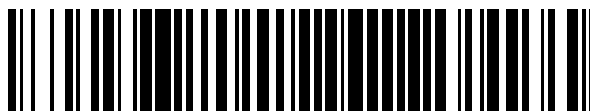


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 237**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)
A23C 21/02 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2007 E 07862429 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2124603**

54 Título: **Hidrolizados de proteínas de la leche con potencial inmunogénico reducido**

30 Prioridad:

20.12.2006 US 875967 P

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

18.02.2015

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1, P.O. Box 17
1001 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

KUMAR, MANOJ y
WONG, DAVID

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 529 237 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

Hidrolizados de proteínas de la leche con potencial inmunogénico reducido

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a composiciones que contienen proteínas de la leche y/o proteínas del suero de la leche hidrolizadas y a métodos para prepararlas. También se dan a conocer hidrolizados proteolíticos de tales proteínas que tienen potencial inmunogénico reducido para su uso en aplicaciones en las que existe riesgo de respuesta inmunológica indeseable a las proteínas.

Antecedentes

La leche es un producto usado ampliamente no sólo como bebida nutritiva en su forma líquida, sino también como base para otros numerosos productos tales como helado, yogur, mantequilla, nata y queso. Además, la leche y los componentes de la misma se usan ampliamente como componentes nutricionales y funcionales en muchos productos alimenticios.

El suero de la leche es un subproducto de la producción de queso. El suero de la leche se ha convertido en un componente o aditivo alimenticio útil para diversos fines. Un procedimiento típico de producción de queso puede producir sólo aproximadamente 10 libras de queso, pero 90 libras de suero de la leche por cada 100 libras de leche procesada. El suero de la leche es rico en lactosa, un azúcar de la leche que se produce de manera natural, y también contiene varias proteínas que no coagulan ni precipitan durante el procedimiento de elaboración del queso, sino que más bien permanecen solubles. Se sabe que las proteínas del suero de la leche son altamente nutritivas y por tanto pueden ser valiosas, pero están presentes en una disolución acuosa diluida de sales, lactosa, proteínas y algunos lípidos.

Por su naturaleza diluida, en algunos lugares el suero de la leche todavía se trata frecuentemente como un producto de desecho o efluente, a pesar del gasto de su eliminación. Cuando es económicamente viable, el suero de la leche frecuentemente se seca por pulverización o se procesa adicionalmente para separar las proteínas y/o la lactosa del agua y entre sí.

El suero de la leche o diversos componentes del mismo, puede añadirse a una gran variedad de alimentos procesados para proporcionar excelentes propiedades nutricionales y funcionales tanto para el que procesa como para el consumidor.

Las proteínas del suero de la leche pueden comprender aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche totales. La composición del suero de la leche que se deriva tras "cuajar" durante la producción de queso incluye proteínas, junto con la lactosa, grasa y ceniza (2-5%). Lactoalbúmina y lactoglobulina son dos proteínas de la leche prominentes en el suero de la leche. Se ha notificado que cada una de estas proteínas, así como otras proteínas que se encuentran en la leche, tiene potencial inmunogénico, por ejemplo como alérgenos. Debido a que estas proteínas son inmunógenos potenciales o incluso alérgenos, determinados consumidores pueden evitar el uso de productos alimenticios y/o cosméticos que contienen leche, suero de la leche o componentes de los mismos, por ejemplo las proteínas del suero de la leche lactoalbúmina y lactoglobulina. En algunas circunstancias, el profesional médico puede aconsejar a determinados consumidores que eviten productos que contienen proteínas de la leche o del suero de la leche. Por tanto, existe una necesidad continua de reducir el potencial inmunogénico de las proteínas de la leche y proteínas del suero de la leche.

Sumario

En varios de sus diversos aspectos, se proporcionan composiciones y métodos para usar composiciones con un contenido en proteínas de la leche y/o proteínas del suero de la leche hidrolizadas que se hidrolizan con una o más enzimas proteolíticas para reducir el riesgo de respuesta inmunológica, particularmente respuesta inmunológica adversa, a las proteínas, en una persona predispuesta a tal respuesta.

