizar, diluido en serie (1/2) y de incubarlos durante 2 h, se añade un antisuero IgE de oveja anti-rata. Pasada 1 hora a temperatura ambiente, se añade durante 1 hora un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa, después se añade el sustrato (o-fenileno-diamina). La densidad óptica a 492 nm de un conjunto de sueros de ratas normales diluidos 1:5 se toma como base no específica. Las concentraciones de anticuerpos específicos se expresan en forma de diluciones máximas de los sueros estudiados por encima de este valor.

La proteasa de mastocitos de rata (RMCP II) se vierte en la sangre después de la activación de los mastocitos intestinales mediada por la IgE. La inducción oral de la liberación de la RMCP II es un índice de la sensibilización o de la tolerancia de la IgE a niveles de mastocitos intestinales.

Se determinan los niveles de RMCP II con un kit ELISA comercial (Moredun Animal Health Ltd., Edimburgo, Escocia) basado en un principio de ensayo sandwich, en el que el recubrimiento de las placas se realiza con un anticuerpo monoclonal anti-RMCP II y después se añade el suero a ensayar y un segundo anticuerpo policlonal de oveja anti-RMCP II conjugado con la peroxidasa de rábano rústico.

Los resultados se recogen en las figuras 3, 4 y 5. De la figura 3 se desprende que los hidrolizados de proteína de huevo de los ejemplos de 1 a 3 son capaces de suprimir la respuesta de una proteína IgE específica anti-huevo cuando se administran a animales durante 19 días para que puedan comerla a satisfacción, si se compara con el control no tolerizado, Grupo F), que induce niveles elevados de anticuerpos IgE anti-huevo. Más exactamente, los niveles de IgE anti-OVA (expresados en forma de log de las concentraciones de anticuerpo) son los siguientes:

Grupo A, 4 +/- 1,1; Grupo B, 4,1 +/- 0,9; Grupo C, 3,3 +/- 1,1; Grupo D, 4,1 +/- 2,0; Grupo F, 6,1 +/- 0,3. Si se comparan los grupos, todos los grupos de A a D son significativamente diferentes ($p < 0,05$) del grupo F (control).

En la figura 4 se representa también que la activación de los mastocitos intestinales se regula en sentido decreciente en los grupos A, B, C y D pero no en el grupo F (control). Los valores, expresados en μg de RMCP II/ml, son los siguientes: Grupo A, 0 +/- 0,0; Grupo B, 0,6 +/- 1,0; Grupo C, 1,2 +/- 1,7; Grupo D, 0,6 +/- 0,8; Grupo F, 2,8 +/- 0,7. Si se comparan los grupos, todos los grupos de A a D son significativamente diferentes ($p < 0,05$) del grupo F (control).

En la figura 5 se representa que las proteínas de huevos hidrolizados ampliamente, que se administran a las ratas del Grupo E, no inducen la tolerancia oral a la OVA, que se determina por la supresión de la respuesta a la proteína IgE específica anti-huevo o por la regulación en sentido decreciente de la activación de los mastocitos intestinales: los niveles de IgE anti-OVA y RMCP II no son diferentes de los valores obtenidos en el grupo de control.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de proteínas de huevos hidrolizados enzimáticamente con un grado de hidrólisis entre el 15 y el 28% para la fabricación de una composición destinada a la inducción de la tolerancia oral a las proteínas de huevo en un mamífero.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.
- 10 3. El uso de la reivindicación 2, en el que la composición es un alimento de destete para un bebé.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un animal de compañía, por ejemplo un gato o un perro.
5. El uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el grado de hidrólisis se sitúa entre el 23 y el 25%.

