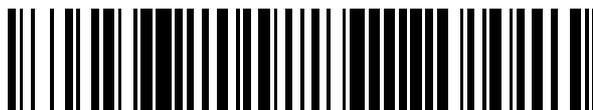


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 067**

51 Int. Cl.:

A23L 1/305 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009** **E 09015087 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2332428**

54 Título: **Formulación nutricional que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca y/o péptidos derivados del mismo para la inducción de tolerancia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2014

73 Titular/es:

MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
2701 Patriot Boulevard, 4th Floor
Glenview, IL 60026 , US

72 Inventor/es:

VALENTA, RUDOLPH;
HOCHWALLNER, HEIDRUN;
FOCKE-TEJKL, MARGARETE;
SWOBODA, INES;
VAN TOL, ERIC;
HERZ, UDO y
SCHULMEISTER, ULRIKE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 524 067 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

Formulación nutricional que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca y/o péptidos derivados del mismo para la inducción de tolerancia.

5 La presente invención se refiere en una realización a una formulación nutricional o complemento que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados y/o una fracción que contiene péptidos del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados y/o uno o más péptidos que contienen epítomos de células T aislados del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados para su uso en la inducción de tolerancia a la leche de vaca, a una proteína contenida en la leche de vaca o a un alérgeno contenido en la leche de vaca en un sujeto humano, en el que dichos péptidos contenidos en el hidrolizado o la fracción de hidrolizado comprenden péptidos que contienen epítomos de células T o en el que dicho uno o más péptidos son péptidos que contienen epítomos de células T, en el que dichos péptidos que contienen epítomos de células T pueden dirigir la reacción inmunitaria tras la ingesta de la formulación nutricional hacia la tolerancia y en el que el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados comprende menos del 1% de péptidos con un tamaño mayor de 1,5 kD.

15 La alergia a la leche de vaca es una de las alergias alimentarias más comunes en niños pequeños, experimentando aproximadamente del 2% al 2,5% de los lactantes reacciones alérgicas a la leche. La mayoría de los niños superan su alergia a la leche de vaca antes de los 3 años de edad, pero el 15% de estos lactantes conservará su sensibilidad a la leche de vaca hasta su segunda década de vida. Por tanto, los sujetos que tienen una alergia a la leche de vaca están presentes en todos los grupos de edad. Las enfermedades alérgicas como la alergia a la leche son trastornos inmunológicos que provienen de la activación de un subconjunto de células T que secretan factores alérgicos, inflamatorios que incluyen IL-4, IL-5 y/o IL-13 (Schmidt-Weber *et al.*, *Allergy* 2002, vol. 57, págs. 762-768). Este subconjunto de células T controla la conmutación isotípica de las células B específicas de antígeno a IgE y por tanto desempeña un papel clave en el inicio de los síntomas alérgicos, así como en la inducción de la tolerancia (Kondo *et al.*, *Pediatr Allergy Immunol.* 2008, vol. 19, págs. 592-598). Por tanto, la regulación de las células T específicas de alérgeno es una estrategia prometedora para controlar las enfermedades alérgicas.

Con el fin de evitar reacciones alérgicas tras la exposición a la leche de vaca en un sujeto alérgico a la leche de vaca, y en particular en lactantes que tienen alergia a la leche de vaca, actualmente se usan sobre todo fórmulas sustitutivas de la leche que remplazan la nutrición a base de leche de vaca. Estas formulaciones proporcionan adicionalmente al sujeto una fuente completa de nutrición. Los sustitutivos de la leche incluyen aminoácidos libres (tales como Nutramigen™ AA, Neocate), fórmulas a base de soja (tal como Pregomin) o fórmulas hipoalérgicas a base de proteínas parcial o intensamente hidrolizadas (tales como Nutramigen™, Alimentum y Pregestemil). La patente estadounidense n.º 6.077.558 describe un sistema emulsionante para composiciones dietéticas elementales que comprende una fuente de proteína que puede ser una proteína intensamente hidrolizada, aminoácidos libres, péptidos de cadena corta, o una mezcla de los mismos. El documento WO 2008/056983 se refiere a complementos alimenticios y dietéticos probióticos para lactantes y niños que contribuyen a la resistencia general contra patógenos y a la incidencia de enfermedades respiratorias en niños. Los complementos pueden incluir un hidrolizado de caseína, tal como, por ejemplo, un hidrolizado de caseína intensamente hidrolizada bajo en grasas no alérgico. Rüter, B. *et al.*, Characterization of a T cell epitopes in α s1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children, *Clinical and Experimental Allergy*, 36, 303-310 (2006) se refiere a la identificación de epítomos de células T que pueden ser dianas útiles en el desarrollo de inmunoterapia con péptidos. Lake, Alan M., *Food-Induced Eosinophilic Proctocolitis*, *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, volumen 30, número 1, págs. S58-S60, enero (2000) describe que una formulación a base de caseína intensamente hidrolizada puede administrarse a lactantes con proctocolitis eosinofílica con el fin de eliminar proteínas agresivas de la dieta. Si sujetos alérgicos no responden a las fórmulas de hidrolizado de proteína, las fórmulas a base de aminoácidos no derivados de la leche son adecuadas para el tratamiento de alergia a la leche tanto leve-moderada como severa. Las fórmulas a base de la soja tienen un riesgo de sensibilidad alérgica, porque algunos sujetos que son alérgicos a la leche también pueden ser alérgicos a la soja. Las fórmulas de hidrolizado parcial están caracterizadas por una mayor proporción de cadenas de aminoácidos largas (péptidos) en comparación con los hidrolizados intensos y se consideran más sabrosas. Habitualmente están destinadas a uso profiláctico y generalmente no se consideran adecuadas para el tratamiento de alergia/intolerancia a la leche. Las proteínas intensamente hidrolizadas, por otra parte, comprenden principalmente aminoácidos libres y péptidos cortos. La caseína y el suero de la leche son las fuentes de proteína usadas con mayor frecuencia para los hidrolizados debido a su alta calidad nutricional y su composición de aminoácidos.

Por tanto, la mayoría de las fórmulas sustitutivas de la leche de vaca actualmente en el mercado son a base de leche de vaca que se ha hidrolizado hasta diversos grados y/o de formulaciones de aminoácidos. Estas fórmulas de leche de vaca se usan para remplazar la leche de vaca y de ese modo reducir las reacciones alérgicas en sujetos alérgicos a la leche de vaca. Además, las fórmulas de leche de vaca pueden prevenir potencialmente el desarrollo de alergia a la leche de vaca en un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una alergia a la leche. Sin embargo, se ha observado que incluso los productos intensamente hidrolizados han provocado ocasionalmente reacciones alérgicas ilícitas en lactantes sensibilizados (Rosendal *et al.* *Journal of Dairy Science* 2000, vol. 83, n.º 10, págs. 2200-2210).

Por tanto, el tratamiento actual para las alergias a la leche es evitar totalmente la leche de vaca en los alimentos. Por consiguiente, una sustancia que pudiera dirigir la reacción inmunitaria tras la ingesta de la sustancia hacia la tolerancia a la leche de vaca o alimentos que comprenden leche de vaca aumentaría drásticamente la calidad de vida de un sujeto que tiene alergia a la leche de vaca o que corre el riesgo de desarrollar una alergia a la leche de vaca. Esta necesidad se aborda mediante la presente invención.

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención se refiere en una realización a una formulación nutricional o complemento que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados y/o una fracción que contiene péptidos del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados y/o uno o más péptidos que contienen epítomos de células T aislados del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados para su uso en la inducción de tolerancia a la leche de vaca, a una proteína contenida en la leche de vaca o a un alérgeno contenido en la leche de vaca en un sujeto humano, en el que dichos péptidos contenidos en el hidrolizado o la fracción de hidrolizado comprenden péptidos que contienen epítomos de células T o en el que dicho uno o más péptidos son péptidos que contienen epítomos de células T, en el que dichos péptidos que contienen epítomos de células T pueden dirigir la reacción inmunitaria tras la ingesta de la formulación nutricional hacia la tolerancia y en el que el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados comprende menos del 1% de péptidos con un tamaño mayor de 1,5 kD.

El término "formulación nutricional" tal como se usa en el presente documento describe una formulación sólida o líquida que puede por tanto comerse o beberse por un sujeto humano para su nutrición. La formulación nutricional de la invención tiene preferiblemente un valor nutricional de al menos 1, más preferible de al menos 10 e incluso más preferible de 50 kcal (kilocalorías)/100 ml para formulaciones líquidas y preferiblemente de al menos 1, más preferible al menos 10, incluso más preferible al menos 50, tal como al menos 100, y lo más preferible al menos 300 kcal/100 g para formulaciones de alimento deshidratado. En una realización preferida de la invención, la formulación nutricional de la invención tiene un valor nutricional de al menos 50-200 kcal/100 ml para las formulaciones líquidas y al menos 300-600 kcal/100 g para las formulaciones de alimento deshidratado. Una formulación nutricional se distingue de una vacuna. A diferencia de una vacuna, una formulación nutricional no comprende ninguno de adyuvantes (a menos que sea como contaminantes), compuestos virales activados o inactivados (a menos que sea como contaminantes), compuestos bacterianos activados o inactivados (a menos que sea como contaminantes) ni compuestos patógenos (a menos que sea como contaminantes).

El término "complemento" tal como se usa en el presente documento se refiere a un complemento nutricional que es una fuente concentrada de nutriente o alternativamente otras sustancias con efectos nutricionales o fisiológicos cuyo propósito es complementar la dieta normal.

Además de los componentes mencionados anteriormente pueden seleccionarse componentes adicionales de lípidos, minerales, hidratos de carbono, aminoácidos, quelatos de aminoácidos, nutrientes anabólicos, vitaminas, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas y agentes lipotrópicos con el fin de proporcionar una energía sostenida óptica y una formulación nutricional anabólica. La formulación nutricional puede ser un complemento nutricional o puede proporcionar una nutrición completa. Preferiblemente la formulación nutricional se encuentra en forma de un concentrado de alimento deshidratado. La formulación nutricional de la invención proporciona a un sujeto humano con preferencia creciente al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 25%, al menos un 50%, al menos un 75% o al menos un 90% del requerimiento calórico diario de un sujeto humano. El experto en la técnica es completamente consciente de que el requerimiento calórico diario depende del género, la altura y la edad del sujeto humano. Por ejemplo, un hombre de 30 años de edad con 80 kg de peso corporal y 180 cm de altura tiene un requerimiento calórico diario de aproximadamente 2900 cal (calorías) para mantener su peso corporal mientras que una mujer de 30 años de edad con 55 kg de peso corporal y 165 cm de altura tiene un requerimiento calórico diario de aproximadamente 2100 cal para mantener su peso corporal. En una realización preferida, la formulación nutricional de la presente invención es un producto nutricional para lactantes o adolescentes.

El término "péptido" tal como se usa en el presente documento describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluyendo moléculas de cadena sencilla o sus fragmentos. Un péptido según la invención contiene con preferencia creciente aproximadamente de 2 a 100 aminoácidos, aproximadamente de 5 a 50 aminoácidos, o aproximadamente de 5 a 40 aminoácidos. Adicionalmente los péptidos pueden formar oligómeros que consisten en al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las estructuras de orden superior correspondientes de tales multímeros se denominan, correspondientemente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Además, los peptidomiméticos de tales péptidos en los que se han reemplazado aminoácido(s) y/o enlace(s) peptídico(s) por análogos funcionales también están abarcados por el término "péptido". Tales análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes, tales como selenocisteína. El término "péptido" también se refiere a péptidos modificados de manera natural en los que la modificación se efectúa, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que son ampliamente conocidas en la técnica. Un péptido debe distinguirse de una proteína en la presente invención. Una proteína según la presente invención describe un compuesto orgánico compuesto por aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y plegados para dar una forma globular. Además, una proteína según la presente invención describe un aminoácido de más de 100 aminoácidos. Los péptidos pueden, por ejemplo, producirse de manera recombinante, de manera (semi)sintética u obtenerse de fuentes naturales tal como tras la hidrolización de proteínas, todo según los métodos

conocidos en la técnica.

El término "hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca" tal como se usa en el presente documento define una fórmula que comprende péptidos derivados de proteínas de leche de vaca hidrolizadas (por ejemplo caseína bovina o suero de la leche bovino). A este respecto, una proteína hidrolizada es una proteína que se ha descompuesto en péptidos y/o aminoácidos constituyentes. Aunque hay muchos medios para lograr la hidrólisis de una proteína, dos de los medios más comunes son la ebullición prolongada en un ácido fuerte o una base fuerte o el uso de una enzima tal como la enzima proteasa pancreática para estimular el proceso hidrolítico que se produce de manera natural. La hidrólisis de proteínas derivadas de la leche se logra preferiblemente usando una enzima o una mezcla de enzimas. Un hidrolizado de leche de vaca puede comprender péptidos derivados de la leche, en los que las proteínas de dicha leche se han hidrolizado hasta diversos grados. Por consiguiente, puede distinguirse entre un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca parcialmente hidrolizados y un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados. A este respecto, un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca parcialmente hidrolizados comprende más de un 20% de proteína de leche de vaca intacta mientras que un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados comprende menos de un 1% de péptidos con un tamaño mayor de 1,5 kD. Además, un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados es preferentemente hipoalergénico.

El término "péptido derivado de la leche de vaca" tal como se usa en el presente documento define un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de aminoácidos parcial de una proteína de la leche de vaca. Tales péptidos pueden obtenerse como se explica de manera resumida anteriormente mediante hidrólisis o pueden sintetizarse *in vitro* mediante métodos conocidos por el experto en la técnica y descritos en los ejemplos de la invención.

El término "péptido que contiene epítomos de células T" según la invención describe un péptido que comprende un epítomo que puede unirse a un receptor de superficie que está presente en una célula T. Se prefiere que el epítomo pueda unirse a un receptor de células T (TCR).

El término "fracción que contiene péptidos del hidrolizado" se refiere a una mezcla de péptidos que comprende al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10 y lo más preferiblemente al menos 20 que se han aislado del hidrolizado de la invención mediante técnicas de filtración conocidas por el experto en la técnica. Además, las técnicas para el aislamiento de péptidos a partir del hidrolizado de la invención se describen a continuación en el presente documento.

El término "tolerancia" según la invención se refiere a una tolerancia inmunológica. La tolerancia inmunológica se define en el presente documento como el desarrollo de una ausencia de reactividad específica o una ausencia de reactividad parcial de los tejidos linfoides a un antígeno o grupo de antígenos particular. Este antígeno o grupo de antígenos particular puede inducir una reacción inmunitaria en un sujeto humano atópico tras la ingesta del antígeno o grupo de antígenos particular. Por consiguiente, la tolerancia al antígeno o grupo de antígenos particular según la presente invención se induce tras la ingesta de uno o más péptidos que contienen epítomos de células T de la invención. Sin querer restringirse a la teoría, la tolerancia puede inducirse, por ejemplo, mediante un mecanismo de anergia y deleción de células T reactivas a alérgeno específicas. Alternativamente, la tolerancia puede, por ejemplo, inducirse mediante factores celulares (es decir citocinas) que podrían dirigir el desarrollo de las células T hacia el desarrollo de un fenotipo de célula T tolerogénico o supresor (células T reguladoras).

A este respecto, el término "péptidos que contienen epítomos de células T que pueden dirigir la reacción inmunitaria tras la ingesta de la formulación nutricional hacia la tolerancia" especifica péptidos que contribuyen al desarrollo de una ausencia de reactividad específica de los tejidos linfoides a un antígeno o grupo de antígenos particular, consiguiéndose esta actividad del péptido mediante la unión a un receptor de superficie de células T. Por consiguiente, los péptidos que contienen epítomos de células T están presentes en la formulación nutricional en una cantidad que permite dirigir la reacción inmunitaria hacia la tolerancia. Se prefiere que la reacción inmunitaria se reduzca mediante la inducción de tolerancia en al menos un 20%, tal como al menos un 50%, tal como en al menos un 75%, preferiblemente en al menos un 90%, más preferiblemente en al menos un 95% y lo más preferiblemente en un 100% en comparación con la reacción inmunitaria tras el contacto con el antígeno sin previa inducción de tolerancia. Los métodos para medir la tolerancia se conocen en la técnica e incluyen por ejemplo los métodos descritos en los ejemplos de la invención. Por consiguiente, la tolerancia puede determinarse por ejemplo midiendo la cantidad de factores proinflamatorios liberados por las células T (por ejemplo interleucinas o interferones) o la proliferación de células T. Un péptido que es un péptido que contiene epítomos de células T que puede dirigir la reacción inmunitaria tras la ingesta de la formulación nutricional hacia la tolerancia puede identificarse mediante métodos conocidos por el experto en la técnica que se describen, por ejemplo, en los ejemplos de la invención a continuación en el presente documento. Por consiguiente, un péptido que puede inhibir la proliferación de células T y/o regula por disminución la liberación de citocinas proinflamatorias y/o citocinas que dirigen la diferenciación de células T cooperadoras 2 (TH2) liberadas en el sobrenadante de PBMC es un péptido que contiene epítomos de células T que puede dirigir la reacción inmunitaria tras la ingesta de la formulación nutricional hacia la tolerancia.