En un aspecto, se proporcionan hidrolizados que comprenden al menos una proteína de la leche hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que escinde preferencialmente en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico y que deja uno o más determinantes inmunológicos presentes en la proteína, comprendiendo el hidrolizado al menos una beta lactoglobulina hidrolizada en la región entre los aminoácidos 55-98, teniendo el hidrolizado inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína y en el que el hidrolizado está enriquecido en al menos el péptido AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), en el que al menos una enzima proteolítica es una endopeptidasa y en el que la endopeptidasa no es una que tiene la secuencia de aminoácidos

```

          5      10      15      20      25      30
1  S V I G S D D R T R V T N T A Y P Y R A I V H I S S S I G
31 S C T G W M I G P K T V A T A G H C I Y D T S S G S F A G T
61 A T V S P G R N G T S Y P Y G S V K S T R V F I P S G W R S
91 G N T N Y D Y G A I E L S E P I G N T V G Y F G Y S Y T T S
121 S L V G T T V T I S G Y P G D K T A G T Q W Q H S G P I A I
151 S E T Y K L Q Y A M D T Y G G Q S G S P V F E Q S S S R T N
181 C S G P C S L A V H T N G V Y G G S S Y N R G T R I T K E V
211 F D N L T N W K N S A Q

```

En una realización, la endopeptidasa escinde en el lado carboxilo terminal de un residuo de ácido glutámico o un residuo de ácido aspártico. En una realización, la endopeptidasa es de un *Streptomyces*, *Staphylococcus* o un *Bacillus*.

En otra realización de este aspecto, la proteína a partir de la cual se produce el hidrolizado es una proteína del suero de la leche, o comprende al menos una de una lactoalbúmina o una lactoglobulina, tal como una alfa lactoalbúmina o una beta lactoglobulina. En otro aspecto, se proporcionan hidrolizados según la reivindicación 4.

El hidrolizado está enriquecido preferiblemente en péptidos que terminan en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico, en comparación con la proteína no hidrolizada. En una realización, el hidrolizado está enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, está enriquecido en uno o más de los péptidos ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14) o TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15) y/o una o más de DQAME (SEQ ID NO: 16), GIHAQQKE (SEQ ID NO: 17), VLNE (SEQ ID NO: 18), VFGKE (SEQ ID NO: 19), RLHSMKE (SEQ ID NO: 20), DIQME (SEQ ID NO: 21), KHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 22), RPKHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 23), PMIGVNQE (SEQ ID NO: 24), GIHAQQKEPMEGVNQE (SEQ ID NO: 25), RYLGYLE (SEQ ID NO: 26), LAYFYPE (SEQ ID NO: 27), FVAPFPE (SEQ ID NO: 28), KTTMPLW (SEQ ID NO: 29), LFRQFYQLD (SEQ ID NO: 30), FFVAPFPE (SEQ ID NO: 31), NLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 32) o ENLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 33).

En el presente documento también se proporcionan hidrolizados que contienen proteínas del suero de la leche enriquecidos en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), preferiblemente también enriquecidos en uno o más de los péptidos: ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15). Los hidrolizados de proteínas del suero de la leche tienen inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.

En una realización, el hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche está preferencialmente enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). El hidrolizado de este aspecto se produce a través del uso de una endopeptidasa que escinde preferencialmente en el lado carboxilo terminal de un residuo de ácido glutámico o un residuo de ácido aspártico. En una realización, la endopeptidasa no requiere un ión metálico para su actividad.

En el presente documento también se proporcionan componentes alimenticios que comprenden un hidrolizado de proteínas del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), preferiblemente enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). Los componentes alimenticios proporcionados tienen inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.

En el presente documento también se proporcionan productos alimenticios fabricados que comprenden un hidrolizado de proteínas del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), preferiblemente enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4). Los productos alimenticios fabricados tienen inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.

Los ejemplos de tales productos alimenticios fabricados proporcionados según el presente documento incluyen preparados para lactantes, bebidas para deportistas, productos que contienen queso, complementos proteicos, complementos nutricionales o productos sustitutos de comida.

También se proporcionan productos no alimenticios que comprenden cualquiera de los hidrolizados descritos en el presente documento. En diversas realizaciones, el producto no alimenticio es un cosmético, una loción o un limpiador para su uso en piel humana. En una realización, el producto no alimenticio comprende un hidrolizado de proteínas del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), preferiblemente enriquecido en uno

o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), y tiene inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche. También se proporciona un producto no alimenticio según la reivindicación 23.