15

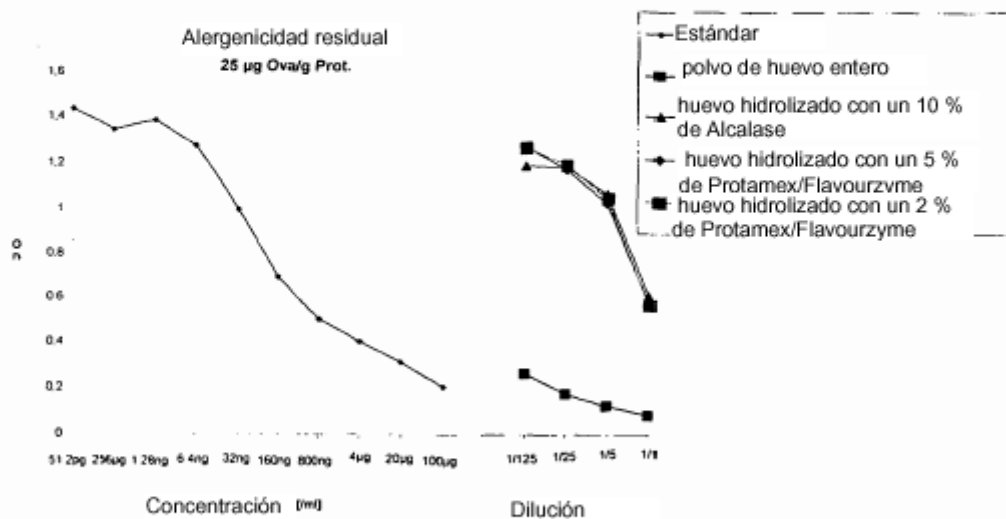
Fig 1

Fig 2

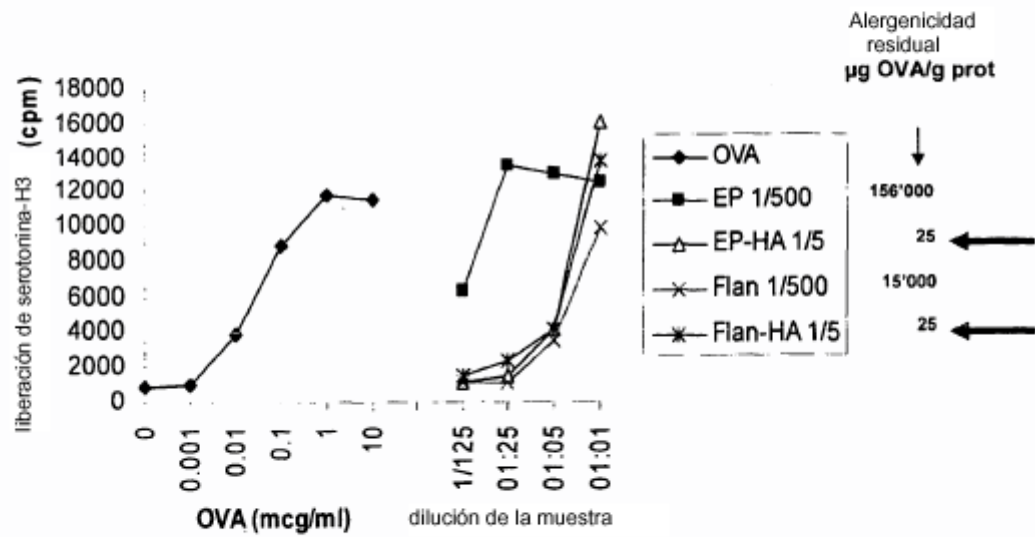


Fig 3

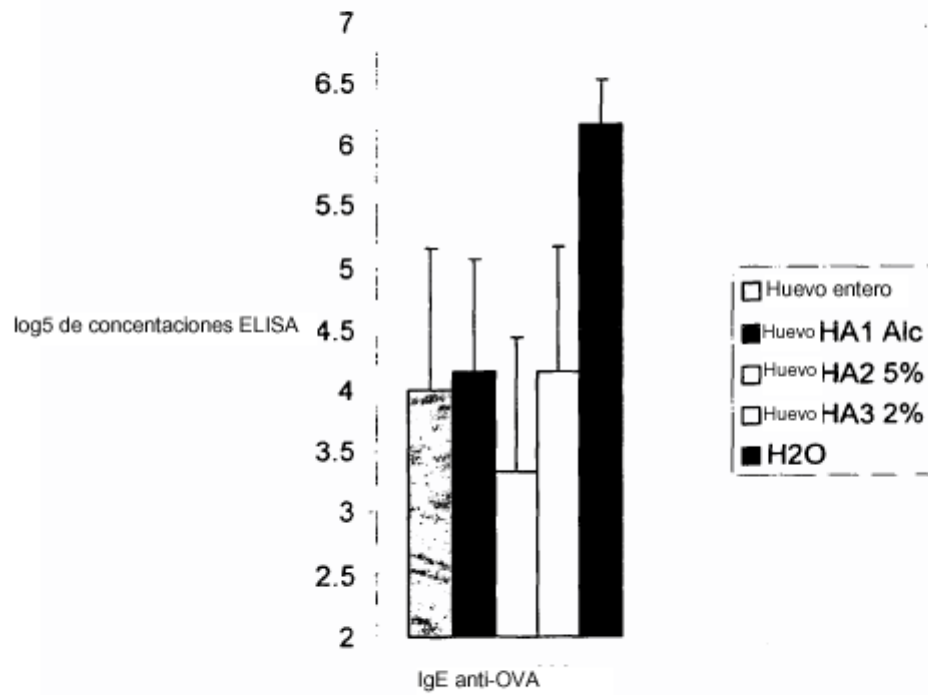


Fig 4

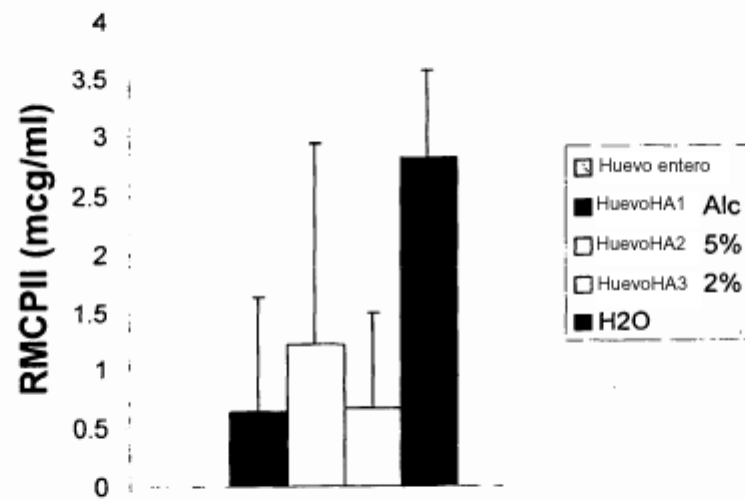


Fig 5