Según la presente invención, se encontró sorprendentemente que los péptidos que contienen epítomos de células T contenidos en el hidrolizado de leche de vaca y péptidos que contienen epítomos de células T que se derivan de una

proteína presente en la leche de vaca pueden usarse en la inducción de tolerancia. Como se evidencia en los ejemplos a continuación, los inventores encontraron que los péptidos contenidos en hidrolizados de leche y péptidos derivados de una proteína presente en la leche de vaca pueden disminuir drásticamente la proliferación de células T cuando hay una exposición posterior a alérgenos de la leche, presumiblemente bloqueando la unión de receptores de células T y MHCII. Péptidos específicos contenidos en hidrolizados de leche o péptidos sintéticos correspondientes a una secuencia parcial de un péptido de leche de vaca pueden incluso bloquear la proliferación de células T cuando hay una exposición posterior a alérgenos de la leche. Mientras que los epítomos de células T en proteínas de leche de vaca se han descrito en la técnica (por ejemplo Kondo *et al.*, *Pediatr Allergy Immunol.* 2008, vol. 19, págs. 592-598; Elsayed *et al.*, *Mol Immunol.* 2004, vol. 41(12), págs. 1225-34 ; Ruitter *et al.*, *Clin Exp Allergy.* 2006, vol. 36(3), págs. 303-10; Ruitter *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; vol. 143(2), págs. 119-26; o Nakajima-Adachi *et al.*, *J Allergy Clin Immunol.* 1998; vol. 101(5), págs. 660-71), no ha sido descrito anteriormente que los péptidos derivados de leche de vaca puedan inducir la tolerancia. Además, según la presente invención también se ha encontrado que los péptidos que contienen epítomos de células T contenidos en hidrolizado de leche de vaca y los péptidos que contienen epítomos de células T que se derivan de una proteína presente en la leche de vaca reducen los niveles de citocinas que dirigen una diferenciación de células T cooperadoras 2 (TH2) y los niveles de citocinas proinflamatorias en comparación con los niveles de dichas citocinas inducidos por proteínas de la leche. Como se conoce en el campo de la inmunología, las citocinas proinflamatorias tienen efectos perjudiciales sobre la integridad de la barrera intestinal y por tanto están involucradas en el desarrollo enfermedad tanto alérgica como inflamatoria. Entre las citocinas proinflamatorias, se conoce en particular que IL-4 e IFN-gamma destruyen la cohesión entre las células epiteliales que revisten la superficie del intestino comprometiendo así la integridad de la barrera intestinal. Como resultado de esto, el intestino se vuelve más permeable con un aumento de la exposición de las células inmunitarias de la pared intestinal a alérgenos y antígenos dietéticos/microbianos.

Por tanto, sin querer restringirse a la teoría, se cree que la tolerancia se induce directamente por péptidos derivados de la leche de vaca. Anteriormente los péptidos y los hidrolizados de la leche de vaca sólo se han usado con el fin de reemplazar la leche de vaca. Mediante el remplazo de la leche de vaca se ha evitado una reacción alérgica o el desarrollo de una reacción alérgica. Los hallazgos proporcionados en el presente documento muestran que los péptidos que son péptidos que contienen epítomos de células T contenidos en hidrolizado de leche de vaca y los péptidos que contienen epítomos de células T que se derivan de una proteína presente en la leche de vaca pueden además e inesperadamente usarse para inducir tolerancia en un sujeto humano.

Según la invención, se induce tolerancia a la leche de vaca, a una proteína contenida en la leche de vaca o a un alérgeno contenido en la leche de vaca.

La leche de vaca, una proteína contenida en la leche de vaca o un alérgeno contenido en la leche de vaca están comprendidos, por ejemplo, en cualquier alimento que comprenda componentes de la leche de vaca. Ejemplos no limitativos son la leche, la cuajada, la nata, la mantequilla, el yogur y alimentos que contengan cualquiera de éstos.

El término "alérgeno" tal como se usa en el presente documento describe un antígeno que puede estimular una reacción de hipersensibilidad en un sujeto humano atópico (alérgico). Además, un alérgeno es en general una sustancia que es extraña para el cuerpo y puede provocar una reacción alérgica sólo en sujetos humanos atópicos.

En el presente documento también se describe una formulación nutricional o complemento que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca y/o una fracción que contiene péptidos del hidrolizado y/o uno o más péptidos derivados de una proteína presente en la leche de vaca para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad inflamatoria del intestino, en el que dichos péptidos contenidos en el hidrolizado o la fracción de hidrolizado comprenden péptidos que contienen epítomos de células T o en el que dicho uno o más péptidos son péptidos que contienen epítomos de células T, y en el que dichos péptidos que contienen epítomos de células T pueden regular por disminución las citocinas proinflamatorias tras la ingesta de la formulación nutricional.

El término "enfermedad inflamatoria del intestino" tal como se usa en el presente documento define un grupo de estados inflamatorios del tracto gastrointestinal. Los principales tipos de enfermedad inflamatoria del intestino son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La principal diferencia entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa es la ubicación y la naturaleza de los cambios inflamatorios. La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano (lesiones segmentarias), aunque la mayoría de los casos comienzan en el íleon terminal. La colitis ulcerosa, en contraposición, se restringe al colon y el recto. En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria del intestino está presente en un sujeto humano que tiene una alergia a la leche o que corre el riesgo de desarrollar una alergia a la leche. En una realización preferida adicional, la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona de una o más de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), gastroenteritis, colitis y/o esofagitis. GERD es una enfermedad producida por el reflujo anómalo en el esófago. En particular, la enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), la gastroenteritis, la colitis y/o la esofagitis son comunes en sujetos humanos que tienen una alergia a la leche.

Tal como se usa en el presente documento, el término "citocinas proinflamatorias" son citocinas que se liberan en un sujeto humano por células del sistema inmunitario, preferiblemente por células presentadoras de antígeno o células T y lo más preferiblemente por células T y median en y/o potencian una enfermedad inflamatoria. Ejemplos no limitativos de citocinas inflamatorias son IL-12, IL-17, IL-5, IL-4, IFN- γ , IL-8, TNF- α , IL-6 o IL-1. Los métodos para

medir el nivel de citocinas liberadas por células del sistema inmunitario se conocen ampliamente por el experto en la técnica e incluyen los métodos descritos en los ejemplos. Por consiguiente, los métodos incluyen, por ejemplo, la medición de los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo.

5 El término “péptidos que contienen epítomos de células T que pueden regular por disminución las citocinas proinflamatorias tras la ingesta de la formulación nutricional” se refiere a los péptidos que contienen epítomos de células T en la formulación nutricional que pueden regular por disminución los niveles de citocinas proinflamatorias que se liberan por las células inmunitarias, preferiblemente células T o APC, y más preferiblemente células T. Además, estos péptidos que contienen epítomos de células T pueden administrarse a un sujeto humano en una cantidad que sea suficiente para regular por disminución las citocinas proinflamatorias tras la ingesta de la formulación nutricional. Se prefiere que el nivel de citocinas proinflamatorias se regule por disminución en al menos un 20%, tal como al menos un 50%, tal como en al menos un 75%, preferiblemente en al menos un 90%, más preferiblemente en al menos un 95% y lo más preferiblemente en al 100% en comparación con el nivel de citocinas proinflamatorias en una reacción inmunitaria atópica tras el contacto con el antígeno. Un péptido que es un péptido que contiene epítomos de células T que puede regular por disminución las citocinas proinflamatorias tras la ingesta de la formulación nutricional puede identificarse mediante métodos conocidos por el experto en la técnica que, por ejemplo, se describen en los ejemplos de la invención a continuación en el presente documento. Por consiguiente, la medición del nivel de citocinas proinflamatorias liberadas en el sobrenadante del cultivo de PBMC tras la exposición a un péptido identifica un péptido que contiene epítomos de células T que puede regular por disminución las citocinas proinflamatorias tras la ingesta de la formulación nutricional.

20 Tal como se describe en el presente documento, se ha encontrado sorprendentemente que los péptidos que contienen epítomos de células T de la invención derivados de la leche de vaca pueden regular por disminución las citocinas inflamatorias que se liberan tras la exposición a o la estimulación mediante alérgenos o antígenos dietéticos/microbianos. Por tanto, la formulación nutricional de la invención es adecuada para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino.

25 Según la invención, el uno o más péptidos son péptidos que contienen epítomos de células T aislados del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca.

Tal como se detalla anteriormente, el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca comprende péptidos derivados de proteínas de leche de vaca hidrolizadas. Estos péptidos pueden aislarse del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca mediante una técnica convencional conocida por el experto en la técnica. Por consiguiente, una purificación analítica generalmente utiliza al menos una de tres propiedades para separar péptidos. En primer lugar, los péptidos pueden purificarse según sus puntos isoeléctricos haciéndolos pasar a través de un gel con gradiente de pH o una columna de intercambio iónico. En segundo lugar, los péptidos pueden separarse según su tamaño o peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular o mediante SDS-PAGE (electroforesis en dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida). En tercer lugar, otra metodología de purificación de péptidos podría involucrar filtración con membranas (por ejemplo ultrafiltración) que generaría una mezcla de péptidos adecuada para la aplicación propuesta. Los péptidos se purifican a menudo usando 2D-PAGE y luego se analizan mediante huella peptídica para establecer la identidad del péptido. El péptido aislado e identificado obtenido del hidrolizado puede producirse entonces de manera recombinante aplicando métodos convencionales conocidos por el experto y usarse o bien solo o bien en combinación con un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca según la invención.

Una realización preferida de la invención se refiere a la formulación nutricional de la invención, en la que el uno o más péptidos tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o 4.

45 Tal como se muestra en los ejemplos a continuación, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (figura 2, Cas3, alfaS1-péptido 3) y SEQ ID NO: 4 (figura 2, Cas4, alfaS1-péptido 4) suprimen la proliferación de células T cuando se estimulan de nuevo con la proteína de leche de vaca y de ese modo inducen la tolerancia a la leche de vaca (véase la figura 4).

Según la invención, el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca es un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados.

50 Una realización preferida de la invención se refiere a la formulación nutricional de la invención, en la que el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados es un hidrolizado de caseína bovina intensamente hidrolizada.

Tal como se muestra a continuación en los ejemplos de la invención, un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados puede suprimir la proliferación de células T cuando éstas se estimulan de nuevo con proteína de leche de vaca. De ese modo se induce la tolerancia a la leche de vaca. Por consiguiente, VTP 3, VTP11 y VTP15 (véase la figura 1) fueron los más potentes para inducir la tolerancia y son, por tanto, ejemplos preferidos de la formulación nutricional que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados según la invención, VTP3 es Nutramigen™, VTP11 es la base de Nutramigen™ y VTP15 es la caseína bovina intensamente hidrolizada que se usa en Nutramigen™. VTP3, VTP 11 y VTP 15 pueden

adquirirse de Mead Johnson Nutrition, 2400 West Lloyd Expressway Evansville, Indiana 47721-0001, EE.UU. VTP3, VTP 11 y VTP 15 comprenden caseína bovina intensamente hidrolizada. En la figura 8 se proporciona un perfil de los péptidos derivados de caseína comprendidos en VTP3, VTP 11 y VTP 15. VTP15 solo consiste en los péptidos enumerados en la figura 8. Nutramigen™ (VTP3) comprende además de los péptidos enumerados en la figura 8 los siguientes componentes: jarabe de glucosa, aceite vegetal (aceite de oleína de palma, aceite de coco, aceite de soja, aceite de girasol altamente oleico), almidón de maíz modificado <2%, fosfato de calcio <1%, citrato de calcio, citrato de potasio, cloruro de potasio, L-cisteína, cloruro de colina, L-tirosina, inositol, óxido de magnesio, L-triptófano, ácido ascórbico, sulfato ferroso, taurina, L-carnitina, acetato de DL-alfa-tocoferilo, sulfato de zinc, nicotinamida, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, palmitato de retinilo, sulfato de manganeso, clorhidrato de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, yoduro de sodio, ácido fólico, fitomenadiona, molibdato de sodio, cloruro crómico, colecalciferol, selenito de sodio, biotina, cianocobalamina.

Una realización preferida adicional de la invención se refiere a la formulación nutricional de la invención, en la que el sujeto humano o es un niño o un adolescente.

El término “niño” o el término “adolescente” se usan en el presente documento según las definiciones proporcionadas en la técnica. Por tanto, el término “niño” quiere decir un sujeto humano entre las fases de nacimiento y la edad de aproximadamente 10 años y el término “adolescente” quiere decir un sujeto humano entre la edad de aproximadamente 10 años y la pubertad (antes de la madurez sexual).

La invención se refiere en una realización preferida adicional a la formulación nutricional de la invención, en la que el sujeto humano es un adulto.

El término “adulto” se usa en el presente documento según las definiciones proporcionadas en la técnica. Por tanto, este término quiere decir un sujeto después de la pubertad (después de la madurez sexual).

Una realización preferida adicional de la invención se refiere a la formulación nutricional de la invención, en la que el sujeto humano tiene una alergia a la leche de vaca.

El término “alergia a la leche de vaca” describe una alergia alimentaria, es decir una reacción adversa inmunitaria a una o más de las proteínas contenidas en la leche de vaca en un sujeto humano. Los principales síntomas son síntomas gastrointestinales, dermatológicos y respiratorios. Éstos pueden traducirse en erupciones cutáneas, urticaria, vómitos, diarrea, estreñimiento y molestias. El espectro clínico se extiende a diversos trastornos: reacciones anafilácticas, dermatitis atópica, respiración dificultosa, cólico infantil, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), esofagitis, colitis, gastroenteritis, cefalea/migraña y estreñimiento.

En otra realización preferida de la formulación nutricional de la invención, la formulación nutricional comprende adicionalmente uno o más de hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos, minerales, nutrientes anabólicos, vitaminas, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas y agentes lipotrópicos.

Estos compuestos adicionales de la formulación nutricional de la invención se añaden preferiblemente con el fin de proporcionar el valor nutricional de la formulación nutricional descrita anteriormente en el presente documento. También pueden añadirse preferiblemente con el fin de proporcionar una nutrición completa, una energía sostenida óptima y/o una formulación nutricional anabólica. Los ejemplos no limitativos de lípidos incluyen aceite de coco, aceite de soja y mono- y diglicéridos. Hidratos de carbono a modo de ejemplo son, por ejemplo, glucosa, lactosa comestible y almidón de maíz hidrolizado. Ejemplos no limitativos de minerales y vitaminas son calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo, y las vitaminas A, E, D, C, y el complejo B, respectivamente. Las cepas bacterianas probióticas incluyen, por ejemplo, las bacterias del ácido láctico (LAB) y las bifidobacterias. Ejemplos de antioxidantes incluyen antioxidantes naturales tales como ácido ascórbico (AA, E300) y tocoferoles (E306), así como antioxidantes sintéticos tales como galato de propilo (PG, E310), terc-butilhidroquinona (TBHQ), hidroxianisol butilado (BHA, E320) e hidroxitolueno butilado (BHT, E321). Ejemplos no limitativos de ácidos nucleicos son ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Una realización preferida adicional de la invención se refiere a la formulación nutricional de la invención, en la que la tolerancia se induce temporalmente.