- 5 También se proporcionan composiciones que comprenden al menos dos hidrolizados tal como se describe en el presente documento, en las que cada hidrolizado se produce con al menos una enzima diferente que tiene una especificidad diferente, o cada hidrolizado se produce con la misma enzima a partir de una proteína o mezcla de proteínas diferente. En otro aspecto, se proporciona el uso según la reivindicación 28.
- 10 El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada y ejemplos tienen la finalidad de ilustrar diversas realizaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 15 Las figuras adjuntas sirven para explicar o ilustrar adicionalmente diversos aspectos de las composiciones o métodos descritos más completamente en el presente documento y ejemplificados a continuación.

Figura 1: Análisis de SDS-PAGE que muestra el transcurso de tiempo de la proteólisis de proteínas del suero de la leche durante 20 horas de tratamiento con S-Glu o L-Glu. Carriles (de izquierda a derecha) 1, 2, 3: tratamiento con S-Glu durante 2, 4 y 20 h, respectivamente; carril 4: control de suero de la leche; carriles 5, 6, 7: tratamiento con L-Endo durante 20, 4 y 2 h, respectivamente; carril 8: control de suero de la leche; carriles 9-10: marcadores de PM (proteínas patrón).

Figura 2: Análisis de espectrometría de masas representativo de proteínas del suero de la leche digeridas por endopeptidasas. La muestra se tomó a las 20 h a partir de muestra digerida con L-Glu. El panel A muestra la detección de especies de diversos PM en la muestra. El panel B muestra la abundancia relativa de los productos de degradación prevalentes.

Figura 3: Análisis de espectrometría de masas representativo de proteínas del suero de la leche digeridas por endopeptidasas. La muestra se tomó a las 20 h a partir de muestra digerida con S-Glu. El panel A muestra la detección de especies de diversos PM en la muestra. El panel B muestra la abundancia relativa de los productos de degradación prevalentes.

Figura 4: Análisis de SDS-PAGE de leche desnatada I, hidrólisis por endopeptidasa Glu: carriles (de izquierda a derecha): 1, 2, 3: digestión con S-Endo a t = 2, 4 y 20 h, respectivamente; carril 5: control de leche desnatada I; carriles 7, 8, 9: digestión con L-Endo a t= 2, 4, 20 h; carril 10: marcador de PM.

Figura 5: Análisis de SDS-PAGE de leche desnatada II, hidrólisis por endopeptidasa Glu: carriles (de izquierda a derecha): 1, 2, 3: digestión con S-Endo a t= 2, 4 y 20 h, respectivamente; carril 5: control de leche desnatada II; carriles 7, 8, 9: digestión con L-Endo a t=2, 4, 20 h; carril 10: marcador de PM.

Figura 6: Análisis de SDS-PAGE de caseína, hidrólisis por Endo-Glu: carriles (de izquierda a derecha): 1, marcador de PM; carriles 2, 3, 4: digestión con S-Endo a t= 2, 4, y 20 h respectivamente; carril 5: marcador; carriles 6, 7, 8: digestión con L-Endo a t=2, 4 y 20 h respectivamente; carril 10: caseína C-5890 de Sigma.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Acrónimos y abreviaturas:

50 cP: centiPoise; unidades de viscosidad dinámica;

DFP: fluorofosfato de diisopropilo;

55 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético;

Endo-Glu: endopeptidasa que escinde junto a un residuo de Glu en un polipéptido, escindiendo preferiblemente en el lado carboxilo terminal del residuo de Glu; también denominada en ocasiones en el presente documento Endo-Glu C en la que la escisión es definitivamente en el lado carboxilo terminal de un residuo de Glu;

60 BPF: Buena(s) práctica(s) de fabricación;

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

h: hora(s);

65

UI: Unidades internacionales;

CL/EM: cromatografía de líquidos/espectrometría de masas acopladas;

5 CL/EM/EM: análisis de cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem;

L-Endo: una endopeptidasa Glu-C de *Bacillus licheniformis*; también denominada en ocasiones en el presente documento "L-Glu" o "L-MPR"

10 EM: espectrometría de masas, usada en ocasiones de manera genérica para englobar análisis acoplados de CL/EM y CL/EM/EM;