El término inducción “temporal” de la tolerancia según la invención se refiere a una tolerancia inmunológica que se induce durante un periodo de tiempo limitado tras la ingesta de la formulación nutricional de la invención en un sujeto humano, que es preferiblemente un sujeto humano que tiene una alergia a la leche de vaca o que corre el riesgo de desarrollar una alergia a la leche de vaca. A este respecto, un periodo de tiempo temporal específica que el sujeto humano no adquiere una tolerancia constante. La tolerancia temporal se refiere preferiblemente a la tolerancia inducida durante al menos medio día, tal como durante al menos un día, tal como durante al menos dos días, preferiblemente durante al menos una semana, más preferiblemente durante al menos dos semanas, incluso más preferiblemente durante al menos un mes y lo más preferiblemente durante al menos 3 meses. Según la invención, la tolerancia temporal se induce durante menos de 6 meses.

Las figuras muestran:

Figura 1

Visión general de las muestras de prueba de leche denominadas VTP1-VTP16 que se obtuvieron de diferentes proveedores y contenían fórmulas de proteínas de leche entera de vaca, parcialmente hidrolizadas, y caseína intensamente hidrolizada y proteínas del suero de la leche así como fórmulas de aminoácidos de leche de vaca así como fórmulas de aminoácidos.

Figura 2

Péptidos y proteínas sintéticas. Se enumeran el nombre de los péptidos o proteínas, sus secuencias de aminoácidos, la longitud, el pI y el peso molecular en kDa.

Figura 3

10 Caracterización demográfica, clínica y serológica de los individuos analizados en los ensayos de proliferación.

Figura 4

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación con PBMC para someter a prueba la reactividad de las células T con las muestras de leche VTP1-VTP16. Se estimularon PBMC de 6 individuos no alérgicos y de 7 pacientes alérgicos a la leche de vaca con muestras de leche, con alérgenos de leche de vaca (α S1-caseína, α S2-caseína, $n\alpha$ -caseína), con péptidos derivados de α S1-caseína (α S1-péptido 1, α S1-péptido 6), con alérgeno de polen de abedul rBet v 1a y alérgeno de polen de césped Phl p 5-péptido 1. Se presentan los índices de estimulación.

Figura 5

Con el fin de analizar qué citocinas se inducen en PBMC por las diferentes muestras de leche (VTP1-VTP16), se realizaron análisis con Luminex en los sobrenadantes de PBMC. Se presentan el análisis de niveles de citocina (eje y: pg/ml) en los sobrenadantes de cultivos de PBMC de 6 individuos no alérgicos (NA) y 5 pacientes alérgicos a la leche de vaca (CMA) que se habían estimulado con muestras de leche VTP1-VTP16 (1-16) o medio (17).

Figura 6

Se realizaron experimentos de tolerancia con individuos no alérgicos (AB) para mostrar que los péptidos pueden inducir tolerancia en células T de manera específica de alérgeno. Los experimentos en personas no alérgicas también pueden mostrar tolerancia porque la tolerancia se mide como una reducción de la reactividad de las células T (Ebner *et al.*, J Immunol 1995, vol. 154, págs. 1932-1940). Siempre que una persona no alérgica contenga células T reactivas al alérgeno, puede medirse la tolerancia al alérgeno a nivel de células T.

Se aislaron PBMC y se obtuvieron fracciones enriquecidas en células presentadoras de antígenos (APC) y células T mediante tecnología de separación MACS. Se preincubaron las fracciones de células T durante la noche con grandes cantidades de péptidos (α S1-caseína péptido 1, α S1-caseína péptido 2, α S1-caseína péptido 3 y un péptido control, Phl p 5-péptido 1) o con un hidrolizado de suero de la leche intenso (VTP8) o un hidrolizado de suero de la leche/caseína parcial (VTP16). Al día siguiente se combinaron las células T y las APC y se estimularon con muestras de proteínas de leche entera de vaca VTP13, VTP14) o con α S1-caseína intacta.

Se realizaron dos experimentos con el mismo individuo. En los paneles a y c se presentan las cuentas por minutos (cpm; que reflejan la proliferación de células T) y en los paneles b y d, los índices de estimulación (SI).

Figura 7

Experimento de tolerancia con un individuo no alérgico (KFI) que evalúa hidrolizados de leche para determinar su capacidad para inducir tolerancia en células T. Se preincubaron fracciones de células T durante la noche con altas cantidades de base de Nutramigen™ (VTP11), hidrolizado de caseína intenso (VTP15), proteínas de suero de la leche entera de vaca (VTP14), Nutramigen™ (VTP3), péptidos sintéticos (α S1-caseína péptido 4 y un péptido control Phl p 5-Pep 1), o tampón (UCO). Al día siguiente se combinaron y las células T y las APC y se estimularon con muestras de leche (VTP14, VTP1). La estimulación de las células T se facilita o bien en cuentas por minuto (cpm) o bien como índice de estimulación (SI). Se presentan las cpm de experimentos individuales y las medias de los mismos. Los datos obtenidos por medio de la estimulación con 10 μ g de VTP14 están resaltados.

Figura 8

Perfil de los péptidos derivados de caseína comprendidos en VTP3, VTP 11 y VTP 15 (figura 1). Se enumeran la puntuación iónica, las secuencias de aminoácidos de los péptidos, la puntuación de hidrofobicidad y la puntuación de amargor.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1:

Procedimientos experimentales

Materiales biológicos y pacientes

5 Se obtuvieron de diferentes proveedores las muestras denominadas VTP1-VTP16 que contenían proteínas de leche entera de vaca, parcialmente hidrolizada, intensamente hidrolizada así como formulaciones de aminoácidos. Se aisló ADNc que codifica para α S1-caseína ($r\alpha$ S1-cas) mediante inmunodetección de IgE a partir de una biblioteca de expresión de ADNc preparada a partir de glándulas mamarias bovinas (Schulmeister *et al.*, J Immunol. 2009). Se expresaron alérgenos recombinantes en la cepa de *Escherichia coli* BL21 Codon 25 Plus (DE3)-RIPL (Stratagene, La Jolla, CA) como proteínas con etiqueta de hexahistidina y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺ (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se adquirió el recombinante Bet v1 de Biomay (Viena, Austria).

10 Se obtuvo leche de vaca pasteurizada que contenía un 3,5% de grasa de un mercado local (NÖM, Austria, lote: 22 550 2:00) y se adquirieron proteínas de leche de vaca natural de Sigma-Aldrich (Viena, Austria).

Se obtuvo suero de conejo inmunizando conejos tres veces con $r\alpha$ S1-cas, $r\alpha$ S2-cas, $r\beta$ -cas, $r\kappa$ -cas, $r\alpha$ -1a, $r\beta$ -Ig y rlf (Charles River, Kisslegg, Alemania).

15 Se seleccionaron pacientes alérgicos a la leche de vaca según una historia de caso positivo, reacciones positivas a la prueba de pinchazo en la piel o determinación de IgE específica para extracto de leche de vaca usando el sistema ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia).

Se incluyeron como controles personas sin problema alguno tras el consumo de leche. Comprendían pacientes no alérgicos así como pacientes con alergia mediada por IgE a fuentes de alérgenos distintas de la leche.

Caracterización de las muestras de leche

20 Se evaluó la composición de las muestras de leche VTP1-VTP16 mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie (Biorad, Hercules, CA).

25 Para el análisis de inmunotransferencia, se realizaron transferencias puntuales de alícuotas de 1 μ g de VTP1-VTP16 sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Se bloquearon las tiras de nitrocelulosa con PBST (PBS, Tween 20 al 0,5% v/v) y se expusieron a sueros de pacientes alérgicos a la leche, individuos sanos o antisueros de conejo diluidos 1:10, 1:20 ó 1:2000 durante la noche a 4°C. Se detectaron los anticuerpos IgE humanos unidos con anticuerpos anti-IgE humano marcados con ¹²⁵I (IBL, Hamburgo, Alemania), diluidos 1:15, o IgG de conejo unidos con anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con ¹²⁵I (Perkin Elmer, EE.UU.) diluidos 1:2000 en PBST y se visualizaron mediante autorradiografía usando películas XOMAT de Kodak (Kodak, Austria) a -80°C.

30 Se cuantificaron los niveles de endotoxina en las muestras de leche usadas en este estudio mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (Lonza, Basilea, Suiza) con intervalo de sensibilidad de 0,1 UE/ml a -1,0 UE/ml según las instrucciones del fabricante.

Ensayos de leucemia basófila de rata (RBL)

35 Para la cuantificación de reacciones de tipo inmediata mediadas por anticuerpo IgE, se realizaron ensayos de liberación de mediadores de células huRBL, tal como se describió anteriormente (Schulmeister *et al.*, J Immunol. 2009, vol. 182(11), págs. 7019-29). En resumen, se incubaron células RBL (clon RBL-703/21) transfectadas con el receptor Fc ϵ R1 humano con sueros de pacientes alérgicos a la leche de vaca durante la noche. Al día siguiente se lavaron las células, se añadieron 100 μ l de componentes de la leche (concentración: 0,3 μ g/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37°C, 7% de CO₂, 95% de humedad. Se mezclaron alícuotas de los sobrenadantes con la disolución de ensayo (ácido cítrico o citrato de sodio 0,1 M, pH 4,5 + 4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamida 160 μ M) y se incubaron durante 1 hora a 37°C, 7% de CO₂, 95% de humedad. Se midió la fluorescencia con un lector de microplacas de fluorescencia y pudo calcularse la liberación específica. Se restaron los valores obtenidos con tampón solo y se consideraron positivos los valores que superaban el 5% de liberación total.

Preparación de células y ensayos linfoproliferativos

45 Se separaron PBMC de individuos no alérgicos y pacientes alérgicos a la leche de vaca de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se cultivaron las PBMC (2x10⁵ células por pocillo) por triplicado en placas de 96 pocillos (Nuncclone; Nalgen Nunc Internacional, Roskilde, Dinamarca) en 200 μ l de medio Ultra Culture libre de suero (UltraCulture, Lonza, Verviers, Bélgica) complementado con L-glutamina 2 mM (GIBCO, Auckland, NZ), b-mercaptoetanol 50 μ M (GIBCO) y gentamicina 0,1 mg/ml (GIBCO).

50 Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 7 días con o sin diferentes concentraciones de diversas muestras hidrolizadas. Se estimularon las células con diferentes concentraciones, 4 U de IL-2 por pocillo (Roche, Mannheim, Alemania) sirvieron como control positivo y medio solo sirvió como control negativo. Tras 6 días de incubación, se añadió a cada pocillo 0,5 mCi de 3H-timidina (GE Healthcare) durante 16 h, luego se midió la reactividad incorporada mediante recuento de centello líquido. Se expresó la proliferación como

cuentas por minuto (c.p.m.; medias de triplicados) usando un contador de centelleo Microbeta (Wallac ADL, Friburgo, Alemania). Se calculó el índice de estimulación (SI) como el cociente de c.p.m. con antígeno y el control con medio.

Análisis de los niveles de citocina en sobrenadantes

5 Se midieron los niveles de citocina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) en los sobrenadantes recogidos de cultivos de PBMC el día 6 de cultivo usando la tecnología basada en perlas fluorescentes xMAP Luminex (Luminex Corp., Austin, TX). Se llevaron a cabo los ensayos según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania), y se leyeron las señales fluorescentes en un sistema Luminex 100 (Luminex Corp.). Los límites de detección fueron de 3,2 pg/ml para IL-2, de 3,5 pg/ml para IL-4, de 1,9 pg/ml para IL-5, de 5,5 pg/ml para IL-6, de 3,1 pg/ml para IL-10, de 57 pg/ml para IL-12, de 47 pg/ml para IL-13, de 2,9 pg/ml para IFN- γ , de 5,3 pg/ml para TNF- α , de 3,3 pg/ml para GM-CSF, de 21 pg/ml para TGF- β 1, de 178 pg/ml para TGF- β 2 y de 5 pg/ml para TGF- β 3.

Experimentos de inducción de tolerancia

15 Para el experimento de inducción de tolerancia, se aislaron PBMC de donantes sanos mediante gradiente de densidad Ficoll y se separaron adicionalmente las células en dos fracciones. Se enriquecieron las células T con un kit de aislamiento de células Pan T humanas (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania), mientras que se enriquecieron las células presentadoras de antígenos con microperlas con CD3 humano (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) mediante separación magnética de células.

Se confirmó la pureza de las fracciones celulares mediante análisis de FACS.

20 Se incubaron durante la noche las fracciones celulares que contenían las células T con diferentes péptidos o sólo medio a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad, se mantuvieron durante la noche las fracciones de células presentadoras de antígenos en las mismas condiciones sin ningún antígeno. Al día siguiente se lavaron tres veces las fracciones de las células T con DPBS (GIBCO) y se combinaron las fracciones de células T con las de células presentadoras de antígenos. Se cultivaron por triplicado las células (2×10^5 células por pocillo) en placas de 96 pocillos tal como se describió anteriormente. Se estimularon las células con diferentes concentraciones de muestras de leche, 4 U de IL-2 por pocillo o medio solo. Se realizó el cabo tal como se describió para los ensayos linfoproliferativos.

Ejemplo 2:

Resultados

30 Los individuos sanos no alérgicos muestran una respuesta de IgG normal pero no de IgE a los alérgenos de la leche de vaca. En los experimentos se compararon las respuestas tanto cuantitativas (proliferación) como cualitativas (es decir, citocinas) en individuos alérgicos a la leche de vaca así como en individuos sanos no alérgicos.

35 Los experimentos identificaron pequeños péptidos en los hidrolizados que pueden bloquear los receptores de células T y MHCII de manera que haya una proliferación limitada o ausencia de la misma cuando hay exposición posterior a alérgenos de la leche. Por tanto, los experimentos identificaron una fracción de manera que pueda inducirse una tolerancia a los alérgenos de la leche de vaca.

Otro enfoque fue mezclar células T que se han expuesto previamente a péptidos/hidrolizados en un cultivo de células T-APC que se habían preincubado y estimulado de nuevo con preparaciones de proteínas de leche entera. Esto debe demostrar la capacidad de los péptidos para inhibir/amortiguar la respuesta a una exposición a proteínas de leche entera.

40 Hasta ahora se han sometido a prueba 6 personas no alérgicas y 7 personas alérgicas a la leche de vaca en cuanto a las respuestas linfoproliferativas con las 16 muestras de leche de vaca así como con péptidos derivados de α S1-caseína y antígenos control. Los individuos no alérgicos y los pacientes alérgicos a la leche de vaca indujeron índices de estimulación comparables. Las muestras de Nutramigen™ indujeron proliferación de células T más débil en comparación con las otras muestras de leche. Las formulaciones de aminoácidos indujeron las respuestas más débiles. VTP13 y 14, identificadas mediante SDS-PAGE y análisis de espectrofotometría de masa como fuentes de proteínas intactas de leche de vaca, sirvieron como controles para experimentos de tolerancia, porque indujeron fuertes respuestas linfoproliferativas. Se analizaron los sobrenadantes de cultivos de 11 de los individuos sometidos a prueba en cuanto a la secreción de 13 citocinas mediante análisis de Luminex. Estos resultados son extremadamente interesantes y sorprendentes por dos razones: En primer lugar, el análisis de los niveles de citocinas mostró que las citocinas que impulsan la diferenciación de Th2 (GM-CSF, IL-5 e IL-13) y las citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF-alfa e IFN-gamma) se inducen en pequeñas cantidades por las muestras de Nutramigen™ VTP3, 4, 11, 12, 15). En contraposición, se halló una fuerte inducción de citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6) en las muestras VTP2, VTP5 y VTP14 que están solo parcialmente hidrolizadas o contienen proteínas intactas. En particular, la inducción de IFN-gamma parece problemática porque existe evidencia de que IFN-gamma puede dañar las células epiteliales. Las cantidades de citocinas secretadas estuvieron en el mismo intervalo en experimentos realizados con individuos no alérgicos y con individuos alérgicos, a excepción de

IFN-gamma, que regulado por incremento más fuertemente en individuos no alérgicos.

Determinados péptidos derivados de leche de vaca (por ejemplo alfa S1 caseína) inducen proliferaciones de células T en PBMC. Puesto que cualquier péptido reactivo con células T también puede inducir tolerancia en células T en determinadas condiciones (por ejemplo, unión al receptor de células T sin coestimulación apropiada, presencia de grandes cantidades de péptidos reactivos con células T en la infancia) se supone que pueden usarse péptidos reactivos con células T derivados de alfaS1-caseína para la inducción de tolerancia para identificar péptidos reactivos con células T adicionales. Con respecto a esto, se demostró actividad tolerogénica de los péptidos derivados de alfa S1-caseína que se generarán de manera sintética. Se dividieron PBMC de personas reactivas en una fracción de células T y una fracción reducida en células T (perlas acopladas anti-CD3) que contenía las APC. Se preincubó la fracción de células T con los péptidos derivados de caseína y los péptidos control (alérgeno de polen de césped Bet v1, péptidos derivados de Phi p 5), se lavó y luego se expuso la fracción de APC con los péptidos. Usando este ensayo fue posible demostrar la actividad tolerogénica específica de la leche de estos péptidos derivados de caseína.

En un esfuerzo por buscar péptidos tolerogénicos, se establecieron satisfactoriamente las condiciones de cultivo. En una etapa siguiente, se identificó un péptido candidato derivado de α S1-caseína que mostró en dos experimentos independientes una supresión de respuestas de células T. Cuando se añadió el péptido 3 derivado de alfaS1-caseína a una fracción de células T aislada, suprimió la proliferación en la fracción combinada de células T-APC cuando se estimuló de nuevo con concentrado de proteínas de suero de la leche VTP14 o α S1-caseína. Se obtuvo un resultado similar para el péptido 4. Además, se estudiaron los posibles efectos supresores de los hidrolizados de caseína VTP3 (Nutramigen™), VTP11, VTP14 y VTP15 en la proliferación inducida por proteínas de leche entera de vaca y se encontró que en una preincubación particular con Nutramigen™ (VTP3) podía inducir tolerancia.

Lista de secuencias

<110> Mead Johnson & Company

<120> FORMULACIÓN NUTRICIONAL QUE COMPRENDE UN HIDROLIZADO QUE CONTIENE PÉPTIDOS DE LECHE DE VACA Y/O PÉPTIDOS DERIVADOS DEL MISMO PARA LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA

<130> R3074 EP

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 1

Arg Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu
1 5 10 15

Asn Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Cys
20 25 30

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 2

Phe Gly Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu
1 5 10 15

Ser Thr Glu Asp Gln Ala Met Glu Asp Ile Lys Gln Met Glu Ala Glu
20 25 30

<210> 3

<211> 3

<211> 36
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

<400> 3

Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His
 1 5 10 15

Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Glu Gln
 20 25 30

Leu Leu Arg Cys
 35

5

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

10 <400> 4

Cys Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro Asn Ser
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His Ala Gln Gln
 20 25 30

Lys Glu

<210> 5
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

15

<400> 5

Cys Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe Tyr Pro Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Tyr Val
 35

<210> 6
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

20

<400> 6

Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala Pro Ser Phe Ser Asp Ile Pro
 1 5 10 15

Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu Lys Thr Thr Met Pro Leu Trp
 20 25 30

Cys

<210> 7

<211> 205
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

<400> 7

Arg Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu
 1 5 10 15

5 Asn Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe
 20 25 30

Gly Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu Ser
 35 40 45

Thr Glu Asp Gln Ala Met Glu Asp Ile Lys Gln Met Glu Ala Glu Ser
 50 55 60

Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His
 65 70 75 80

Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu
 85 90 95

Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val
 100 105 110

Pro Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His
 115 120 125

Ala Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr
 130 135 140

Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala
 165 170 175

Pro Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu
 180 185 190

Lys Thr Thr Met Pro Leu Trp His His His His His His
 195 200 205

<210> 8
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

<400> 8

10

Lys Asn Thr Met Glu His Val Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Gln Glu Thr Tyr Lys Gln Glu Lys Asn Met Ala Ile Asn Pro Ser Lys
 20 25 30
 Glu Asn Leu Cys Ser Thr Phe Cys Lys Glu Val Val Arg Asn Ala Asn
 35 40 45
 Glu Glu Glu Tyr Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ala Glu Val
 50 55 60
 Ala Thr Glu Glu Val Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys His Tyr Gln Lys
 65 70 75 80
 Ala Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr Gln Lys Phe Pro Gln Tyr Leu
 85 90 95
 Gln Tyr Leu Tyr Gln Gly Pro Ile Val Leu Asn Pro Trp Asp Gln Val
 100 105 110
 Lys Arg Asn Ala Val Pro Ile Thr Pro Thr Leu Asn Arg Glu Gln Leu
 115 120 125
 Ser Thr Ser Glu Glu Asn Ser Lys Lys Thr Val Asp Met Glu Ser Thr
 130 135 140
 Glu Val Phe Thr Lys Lys Thr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Lys Asn Arg
 145 150 155 160
 Leu Asn Phe Leu Lys Lys Ile Ser Gln Arg Tyr Gln Lys Phe Ala Leu
 165 170 175
 Pro Gln Tyr Leu Lys Thr Val Tyr Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro
 180 185 190
 Trp Ile Gln Pro Lys Thr Lys Val Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu His
 195 200 205
 His His His His His
 210

<210> 9
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> *Betula verrucosa*
 <400> 9

5

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 10
<211> 32
5 <212> PRT
<213> *Phleum pratense*

<400> 10

Cys Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
1 5 10 15

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
20 25 30

10 <210> 11
<211> 199
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<400> 11

Arg Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu
 1 5 10 15
 Asn Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe
 20 25 30
 Gly Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu Ser
 35 40 45
 Thr Glu Asp Gln Ala Met Glu Asp Ile Lys Gln Met Glu Ala Glu Ser
 50 55 60
 Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His
 65 70 75 80
 Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu
 85 90 95
 Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val
 100 105 110
 Pro Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His
 115 120 125
 Ala Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala
 165 170 175
 Pro Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu
 180 185 190
 Lys Thr Thr Met Pro Leu Trp
 195

<210> 12
 <211> 207
 5 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*
 <400> 12

Lys Asn Thr Met Glu His Val Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Gln Glu Thr Tyr Lys Gln Glu Lys Asn Met Ala Ile Asn Pro Ser Lys
 20 25 30
 Glu Asn Leu Cys Ser Thr Phe Cys Lys Glu Val Val Arg Asn Ala Asn
 35 40 45
 Glu Glu Glu Tyr Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ala Glu Val
 50 55 60
 Ala Thr Glu Glu Val Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys His Tyr Gln Lys
 65 70 75 80
 Ala Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr Gln Lys Phe Pro Gln Tyr Leu
 85 90 95
 Gln Tyr Leu Tyr Gln Gly Pro Ile Val Leu Asn Pro Trp Asp Gln Val
 100 105 110
 Lys Arg Asn Ala Val Pro Ile Thr Pro Thr Leu Asn Arg Glu Gln Leu
 115 120 125
 Ser Thr Ser Glu Glu Asn Ser Lys Lys Thr Val Asp Met Glu Ser Thr
 130 135 140
 Glu Val Phe Thr Lys Lys Thr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Lys Asn Arg
 145 150 155 160
 Leu Asn Phe Leu Lys Lys Ile Ser Gln Arg Tyr Gln Lys Phe Ala Leu
 165 170 175
 Pro Gln Tyr Leu Lys Thr Val Tyr Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro
 180 185 190
 Trp Ile Gln Pro Lys Thr Lys Val Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
 195 200 205

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n nutricional o complemento que comprende un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados y/o una fracci3n que contiene péptidos del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados y/o uno o más péptidos que contienen epítomos de células T aislados del hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados para su uso en la inducci3n de tolerancia a la leche de vaca, a una proteína contenida en la leche de vaca o a un alérgeno contenido en la leche de vaca en un sujeto humano, en el que dichos péptidos contenidos en el hidrolizado o la fracci3n de hidrolizado comprenden péptidos que contienen epítomos de células T o en el que dicho uno o más péptidos son péptidos que contienen epítomos de células T, en el que dichos péptidos que contienen epítomos de células T pueden dirigir la reacci3n inmunitaria tras la ingesta de la formulaci3n nutricional hacia la tolerancia y en el que el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados comprende menos del 1% de péptidos con un tamaño mayor de 1,5 kD.
2. Formulaci3n nutricional o complemento según la reivindicaci3n 1, en el que el uno o más péptidos tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o 4.
3. Formulaci3n nutricional o complemento según la reivindicaci3n 1, en el que el hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca intensamente hidrolizados es un hidrolizado que contiene caseína bovina intensamente hidrolizada.
4. Formulaci3n nutricional o complemento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto humano es un niño o un adolescente.
5. Formulaci3n nutricional o complemento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto humano es un adulto.
6. Formulaci3n nutricional o complemento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto humano tiene una alergia a la leche de vaca.
7. Formulaci3n nutricional o complemento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la formulaci3n nutricional comprende adicionalmente uno o más de hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos, minerales, nutrientes anabólicos, vitaminas, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas y agentes lipotrópicos.
8. Formulaci3n nutricional o complemento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la tolerancia se induce temporalmente.
9. Formulaci3n nutricional o complemento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los péptidos consisten en aproximadamente de 5 a 50 aminoácidos.
10. Formulaci3n nutricional o complemento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los péptidos que contienen epítomos de células T pueden regular por disminuci3n las citocinas inflamatorias tras la ingesta de la formulaci3n nutricional.

35

Figura 1:

ID de muestra	Muestra
VTP1	Fórmula de leche entera rutinaria
VTP2	Producto de hidrolizado de caseína/suero de la leche parcial
VTP3	Producto de hidrolizado de caseína intenso (Nutramigen™)
VTP4	Fórmula de aminoácidos
VTP5	Producto de hidrolizado de suero de la leche parcial
VTP6	Producto de hidrolizado de caseína intenso
VTP7	Producto de hidrolizado de caseína intenso
VTP8	Producto de hidrolizado de suero de la leche intenso
VTP9	Base de leche entera
VTP10	Base de hidrolizado de caseína/suero de la leche parcial
VTP11	Base de hidrolizado de caseína intenso
VTP12	Base de aminoácidos
VTP13	Control proteína de leche entera
VTP14	Concentrado de proteína de suero de la leche al 35%
VTP15	Sólo hidrolizado de caseína intenso
VTP16	Sólo hidrolizado de caseína/suero de la leche parcial

Figura 2:

Péptido /Proteína	Secuencia	Longitud (aa)	pl	PM (kDa)	SEQ ID
Cas1	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVC	32	8.22	3.75	NO: 1
Cas2	FGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEA ES	33	4.18	3.70	NO: 2
Cas3	ISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYEQL LRC	36	4.80	4.21	NO: 3
Cas4	CLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQ KE	34	8.14	3.96	NO: 4
Cas5	CPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGA WYYV	35	4.14	4.24	NO: 5
Cas6	PLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW C	33	3.92	3.60	NO: 6
raS1 caseína	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFP EVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIK QMEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVP SERYLGYLEQLRLKKYKVPQLEIVPNSA EERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAY FYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQ YTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLWHH HHHH	205	5.35	23.80	NO: 7
raS2 caseína	KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKMAIN PSKENLCSTFCKEVVRNANEEYSIGSSS EESAEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQ FYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKRN AVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMEST EVFTKKTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQK FALPQYLKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIP YVRYLHHHHHH	213	8.35	25.17	NO: 8
rBetv 1a	GVFNYETETTSVIPAARLFKAFILDGDNLF PKVAPQAISVENIEGNGGPGTIKKISFPE GFPFKYVKDRVDEVDTNFKYNYSVIEG GPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNK YHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAV	159	5.4	17.4	NO: 9

Péptido /Proteína	Secuencia	Longitud (aa)	pi	PM (kDa)	SEQ ID
	ESYLLAHSDAYN				
Phi p5-péptido 1	CGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSKAA LTSK	32	8.16	3.03	NO: 10
na caseína	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFP EVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIK QMEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVP SERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSA EERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAY FYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQ YTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW y KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKMAIN PSKENLCSTFCKEVVRNANEEEEYSIGSSS EESAEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQ FYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKRN AVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMEST EVFTKTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQK FALPQYLKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIP YVRYL	199 y 207	7-91 y 8.34	22.97 y 24.35	NOs: 11 y 12

Figura 3:

Paciente	Edad	Sexo	País	Síntomas relacionados con la leche	Otras alergias	IgE total (kU/l)	CM (kUAl) o SPT	
No alérgicos	MC	51y	f	A	no	no	6.16	<0.35
	AG	28y	f	A	no	no	91.9	<0.35
	AB	21y	m	A	no	no	8.89	<0.35
	FK	42y	m	A	no	no	27	<0.35
	VC	33y	f	A	no	no	nd	nd
	KFI	24y	f	A	no	no	29.3	nd
CMA	ES	22y	f	A	Sys	PO, gato, perro, huevo de gallina, ácaro, avellana	3350	285.5
	VW	24y	f	A	GI	PO	456	6.28
	RD	49y	m	A	AD, asma	ácaro	146	2.86
	KK	9y	f	A	AD, Sys	PO, huevo de gallina, soja, ácaro, mohos, nueces	2528	62.5
	GE	31y	m	A	AD, Sys	mohos, perro	113	<0.35, SPT
	GM	3y	m	A	na	na	nd	0.76
	NL	4y	f	A	na	na	nd	nd

*Abreviaturas usadas en la figura: y, años; f, femenino; m, masculino; A, Austria; Síntomas: Sys, reacciones sistémicas; GI, síntomas gastrointestinales; AD, dermatitis atópica; alérgeno (fuente): PO, polen; kU/l, IgE total en kilounidades/litro; kUAl, IgE específica de alérgeno en kilounidades de antígeno/litro; CM, leche de vaca; SPT, prueba de pinchazo en la piel; na, no aplicable; nd, no realizado.

Figura 4:

leche muestras	Individuos no alérgicos						Pacientes alérgicos a la leche de vaca						
	MC	AG	AB	FK	VC	KFI	ES	VW	RD	KK	GE	GM	NL
VTP1	nd	3.6	5.3	6.7	nd	nd	2.2	4.3	2.8	2.2	19.5	5.6	5.9
VTP2	nd	3.0	4.5	4.7	nd	nd	1.1	4.5	2.6	1.8	27.8	5.7	3.9
VTP3	nd	2.6	1.1	1.4	nd	nd	0.5	1.4	1.5	0.6	6.2	1.9	1.6
VTP4	nd	0.7	1.5	1.3	nd	nd	1.0	0.9	1.1	0.7	5.8	1.1	1.7
VTP5	nd	2.9	3.9	4.2	nd	nd	2.0	2.7	1.7	1.3	6.0	7.1	3.7
VTP6	2.6	3.7	2.8	4.3	nd	nd	1.6	0.7	1.6	0.8	3.5	3.0	2.2
VTP7	1.5	3.4	3.9	2.4	nd	nd	1.5	1.3	2.2	0.8	2.8	3.5	2.6
VTP8	0.7	2.7	2.3	1.1	0.8	nd	1.1	0.4	0.8	0.4	2.6	1.6	1.0
VTP9	7.0	4.1	4.0	2.7	2.0	nd	1.1	3.4	4.0	1.8	10.9	2.7	3.3
VTP10	6.8	4.0	3.8	2.2	3.9	7.1	1.6	3.1	3.1	1.2	18.9	5.2	3.2
VTP11	0.5	2.3	1.9	1.3	2.1	2.4	0.3	0.9	0.8	0.5	2.7	1.7	1.5
VTP12	0.5	1.4	2.5	1.5	1.5	1.8	0.4	0.8	1.2	0.5	1.3	0.9	0.9
VTP13	4.3	1.6	2.5	1.7	2.3	1.8	0.6	1.7	2.4	0.5	4.6	1.8	2.0
VTP14	4.2	3.1	3.5	5.0	4.3	6.8	1.4	1.0	5.9	2.2	11.3	6.8	5.2
VTP15	0.8	1.5	2.3	0.7	0.7	1.8	0.6	0.4	1.3	0.3	0.6	1.0	0.3
VTP16	7.1	3.9	4.1	2.2	1.9	3.9	1.4	0.8	3.7	1.1	7.6	1.6	2.3
máx SI (IL-2)	11.3	3.3	6.3	8.0	5.9	13.0	6.4	5.3	9.4	5.4	26.8	18.2	7.6
rs1 caseína	1.1	1.8	2.0	0.2	4.0	4.0	0.2	0.7	0.8	2.1	3.9	3.4	1.6
rs2 caseína	2.7	3.0	4.9	1.2	5.9	7.2	0.7	2.4	4.4	2.1	9.4	3.8	3.1
ns caseína	6.3	1.1	1.6	0.6	1.3	1.5	0.7	1.1	1.7	1.1	0.8	1.3	0.8
rBet v 1a	4.1	2.9	3.0	2.4	1.5	3.7	1.8	1.6	5.9	0.6	7.4	nd	3.5
as1-péptido1	0.6	1.0	1.5	0.9	0.8	0.7	nd	0.6	1.4	0.3	nd	nd	nd
as1-péptido2	nd	nd	1.8	0.9	1.9	1.1	nd	0.9	1.6	0.9	nd	nd	3.3
as1-péptido3	0.9	1.2	2.3	1.3	1.2	0.8	nd	1.1	1.1	0.7	0.6	nd	1.0
as1-péptido4	nd	nd	nd	1.1	1.6	1.5	nd	0.3	1.2	0.6	2.0	nd	nd
as1-péptido5	0.5	1.3	nd	0.7	1.2	1.1	nd	0.3	0.7	0.4	1.3	nd	nd
as1-péptido6	0.4	0.8	nd	0.7	1.9	0.8	nd	0.5	0.6	0.5	nd	nd	nd
as1-mez. péptidos	0.5	1.2	1.5	0.9	1.9	1.6	0.6	0.4	1.3	nd	nd	nd	2.0
PHI p 5-péptido1	0.8	1.2	2.1	0.7	1.5	0.9	1.0	0.5	1.0	0.6	0.9	nd	0.8