PM: peso molecular;

15 PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo;

S-Endo: endopeptidasa Glu-C de *Bacillus subtilis*; también denominada en ocasiones en el presente documento "S-Glu" o "S-MPR"

20 SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio;

Suc-AAPEpNA: succinil-Ala-Ala-Pro-Glu-p-nitroanilida

t: tiempo;

25 TFA: ácido trifluoroacético;

PT: proteína total - por ejemplo proteína soluble total en una disolución de sobrenadante;

30 p/p: peso por peso (o peso con respecto a peso), habitualmente describe una base de determinación de un porcentaje; usado por ejemplo para expresar concentraciones de componentes añadidos;

p/v: peso por volumen (o peso con respecto a volumen), una base alternativa para determinar un porcentaje; usado por ejemplo para expresar concentraciones de componentes añadidos.

35 *Definiciones:*

Tal como se usa en el presente documento, "hidrolizado de proteína" se refiere al producto resultante del tratamiento de la proteína con una enzima proteolítica. El grado de escisión proteolítica de la proteína puede oscilar entre
40 mínimo (por ejemplo escisión de un único enlace peptídico en una única proteína) y amplio (por ejemplo escisión de todos los enlaces peptídicos presentes en la muestra que cumplen los requisitos de especificidad de la enzima proteolítica en uso) dependiendo de, por ejemplo, las condiciones del tratamiento, tal como la duración del tratamiento, la temperatura, la concentración y la pureza de la proteína, la concentración y la actividad de la enzima proteolítica.

45 Tal como se usa en el presente documento, "proteína de la leche" engloba cualquier proteína que se produce de manera natural en la secreción normal de la glándula mamaria de un mamífero hembra tras el parto, o productos derivados de la misma, tales como fracciones de la misma o componentes producidos a partir de ella o de la misma. La leche puede ser de cualquier especie de mamífero incluyendo pero sin limitarse a vaca, cabra, oveja, búfalo, yak, camello, llama, alpaca y ser humano. Se prefieren proteínas de la leche de esos mamíferos cuya leche se usa
50 comercial o ampliamente en diversas culturas y países. Debe observarse que "proteína de la leche" tal como se usa en el presente documento engloba tanto el singular como el plural de la palabra "proteína", por tanto, el término "proteína de la leche" puede hacer referencia a una sola proteína, o a cualquier mezcla de una o más proteínas, excepto que se indique otra cosa.

55 "Proteína del suero de la leche" engloba cualquier proteína que se encuentre en cualquier cantidad en el "suero de la leche", el subproducto líquido de la elaboración del queso que se separa de la cuajada. El suero de la leche resultante de la producción de muchos quesos es particularmente bajo en proteínas de la leche micelares, tales como caseínas, pero está relativamente enriquecido en proteínas solubles tales como alfa lactoalbúmina y beta lactoglobulina. Como con la "proteína de la leche" anterior, el término "proteína del suero de la leche" tal como se
60 usa en el presente documento engloba tanto el singular como el plural de la palabra "proteína", por tanto, el término "proteína del suero de la leche" también puede hacer referencia a una sola proteína, o a cualquier mezcla de una o más proteínas del suero de la leche, excepto que se indique lo contrario. El experto en la técnica entenderá que las proteínas del suero de la leche son de hecho una subclase de proteínas de la leche, y por tanto el término "proteína de la leche" puede incluir una o más proteínas del suero de la leche, excepto que se indique otra cosa en el presente
65 documento. Las composiciones de suero de la leche pueden incluir, por ejemplo, leche, nata y suero del queso. Se

puede usar suero de la leche derivado de cualquier tipo de queso. La proteína del suero de leche puede derivarse a partir de cualquier método tal como filtración, diálisis, evaporación y ósmosis inversa del suero del queso o mediante cualquier otro procedimiento que dé como resultado las proteínas normalmente descritas como "proteínas del suero de la leche".