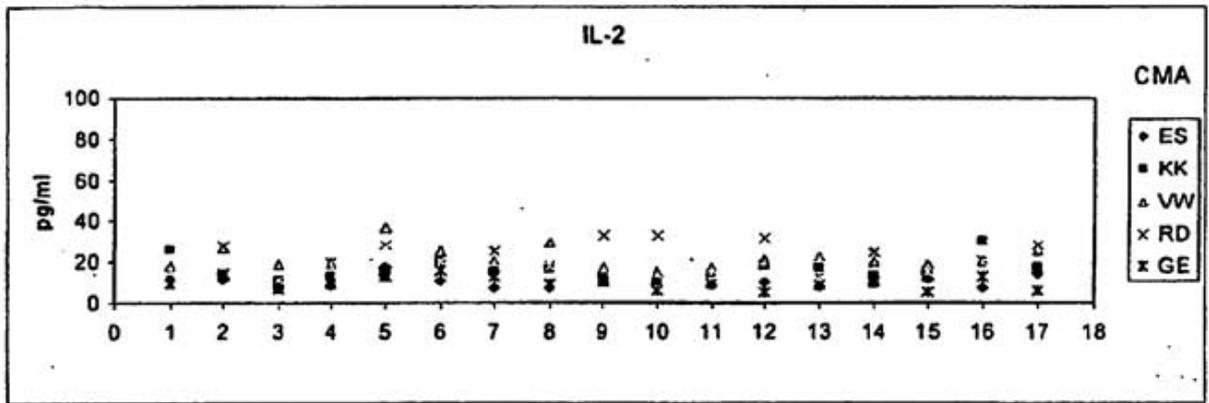
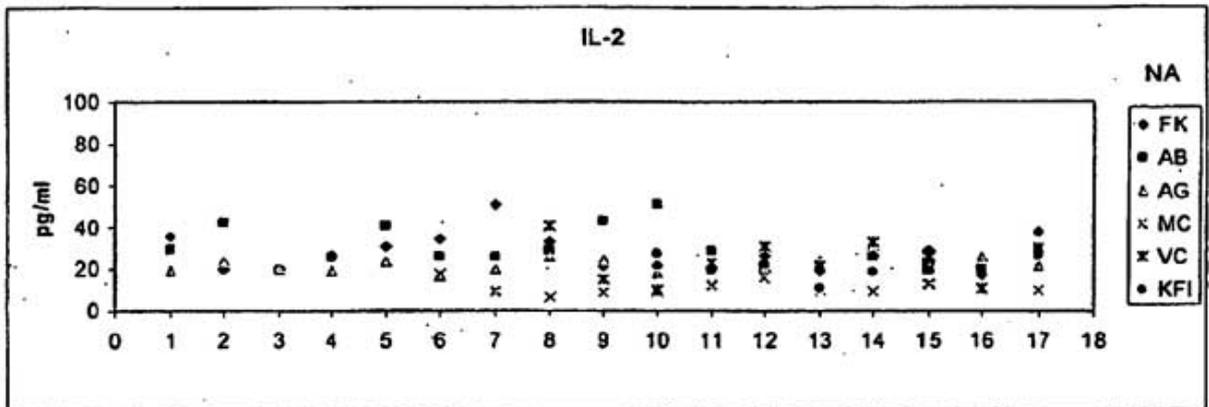
Concentraciones usadas para la estimulación: muestras de leche: 10 µg/pocillo; proteínas:

5 µg/pocillo; péptidos: 1.6 µg/pocillo y mezcla de péptidos: 0.26 µg por péptido/pocillo. nd, no

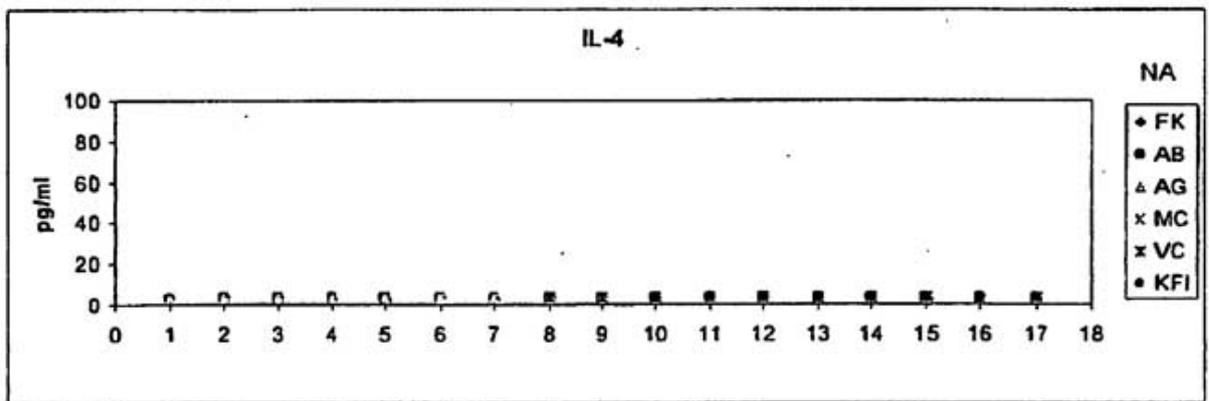
realizado; máx SI, índice de estimulación máximo con IL-2.

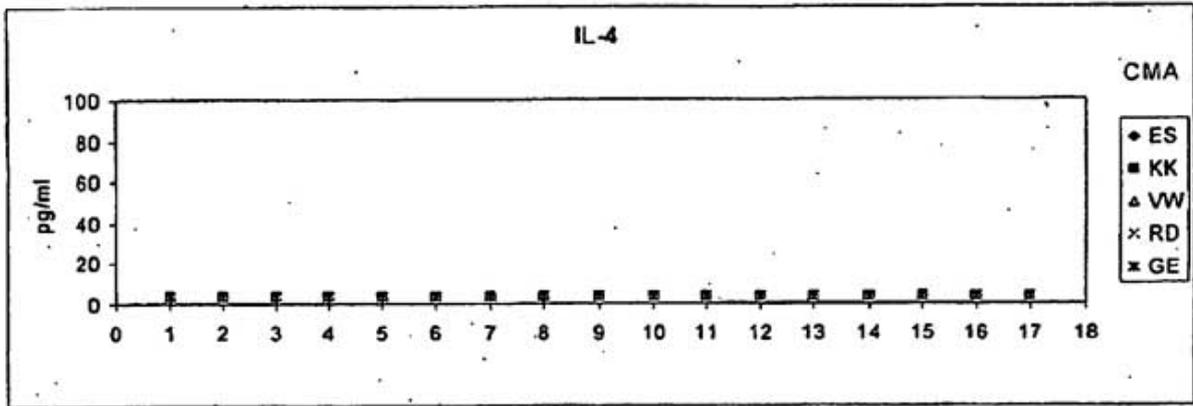
Se destacan en gris todos los índices de estimulación > 2.

Figura 5:

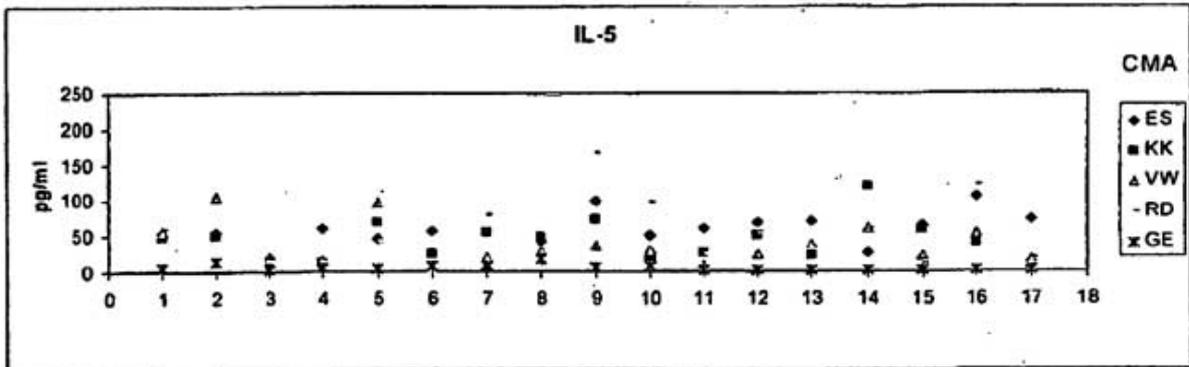
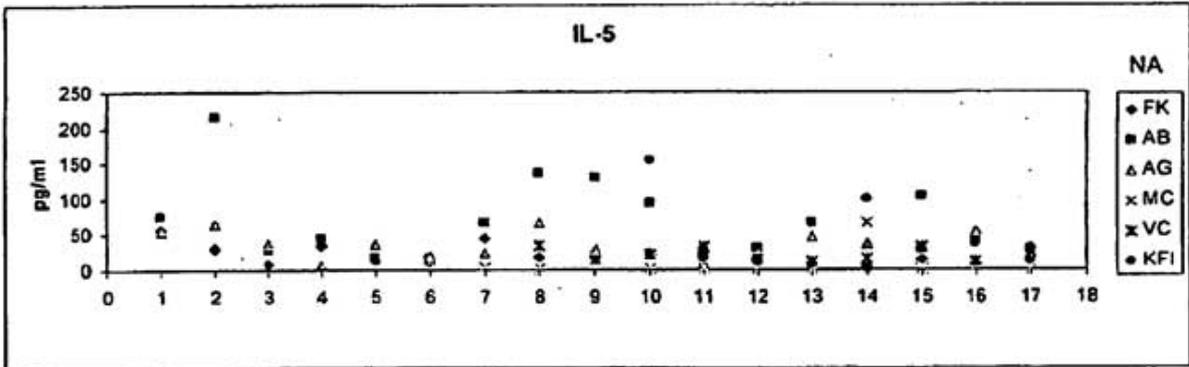


intervalo de detección: 3.2-2350 pg/ml

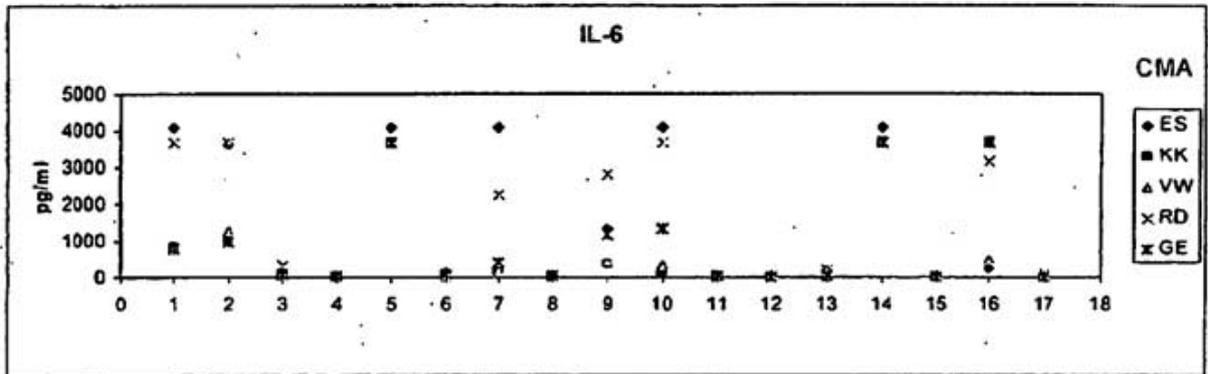
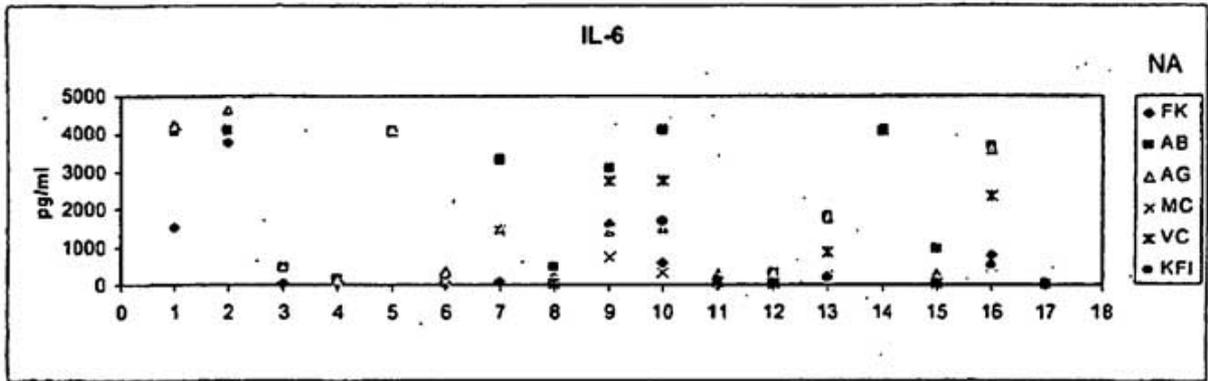