5 Tal como se usa en el presente documento, un individuo "sensible" es un individuo predispuesto a tener una respuesta o reacción inmunitaria a la proteína en una forma no hidrolizada. Tal respuesta o reacción inmunitaria como resultado directo o indirecto del consumo de, o la exposición a, por ejemplo una o más proteínas de la leche y/o proteínas del suero de la leche, es una medida de la inmunogenicidad de esas proteínas. Tales proteínas
10 demostrarán poca a ninguna inmunogenicidad en un individuo que no está predispuesto a tener tal respuesta inmunitaria a la proteína, denominándose tal individuo en ocasiones en el presente documento "insensible" o "no sensible" a la una o más proteínas de leche y/o del suero de la leche. Preferiblemente, tal individuo no tendrá una reacción inmunitaria (respuesta inmunológica) significativa a o bien la exposición a o bien el consumo de la proteína.

15 Tal como se usa en el presente documento, "inmunogenicidad reducida" se refiere a cualquier reducción, disminución o mejora de una respuesta inmunológica medible. La medición de tal respuesta puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la respuesta puede medirse directa o indirectamente en una muestra biológica que comprende tejido, células o fluido, o similares, o cualquier combinación de los mismos de un individuo, o puede evaluarse en el individuo, o bien directa o bien indirectamente. Aunque en diversas realizaciones proporcionadas en
20 el presente documento bastará cualquier disminución (o reducción) matemática en tal respuesta, ya sea medida *in vitro* o *in vivo*, se prefiere que la disminución sea una más sustancial. Por supuesto, el experto en la técnica apreciará que los datos biológicos tales como una medición de una respuesta inmunológica, se someten a una variación potencialmente grande en un individuo, y de un individuo a otro. Por ejemplo, cuando la respuesta se presenta en un individuo "sensible", la respuesta inmunitaria se reduce preferiblemente de manera sustancial (por
25 ejemplo, en al menos aproximadamente el 50%, 60% o 70%, o incluso aproximadamente el 80% o más). Más preferiblemente, sólo se observan diferencias pequeñas o mínimas en tal individuo sensible con los hidrolizados de proteínas descritos en el presente documento, en comparación con una medida de la respuesta inmunológica de un individuo que no es sensible a una o más proteínas de la leche o del suero de la leche no tratadas. Esto es particularmente preferible cuando la respuesta inmunológica se considera adversa, por ejemplo una respuesta
30 alérgica. En tales casos, la disminución en la respuesta inmunológica del individuo sensible (o medida de la misma) puede ser al menos de aproximadamente el 85% a aproximadamente el 90%, más preferiblemente de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95% o incluso más. En algún caso, la respuesta de un individuo sensible a los hidrolizados de proteínas descritos en el presente documento no es significativamente diferente, de manera estadística, de la respuesta de un individuo que no es sensible. Aún en otros casos, la reducción en la
35 respuesta inmunológica puede ser muchas veces superior a la observada con la proteína no hidrolizada en un individuo "sensible". Por ejemplo, puede haber una reducción en la respuesta de aproximadamente 10 veces a 100 veces o incluso 1000 veces. Más preferiblemente, reducciones de aproximadamente 1000 veces a 10.000 veces o incluso 100.000 veces o reducciones mayores en una medición de una respuesta inmunológica de un individuo que consume o se expone a las composiciones de hidrolizados de proteínas tal como se da a conocer en el presente
40 documento, en comparación con la respuesta del individuo a las proteínas no modificadas.

Hidrolizados de proteínas

45 En un primer aspecto de varios, se proporcionan hidrolizados de proteínas que comprenden al menos una proteína de la leche hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que escinde preferencialmente en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico y que deja uno o más determinantes inmunológicos presentes en la proteína, comprendiendo el hidrolizado al menos una beta lactoglobulina hidrolizada en la región entre los aminoácidos 55-98, teniendo el hidrolizado inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína y en el que el hidrolizado está enriquecido en al menos el péptido AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), en el
50 que al menos una enzima proteolítica es una endopeptidasa y en el que la endopeptidasa es una que no tiene la secuencia de aminoácidos

```

      5      10      15      20      25      30
1 S V I G S D D R T R V T N T T A Y P Y R A I V H I S S S I G
31 S C T G W M I G P K T V A T A G H C I Y D T S S G S F A G T
61 A T V S P G R N G T S Y P Y G S V K S T R Y F I P S G W R S
91 G N T N Y D Y G A I E L S E P I G N T V G Y F G Y S Y T T S
121 S L V G T T V T I S G Y P G D K T A G T Q W Q H S G P I A I
151 S E T Y K L Q Y A M D T Y G G Q S G S P V F E Q S S S R T N
181 C S G P C S L A V H T N G V Y G G S S Y N R G T R I T K E V
211 F D N L T N W K N S A Q

```

55 En una realización, el hidrolizado tiene inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína en una forma no hidrolizada.

En determinadas realizaciones, el hidrolizado que contiene al menos una proteína de la leche se hidroliza con una endopeptidasa. La especificidad de la endopeptidasa es preferiblemente limitada. Tal como apreciará el experto en

la técnica, para su uso en productos alimenticios, la proteólisis amplia, no específica de proteínas puede conducir a propiedades indeseables, tales como sabores desagradables y/o pérdida de funcionalidad. La endopeptidasa para su uso en el presente documento por tanto escinde preferencialmente sólo en un grado limitado, por ejemplo teniendo especificidad por uno o más aminoácidos particulares, o tipos particulares de aminoácidos en cualquiera o ambos de los lados carboxilo terminal y amino terminal del sitio de escisión.

En determinadas realizaciones preferidas actualmente, la endopeptidasa tiene especificidad por el lado carboxilo terminal de residuos de aminoácidos hidrófilos, particularmente residuos de ácido glutámico o ácido aspártico. En una realización, la endopeptidasa escinde específicamente en el lado carboxilo terminal de residuos de ácido glutámico y/o ácido aspártico. En otra realización, la endopeptidasa escinde de manera exclusiva o casi exclusiva en el lado carboxilo terminal de residuos de ácido glutámico.

En determinadas realizaciones, la endopeptidasa es de la familia de las serina proteasas. Se inhibe, al menos parcialmente, si no por completo, por fluoruro de fenilmetilsulfonilo o fluorofosfato de diisopropilo. En determinadas realizaciones, la endopeptidasa es de un *Streptomyces*, *Staphylococcus* o un *Bacillus spp.* Alternativamente, la endopeptidasa puede ser de cualquier fuente que sea adecuada para su uso en la producción de alimento o pienso. En una realización, la endopeptidasa es de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus licheniformis*. En determinadas realizaciones, la endopeptidasa es una proteína de 23,6 kDa de *B. licheniformis*, cuya secuencia de aminoácidos se proporciona en la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory) (EMBL) con el número de registro EMBL P80057. Alternativamente, la endopeptidasa es una proteína de 23,9 kDa de *B. subtilis*, cuya secuencia de aminoácidos se proporciona en la base de datos del EMBL con el número de registro EMBL P39790. Aún en otra realización, la enzima es cualquier endopeptidasa que cumple los criterios establecidos anteriormente, con la condición de que no sea una endopeptidasa dada a conocer en la patente estadounidense n.º 5.866.357.

La fuente de leche para la proteína no se limita a ninguna especie de mamífero particular, y por tanto se contempla que pueda usarse en el presente documento leche de especies incluyendo pero sin limitarse a vaca, cabra, oveja, búfalo, caballo, camello, yak, llama, alpaca y seres humanos. En una realización, las proteínas de la leche se originan de una especie que es diferente a la del individuo que se expone a o consume la proteína de la leche. En otra realización, un individuo es sensible a proteínas de la leche de su propia especie. Por tanto, las proteínas de la leche pueden ser de la misma especie que el individuo. En tales realizaciones, las proteínas modificadas reducen la inmunogenicidad de la proteína de la leche en ese individuo. En una realización, el individuo (denominado en ocasiones en el presente documento "sujeto") es un ser humano, y la leche es de una especie animal no humana cuya leche se consume a menudo por seres humanos, por ejemplo, vaca, cabra, oveja o búfalo.

En determinadas realizaciones, la al menos una proteína de la leche es una proteína soluble, no micelar. En tales realizaciones, la proteína de la leche por tanto es preferiblemente distinta de caseína. En una realización, la proteína de la leche es una proteína soluble, por ejemplo una o más de las proteínas normalmente encontradas en el suero de la leche que resultan de la producción de cualquier queso producido a partir de cuajada.