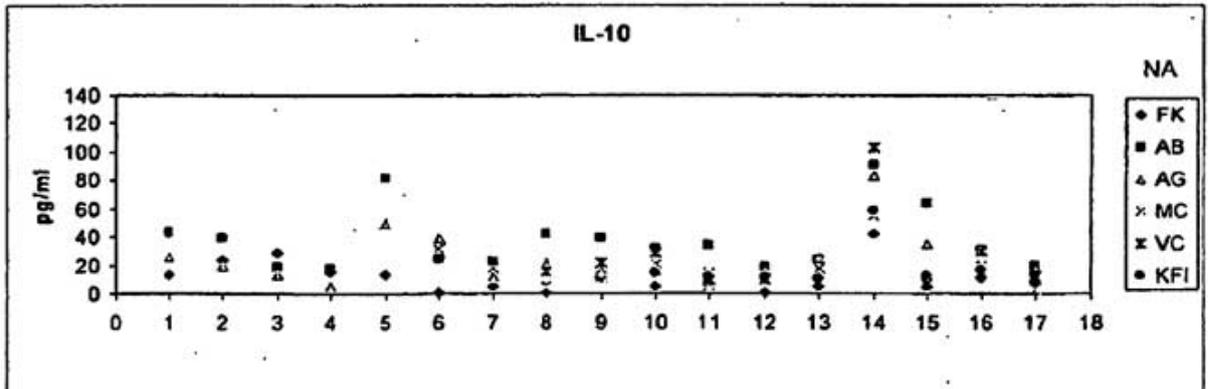
intervalo de detección: 3.5-2575 pg/ml

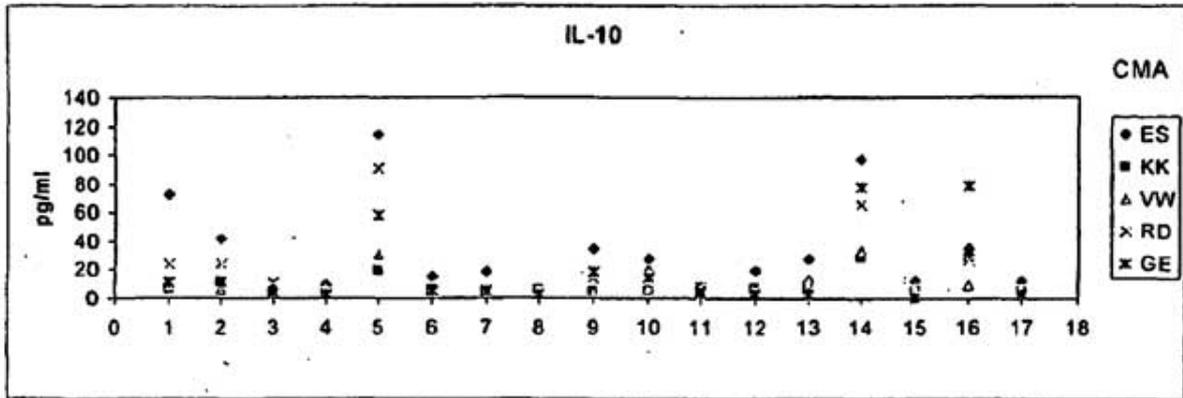


intervalo de detección: 1.9-1400 pg/ml

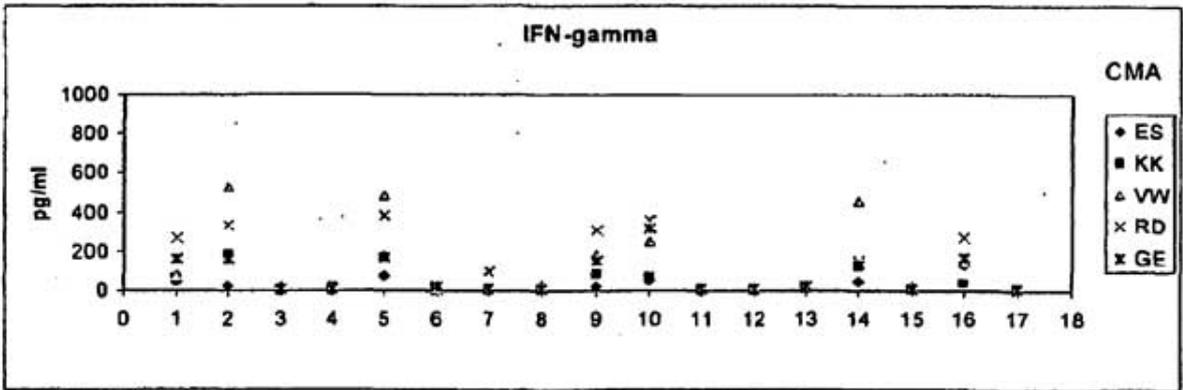
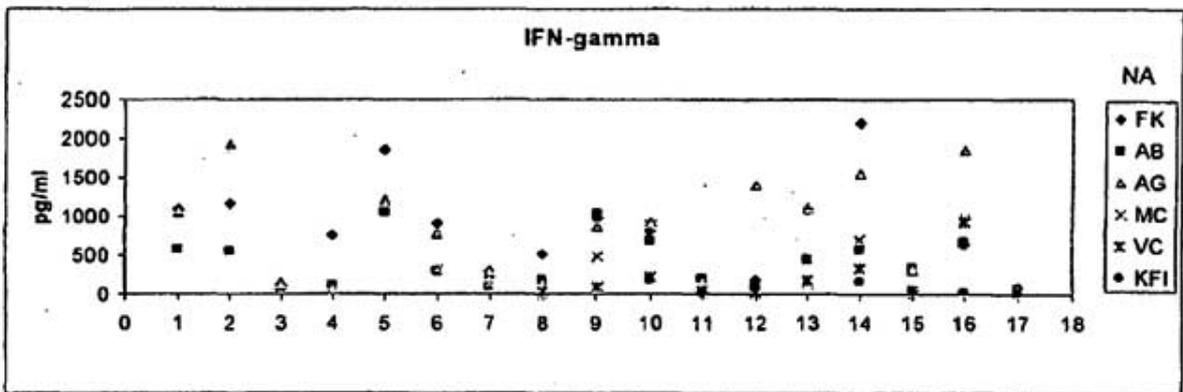


intervalo de detección: 5.5-4000 pg/ml

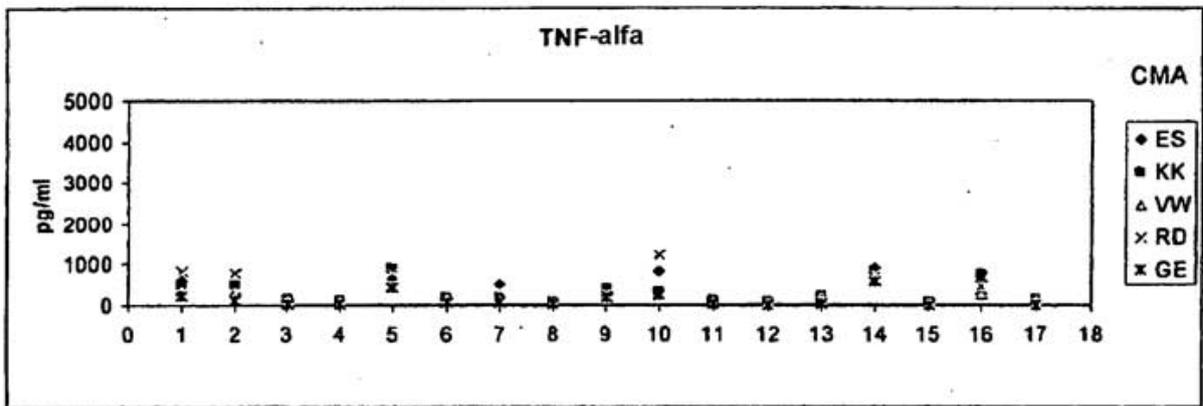
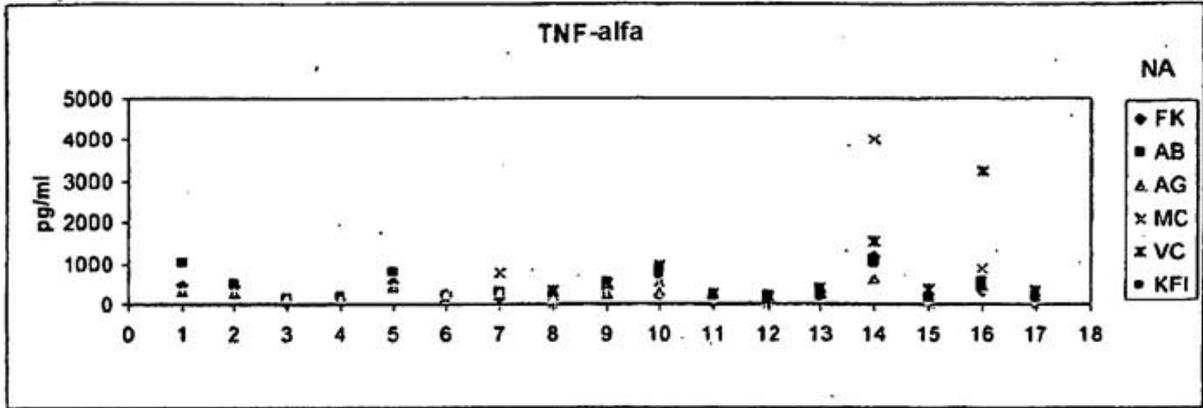




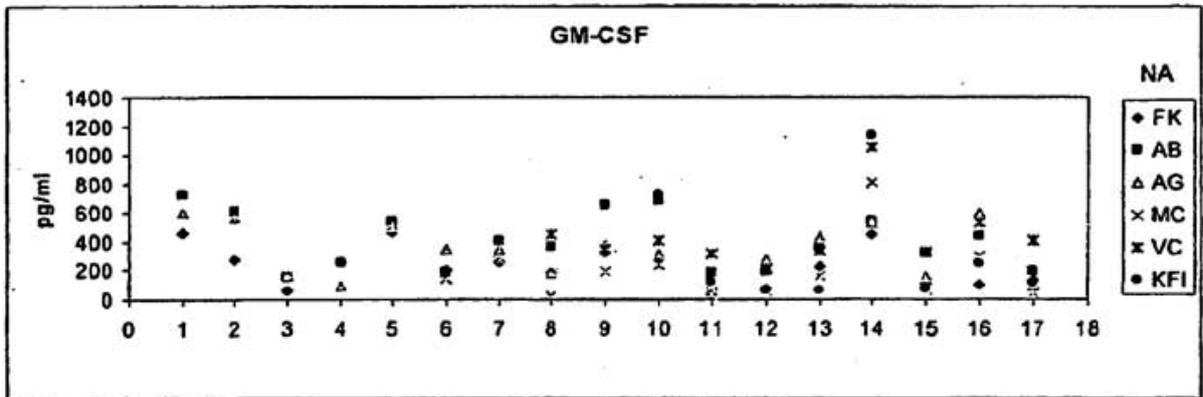
intervalo de detección: 3.1-2250 pg/ml

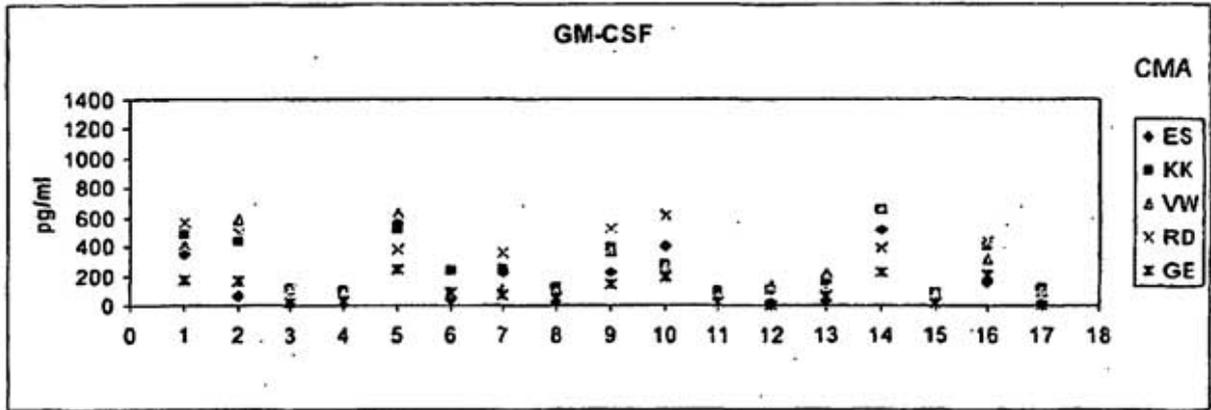


intervalo de detección: 2.9-2100 pg/ml

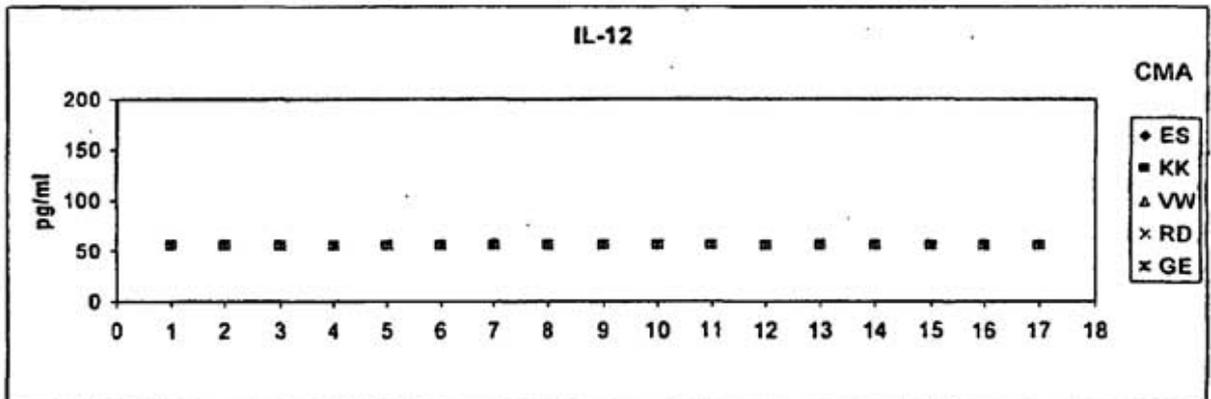
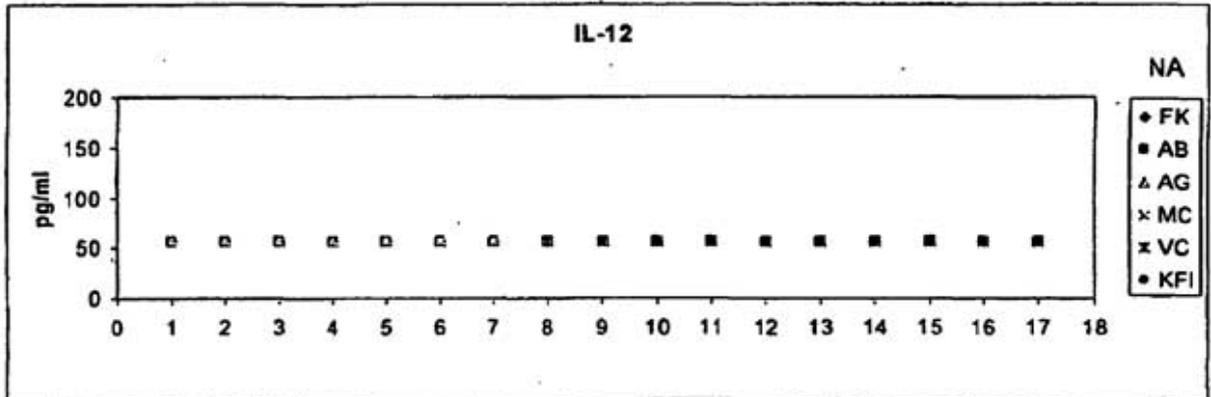


intervalo de detección: 5.3-3900 pg/ml

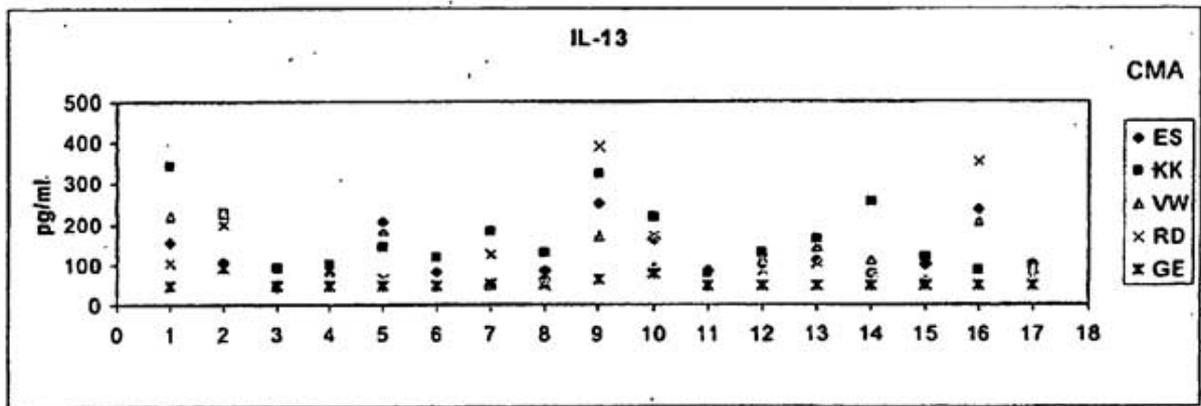
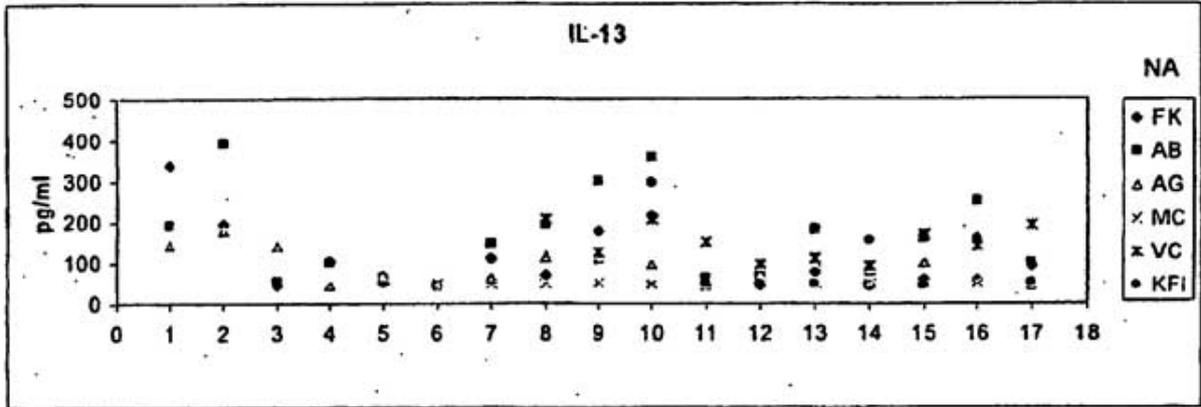