En una realización particular, la proteína incluye al menos una lactoalbúmina o una lactoglobulina. Tal como apreciará el experto en la técnica, hay varias de tales proteínas que se han modificado en la leche de diversos mamíferos. Entre las proteínas del suero de la leche prevalentes están alfa lactoalbúmina y beta lactoglobulina, siendo adecuadas ambas para su uso en el presente documento. Debe entenderse que una proteína del suero de la leche normalmente no se aislará de otras proteínas del suero de la leche antes de su uso en el presente documento. Sin embargo, también se contempla en el presente documento el uso de tales proteínas de la leche aisladas o incluso purificadas.

Debido a la inmunogenicidad potencial de tales proteínas de la leche, tal como se comentó anteriormente, es deseable que la endopeptidasa escinda péptidos que pueden servir como determinantes inmunológicos (por ejemplo determinantes antigénicos) que pueden estimular, provocar, inducir o exacerbar una respuesta inmunitaria en un individuo. Tales respuestas inmunitarias incluyen, pero no se limitan a aquellas principalmente bajo el control de los linfocitos T y aquellas asociadas más a menudo con los linfocitos B del sistema inmunitario. También incluyen tales respuestas, en las que los anticuerpos producidos son de cualquier tipo. El experto en la técnica apreciará que entre las muchas respuestas medibles, a menudo se producen anticuerpos Ig-E en respuesta a tales proteínas en un individuo sensible.

Para los fines del presente documento una "reducción" de inmunogenicidad significa al menos una disminución matemática en la medida de la respuesta inmunitaria, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Se prefiere una disminución estadísticamente significativa, cuando tal análisis es posible y apropiado. El experto en análisis estadísticos apreciará que la determinación de una diferencia estadística pueda realizarse usando, por ejemplo, la prueba T de Student o cualquier otro análisis apropiado para la naturaleza y diseño de la metodología de reunión de datos.

Por tanto, para ayudar a minimizar la inmunogenicidad potencial de las proteínas de la leche, tales como las proteínas del suero de la leche, alfa lactoalbúmina y beta lactoglobulina, la endopeptidasa escinde preferiblemente uno o más determinantes inmunológicos presentes en la proteína, por ejemplo, la región en beta lactoglobulina entre

los aminoácidos 55-98. Tal escisión da como resultado el enriquecimiento del hidrolizado, en relación con la proteína no hidrolizada en uno o más péptidos determinados. En una realización, el hidrolizado está enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en uno o más de los péptidos: ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) y KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

En determinadas realizaciones, el hidrolizado está enriquecido generalmente en péptidos que terminan en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico, en comparación con la proteína no hidrolizada. Cuando la proteína de la leche incluye una proteína de suero de la leche, en una realización el hidrolizado está enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), preferiblemente enriquecido en uno o más de los péptidos: ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14) y TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15).

Alternativamente, en una realización en la que la proteína de la leche incluye una caseína, el hidrolizado puede estar enriquecido en uno o más de los péptidos: DQAME (SEQ ID NO: 16), GIHAQQKE (SEQ ID NO: 17), VLNE (SEQ ID NO: 18), VFGKE (SEQ ID NO: 19), RLHSMKE (SEQ ID NO: 20), DIQME (SEQ ID NO: 21), KHPKHQGLPQE (SEQ ID NO: 22), RPKHPKHQGLPQE (SEQ ID NO: 23), PMIGVNQE (SEQ ID NO: 24), GIHAQQKEPMEGVNQE (SEQ ID NO: 25), RYLGYLE (SEQ ID NO: 26), LAYFYPE (SEQ ID NO: 27), FVAPFPE (SEQ ID NO: 28), KTTMPLW (SEQ ID NO: 29), LFRQFYQLD (SEQ ID NO: 30), FVAPFPE (SEQ ID NO: 31), NLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 32) y ENLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 33).

El experto en la técnica observará que nada en el presente documento impide el uso tanto de caseína como de proteínas del suero de la leche como fuente para el hidrolizado, en cuyo caso, el hidrolizado puede estar enriquecido en cualquiera de o en todos los péptidos anteriores (SEQ ID NO: 1-32), o en cualquier combinación de los mismos.

Hidrolizados que contienen proteínas del suero de la leche

En el presente documento también se proporcionan hidrolizados que contienen proteínas del suero de la leche enriquecidos en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1). Los hidrolizados de proteínas del suero de la leche están enriquecidos en uno o más de los péptidos: ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14) y TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15), y tienen inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.