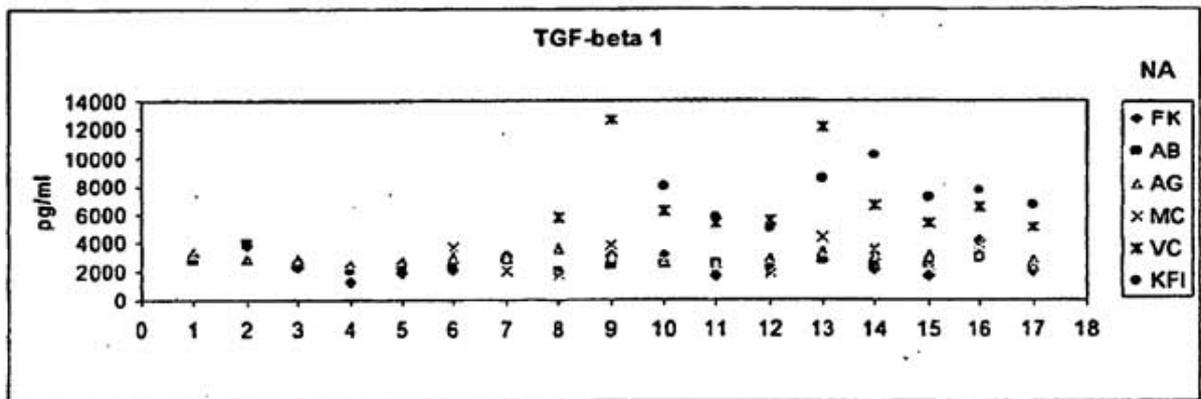
intervalo de detección: 3.3-2400 pg/ml

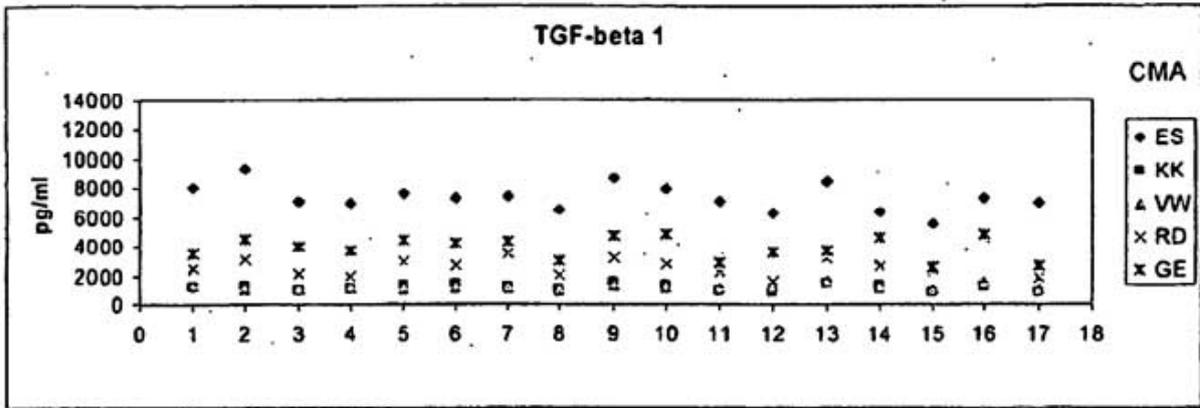


intervalo de detección: 57-41500 pg/ml

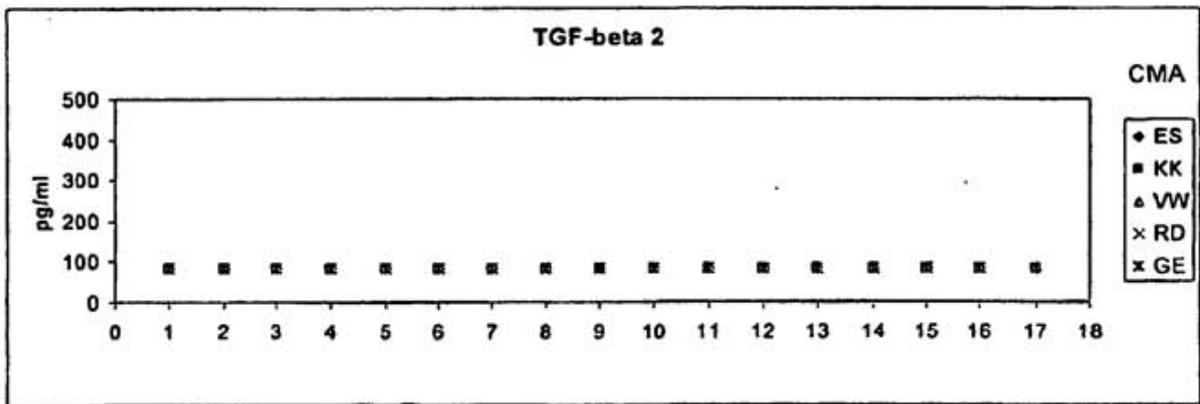
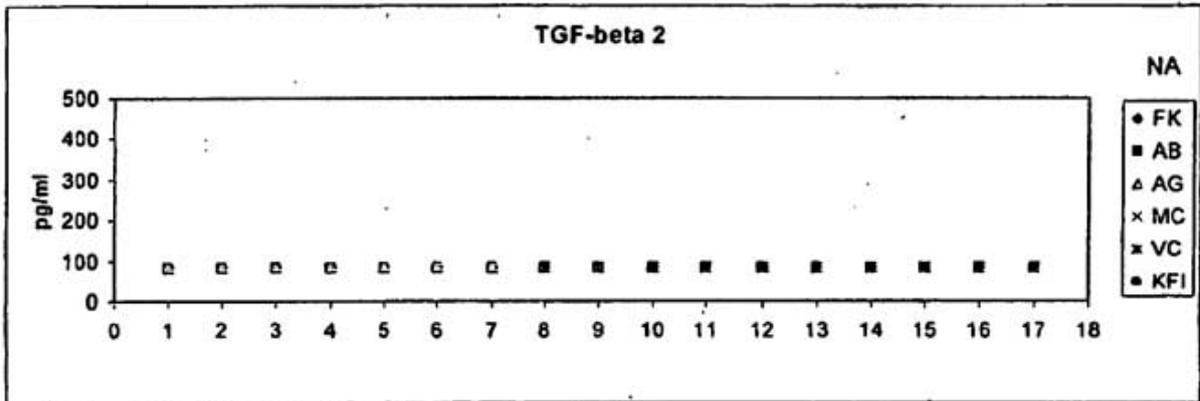


intervalo de detección: 47-34500 pg/ml

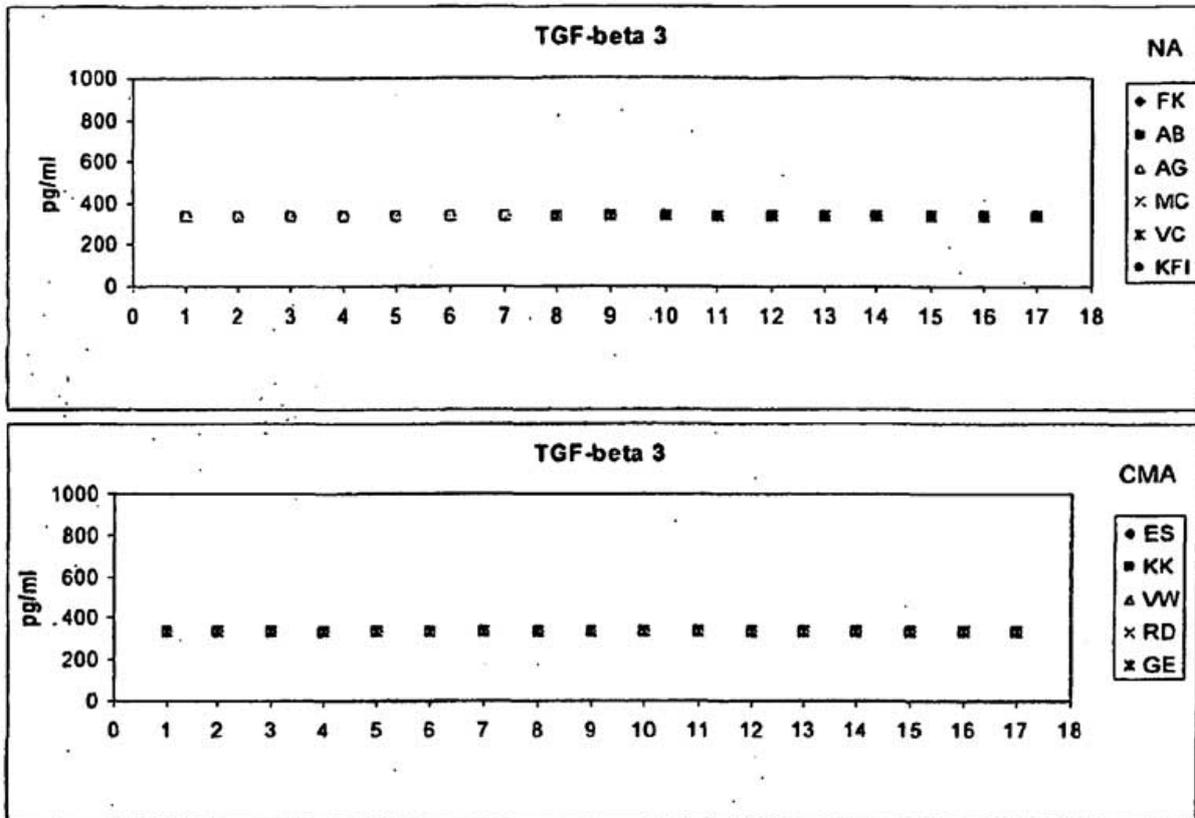




intervalo de detección: 33.3-24300 pg/ml



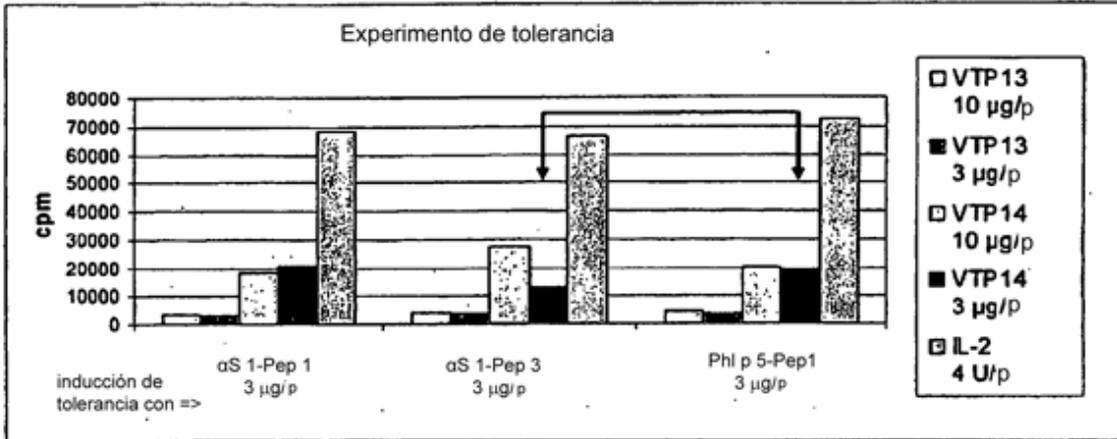
intervalo de detección: 17.1-12500 pg/ml



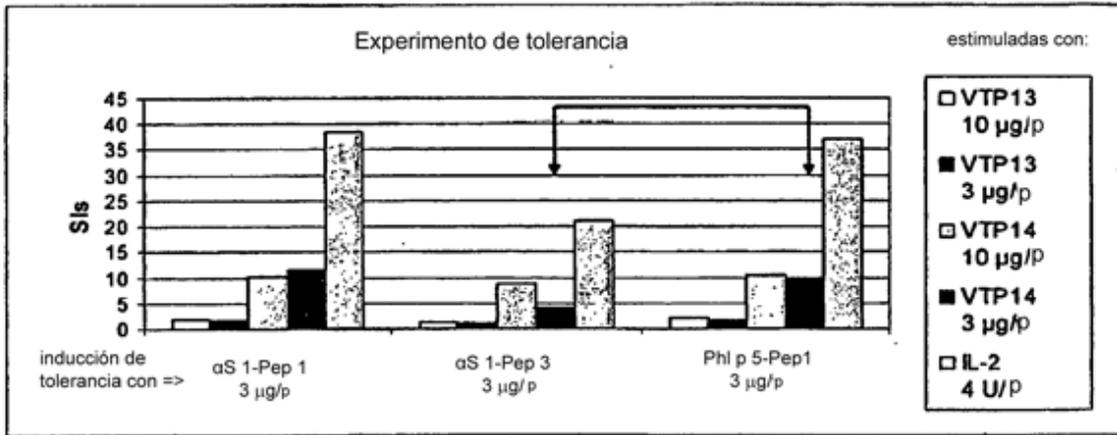
intervalo de detección: 68.3-49850 pg/ml

Figura 6:

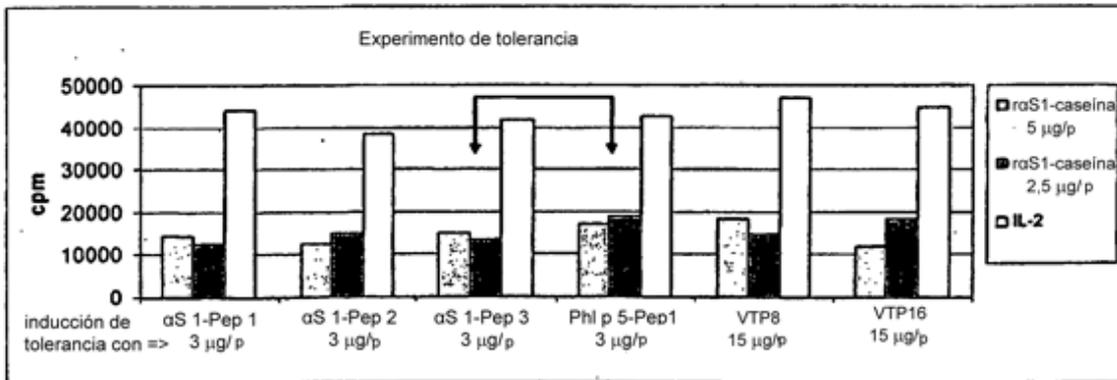
a



b



c



d

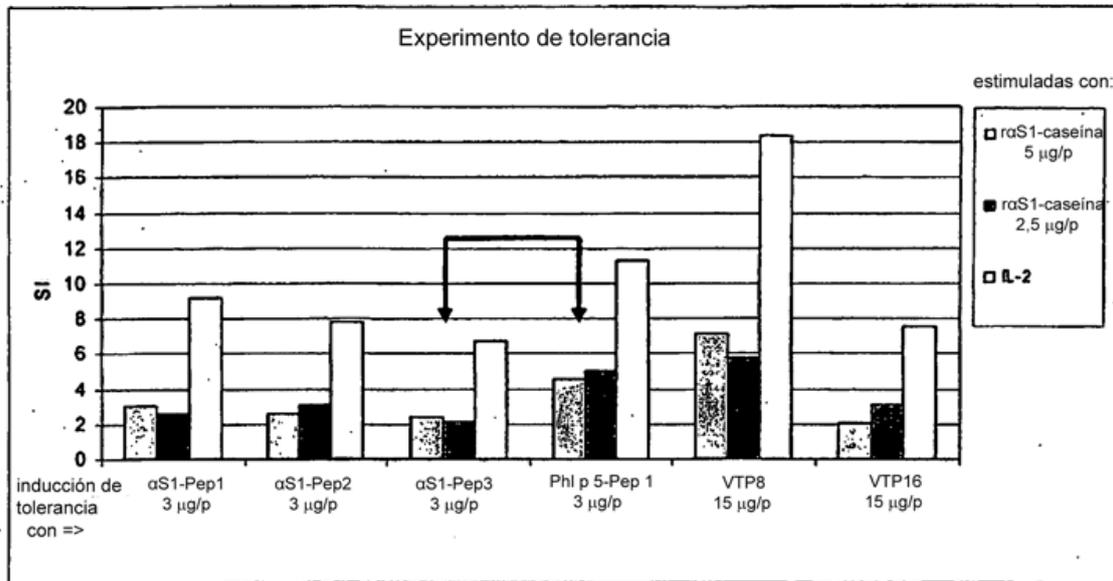


Figura 7:

estimuladas con	UCO				Phi p5-Pep1, 3 µg/p				αSI-Pep 4, 3 µg/p				VTP 11, 15 µg/p			
	cpm	cpm	media	SI	cpm	cpm	media	SI	cpm	cpm	media	SI	cpm	cpm	media	SI
UCO	15631	12705	20391	18242	11263	13457	12848	12822	17694	14608	16151	16151	7007	6020	6514	
VTP14	28468	43062	38634	37055	38430	45751	41730	41970		16162	25428	20794	23156	28251	21648	3.6
VTP14		3886	7349	5618	3282	2244	1482	2336		2790	4703	3747	3881	2563	3222	0.5
VTP1	11394	10441	4624	8886	4708	3278	4898	4295	6381	6304	6226	6304	459	428	387	425
VTP1	4201	5674	7161	5679	6315	6342	6409	6356	8231	8478	3154	6621	315	258	195	256
IL-2	16371	12600		14486	14153	17606	12214	14724	12704	19463	11433	14533	6606	6118	7362	1.1

← inducción de tolerancia con

estimuladas con	VTP 15, 15 µg/p				VTP 14, 15 µg/p				VTP 3, 15 µg/p			
	cpm	cpm	media	SI	cpm	cpm	media	SI	cpm	cpm	media	SI
UCO	10998	10701	10860		18997	12220	14609		13059	22208	17634	
VTP14	48454	38437	53222	4.2	40639	38430	36504	39191	11472	28636	21940	20016
VTP14	4039	2676	4685	0.4	6380	2904	4642	0.3	1576	3939	2769	0.2
VTP1	1283	2082	1683	0.2	243	176	138	185	338	396	390	375
VTP1	719	487	7467	0.3	143	187	3080	1137	227	400	2750	1126
IL-2	14646	11771	14298	1.3	14338	10984	15100	13473	12402	15314	20180	16965

← inducción de tolerancia con

Figura 8:

Puntuación iónica	Péptidos identificados dentro del hidrolizado Z0002	Puntuación de hidrofobicidad	Puntuación de amargor
65	HQPHQLPPT	-1,67	1414
63	HQPHQLPP	-1,78	1522
61	YFPGPIP	-0,48	2107
56	PFPGPPI	0,07	2300
53	YFPGPIP	-0,10	2371
50	PFPGPPIP	-0,38	2011
46	PFPGPIH	-0,16	1997
46	PFPGPIPNSLPQ + Desamidación(NQ)	-0,43	1756
45	YFPGPI	0,11	2336
43	FPGPIP	-0,20	1924
40	MHQPHQLPPT + Oxidación (M)	-1,35	1404
39	PFPGPIPNSLP + Desamidación(NQ)	-0,15	1925
39	SWMHQPHQLPPT + Oxidación (M); Oxidación (HW)	-1,27	1422
35	HRGHPIG + Oxidación (HW)	-1,26	1046
32	NILNSE + Desamidación(NQ)	-0,50	993
31	HKPHFCQPL + Carbamidometilo (C)	-0,88	1412
30	CKQGHGIPGNPGHGLP + Desamidación (NQ); Oxidación (HW)	-1,02	1014
29	NLRVPKP + Desamidación(NQ)	-1,01	1653
29	PLTGWRFV + Oxidación (HW); Fosfo (STY)	0,34	1694
29	FSTQERSGAP	-1,12	770
28	HTDGTP	-1,68	757
27	PGEVEP	-1,07	1338
27	MHQPHQLPPT + Oxidación (HW)	-1,35	1404
26	QRNGQP + Desamidación (NQ)	-2,83	523
26	PMGPAGLP	0,24	1539
26	LMPGPLR	0,20	1730
26	PAEDDNNVATAPSTE + Desamidación(NQ); Fosfo (STY)	-1,27	762
25	ETPFFLT	-0,09	1366
24	NQATRP + Desamidación(NQ)	-2,00	735
24	PVFPPIG	0,14	1898
24	PSQTLSLTCSVS	0,38	841
24	ALEWLGSIDTGGNT + Oxidación (HW); Fosfo (STY)	-0,06	967
23	PLPCSAP	0,36	1579
23	PSGPQCL	-0,23	1086
23	PHQLPPT	-1,25	1718
23	HKAAADKVSA	-0,63	884

23	PGPKLVKPSQ +Desamidación (NQ)	-0,93	1491
23	LPLLP	1,64	2500
23	LPLIP	1,78	2610
22	MSINT + Oxidación (M)	0,28	948
22	FSLNT	0,32	1108
22	SLCPQ + Fosfo (STY)	0,08	996
22	LMELPE	0,15	1643
22	LLGRRAGPP	0,02	1469
21	EMPVPL + Oxidación (M)	0,53	1867
21	RRITPP	-2,27	1263
21	PRDGAES	-1,79	744
21	PRDYT + Fosfo (STY)	-2,32	1440
21	PSQTLSTCTVSN + Desamidación(NQ)	0,09	806
21	QSWMHQPHQPLPPT + Desamidación(NQ)	-1,43	1313
21	FPGPI	0,74	2172
21	MPGPL + Oxidación (M)	0,42	1792
20	NIPMT + Desamidación(NQ)	0,12	1464
20	PFSSA + Fosfo (STY)	0,17	1013
20	PSSNILF + Desamidación(NQ)	0,63	1533
20	TGLWPINT + Oxidación (HW); Fosfo (STY)	0,06	1485
20	QWGNHSCLSSET + Desamidación(NQ)	-1,26	625
20	PPVPGAMLLLLLGLL + Oxidación (M)	1,93	1901
19	DEENP + Desamidación(NQ)	-3,12	850
19	HFIQML + Oxidación (M)	1,05	1623
19	DEDDLPP	-1,20	1531
19	HFNHIVEPSGPA	-0,38	1238
19	LLDKMQGYVKEA	-0,38	1285
19	YVSWFQQIPGSA + Desamidación (NQ); Oxidación (HW); Fosfo (STY)	0,04	1368
19	PFPPI	0,35	2247
18	PQDPAS	-1,54	1296
18	YFPIF + Fosfo (STY)	0,93	2730
18	PQRGPVPGA	-0,84	1212
18	SQLANLTQ + Fosfo (STY)	-0,33	730
18	PSRFSASRSG	-0,96	762
18	PSRFSKDA	-1,17	889
18	SVPPYRHGVSVV + Fosfo (STY)	0,22	1348
18	PAQRQRGLYQAD + Desamidación(NQ)	-1,58	1053
18	ICRIQC'CAHP	-0,74	1317
17	LGPQNA + Desamidación(NQ)	-0,57	943

17	KCQPPK + Desamidación(NQ)	-2,00	1357
17	RIPSGCP	-0,27	1283
17	ENMGGRP + Oxidación (M)	-1,71	741
17	DRVKNF	-1,40	1183
17	PNLWSAP	-0,40	1631
17	AGEEPAGR	-1,29	739
17	PNGVLEY	-0,33	1449
17	TRKLACL + Fosfo (STY)	0,40	1177
17	QGKCGPPPTI	-0,67	1267
17	PRHLHALVGP	-0,09	1423
17	KTGRAWYNPALK +Desamidación(NQ); Fosfo (STY)	-1,11	1378
17	EAQTLACPKEPCRECQ	-0,93	828
17	LMPGPL	0,98	1897
17	SDIPNPI	-0,29	1679
16	ASAPK +Sulfatación (S)	-0,54	1124
16	LITGLP	1,57	1812
16	LLASLP	1,80	1775
16	LRDLP	-0,40	1746
16	SSNNI +Desamidación(NQ); Sulfatación (S)	-0,82	606
16	PGLQES	-1,00	922
16	PNEDRT	-2,88	812
16	SATVGFGS + Fosfo (STY)	0,71	699
16	DHKNVRQ	-2,56	693
16	DHQQKKL	-2,53	894
16	PGEALTDPLP	-0,35	1496
16	TARGFCQIQV + Fosfo (STY)	0,32	901
16	PRPGAPGALSPSYDGGHLG	-0,59	1132
15	PSDPHT	-1,90	1127
15	PGQSGKP	-1,74	954
15	PTGVNAN	-0,53	780
15	VLMPP + Oxidación (M)	0,53	1773
15	NNPSPA	-1,43	861
15	PVTAGASV	1,06	993
15	PVQCDGP +Desamidación(NQ)	-0,56	1053
15	KPSQTLS	-1,07	994
15	HLARVPA	0,33	1346
15	PEIAGEW	-0,51	1489
15	ELALPTPQE	-0,56	1361
15	PLTGLWPIN +Desamidación(NQ); Oxidación(HW)	0,38	1831
15	EVLNNNPHI	-0,70	1191

15	DHKKFFQM + Desamidación(NQ)	-1,31	1318
15	QLLSNQILLP	0,68	1510
15	NGVATGTKIVTKGACI	0,56	943
15	EIAAEPTSSQIIQDKV + Desamidación(NQ)	-0,25	1134
15	LSLTCTVSGFSLSNYGV	0,88	1011
15	GGIPKTK	-0,91	1290
15	IEDFKA	-0,30	1490
14	PKPRL	-1,56	1978
14	PSSNM + Fosfo (STY)	-0,96	798
14	QDPYR	-2,88	1332
14	QHHCVP	-0,80	868
14	HFSWE + Oxidación(HW)	-1,12	1348
14	HFDDTS	-1,48	785
14	PFSTVVP	0,93	1679
14	WLPQGH + Oxidación (HW)	-0,97	1407
14	RDPLPR	-1,98	1610
14	PASIRCL	0,81	1359
14	PKGESKD	-2,51	964
14	PPVPLTAP	0,34	1970
14	IPGMGPLP + Oxidación (M)	0,58	1819
14	WVGRPIP	-0,04	1947
14	SPLFLGK + Fosfo (STY)	0,53	1664
14	NPHHSQW + Desamidación(NQ); Oxidación(HW)	-2,39	936
14	PPAPAEPRSA + Fosfo (STY)	-0,98	1399
14	RSTGVPSRFS + Fosfo (STY)	-0,71	898
14	IPGSEKAALGY + Fosfo (STY)	0,00	1312
14	RINVAVTRAR + Fosfo (STY)	-0,12	1043
14	QIRTCRSTGSWS + Desamidación(NQ); Fosfo (STY)	-0,88	694
14	DMILDL + Oxidación (M)	1,17	1698
13	PPCGT + Fosfo (STY)	-0,36	1136
13	PGGSTP + Fosfo (STY)	-0,92	953
13	PHDQF	-1,80	1242
13	VNISGGSF	0,70	923
13	PQRSLVSV	0,13	1141
13	HSSLPSST + Fosfo (STY)	-0,61	768
13	SKALHFE + Fosfo (STY)	-0,43	1199
13	PLQLQVEAP + Desamidación(NQ)	-0,01	1428
13	PDRFSGSRCG	-1,12	735
13	HMFMYFLR + Oxidación (M)	0,53	1803

13	IDGEWTSAPPI	-0,20	1498
13	ACHPHPHLSF + Carbamidometilo (C)	-0,27	1258
13	PGIPP	-0,14	2166
13	IPNPI	0,46	2234
13	IEVEL	1,10	1636
13	NQPMLP + Oxidación (M)	-0,75	1475
13	LEMLP + Oxidación (M)	0,47	1988
13	VEMPPE + Oxidación (M)	-0,68	1555
13	RRQDVR	-2,72	720
12	PQNAA	-1,00	794
12	PQCAE	-0,86	760
12	PLQSE	-1,12	1106
12	QPGSQQ	-2,22	393
12	PNDTPT	-1,93	1108
12	SEMLAP	0,27	1277
12	TDGTSLP	-0,56	929
12	TECQLP	-0,50	988
12	PQRPAR	-2,32	1222
12	VGGYQMS	-0,04	829
12	PVAKPSF	0,13	1693
12	KFPPSDT	-1,33	1487
12	KRPEHE	-3,37	1075
12	IQKYKSLPKMS + Oxidación (M)	-0,86	1515
12	PHGALQSE	-0,93	845
12	LLEMQQT	-0,24	990
11	DQGAHV + Desamidación (NQ): Oxidación (HW)	-0,77	560
11	GSGAGQPV	-0,14	623
11	SSDRFS	-1,27	673
11	IIPMGIL	2,46	2179
11	TPGGPGGPE	-1,18	983
11	VSVGLQTS	0,75	778
11	PLNMVPK	-0,10	1734
11	HFSWEV	-0,23	1405
11	NPHHLRA + Oxidación (HW)	-1,49	1070
11	SGVPRHFS	-0,54	1034
11	PVWSSAYLPQC + Carbamidometilo (C)	0,16	1448
11	VVGGLLI	2,81	1599
11	VAAALLL	3,00	1591
11	QCKFLP	0,02	1515

11	EVANPLL	0,71	1489
11	DALSSVQES	-0,34	661
11	DIMITGLSK	0,60	1353
11	DTVPLDGSSTLTFPSIQMA + Oxidación (M)	0,28	1211
10	SNSVD + Fosfo (STY)	-0,88	460
10	PPQEG	-1,30	1390
10	LPNPED	-1,65	1457
10	GPIYGMT	0,29	1457
10	QPGQFTL	-0,44	1133
10	PGRKAVHV	-0,43	1183
10	PSLLTPQGP	-0,29	1453
10	GPPAQEQETHN	-1,63	725
10	SQRCINTHGSYKCL	-0,66	814
10	QDVVQ	0,12	1062
9	SKSTAA	-0,43	580
9	QDPDE	-3,12	830
9	AGEEPAG	-0,83	740
9	VNHANT	-0,82	557
9	HRTPCA	-0,95	837
9	VSWVRQ + Oxidación (HW)	-0,22	1175
9	EEFPLGP	-0,57	1630
8	GNNDPAG	-1,59	553
8	PVDGHAL	0,16	1214
8	WGQGLR	-0,98	1008
8	PQKAVPY	-0,84	1704
8	PQALASLC	0,98	1108
8	YPRKEI	-1,72	1873
8	TVMFPPQ	0,21	1603
8	VLGSLLPGEF	0,73	1478
8	KIAQMLPGVG	0,64	1313
8	PIQYVLSRY	-0,06	1790
8	LFLP	1,10	2520
8	IPIP	1,45	2795
8	IPLP	1,275	2658
8	LPIP	1,28	2658
8	DFLP	0,38	2058
8	DFIP	0,55	2195
8	DAPFR	-1,00	1454
8	WGPTPLP	-0,43	1960

7	LLLVI	4,02	2384
7	PQGKSD	-2,28	767
7	PRPFSPIST	-0,97	1633
7	QREHAASVP	-1,03	832
7	PDRFSGTKS	-1,49	951
7	HLAPAP	0,17	1603
7	DFPEAR	-1,42	1303
6	NGCVTGH	-0,21	374
6	PGTLAHSGVYR	-0,28	1095
6	LDFP	0,38	2058
6	VSMRL	0,92	1236
6	QANLWCLSRCA	0,27	905
5	PGSPGLV	0,46	1341
5	LPPT	-0,03	2025
5	MKTP + Oxidación (M)	-1,08	1465
5	DFILLN	1,32	1832
5	FDLPGVS	0,64	1423
5	PSNVLSPTP	-0,29	1387
4	HLPLP	0,24	2116
4	GRKDT	-2,60	642
4	TQPINQATGGPK	-1,13	926
3	CMKVSISLTVG	1,32	1099
3	YAVGWVRQAPG	-0,05	1269
3	QTAVL	1,12	1036
3	EIPLP	0,32	2236
3	LEPLP	0,18	2126
3	IQSLPGIP	0,61	1693
3	QQKYPEKQDT	-2,89	972
2	MGSVTPEDT	-0,57	847
2	HQPLPPTVM + Oxidación (M)	-0,26	1568
2	DGAHRNDDDET	-2,45	456
2	DILTVT	1,27	1417
1	LRLFPQIKG	0,11	1690
1	HRGMYRCQV + Carbamidometilo (C)	-0,98	858
1	TNTRQGLQIEVTV	-0,36	829
1	DSELPT	-1,05	1102
1	LPPLTIQ	0,67	1913
<1	DLEQGPAP	-1,06	1173