Como se comentó anteriormente, la reacción inmunitaria puede englobar cualquiera de las reacciones de un individuo a una proteína extraña. La medida de tal reacción puede englobar cualquiera de las técnicas, *in vitro*, *in vivo*, clínicas o de otro tipo, conocidas por el experto en la técnica. Igual que anteriormente, una "reducción" significa al menos una disminución matemática. Se prefiere una disminución estadísticamente significativa, cuando tal análisis es posible y apropiado. En una realización, el sujeto es un ser humano con alergias a proteínas del suero de la leche procedente de la leche de vaca. El hidrolizado proporciona al menos una disminución de aproximadamente el 50% en la medida de inmunogenicidad en comparación con la proteína del suero de la leche no hidrolizada. En otras realizaciones, hay una reducción de aproximadamente el 70%, 80% o 90% o más en la medida de la inmunogenicidad. Aún en otras realizaciones, hay una reducción de aproximadamente 10 veces a 100 veces en la inmunogenicidad, una reducción de 100 veces a 1000 veces, una reducción de 1000 veces a 10.000 veces o incluso más. En una realización, la composición de proteína hidrolizada da como resultado inmunogenicidad reducida en el sujeto sensible de tal manera que casi no hay diferencias detectables entre la respuesta inmunológica a la proteína hidrolizada en un sujeto sensible y la respuesta en uno que no es sensible. Preferiblemente, no hay diferencias estadísticas entre las respuestas inmunológicas entre un individuo sensible y uno no sensible tras la exposición a, o el consumo de, el hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche.

En determinadas realizaciones, el hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), está enriquecido, en relación con una muestra de proteínas de suero de la leche comparable pero no tratada, en uno o más de los péptidos: ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) y KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

El hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche puede producirse a través del uso de una o más endopeptidasas que escinden preferencialmente en el lado carboxilo terminal de los residuos de ácido glutámico y/o residuos de ácido aspártico. En una realización particular, el hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche se produce a través del uso de una endopeptidasa que no usa o requiere un ión metálico para su actividad, y por tanto no es una metaloproteínasa estricta. El experto en la técnica apreciará que el uso de quelantes metálicos tales como EDTA puede ayudar a determinar la ausencia de un requerimiento de metal para cualquier enzima, por ejemplo una proteasa o una peptidasa.

Usos de los hidrolizados de proteínas

En otro aspecto se proporcionan aditivos, complementos e componentes alimenticios que comprenden un hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche o un hidrolizado de proteínas de la leche, enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), tal como se describió anteriormente,

Para tales usos se prefieren hidrolizados, preferiblemente hidrolizados del suero de la leche, enriquecidos en uno o más de los péptidos: ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) y KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4) en relación con la proteína no hidrolizada.

Los aditivos tienen inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas de la leche o del suero de la leche.

En el presente documento también se proporcionan productos alimenticios fabricados que comprenden un hidrolizado de proteínas de la leche o del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), tal como se describe en el presente documento. Preferiblemente, los hidrolizados están enriquecidos en uno o más de los péptidos: ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) y KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), y tienen inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.

En determinadas realizaciones, el producto alimenticio fabricado es un preparado para lactantes, una bebida para deportistas, un producto que contiene queso, un complemento proteico, un complemento nutricional o un producto sustituto de comida. En realizaciones preferidas, el hidrolizado es un hidrolizado de proteínas del suero de la leche y el sujeto tiene una reacción alérgica a una lactoglobulina y/o lactoalbúmina no hidrolizadas.

Será evidente para el experto en la técnica que las composiciones proporcionadas en el presente documento también pueden usarse en relación con la elaboración de queso. El uso de las composiciones es particularmente muy adecuado para la producción de diversos quesos duros y blandos. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden usarse para reducir la inmunogenicidad de tales productos. El queso puede elaborarse totalmente con leche que se hidroliza tal como se proporciona en el presente documento, o antes de cuajar, pueden añadirse composiciones de hidrolizado de proteínas de la leche o del suero de la leche a la leche que está usándose para la producción de queso. Tales usos proporcionarán productos de queso con calidades superiores en lo que se refiere al contenido nutricional y las propiedades funcionales.

De manera similar, las composiciones de hidrolizados de la leche y del suero de la leche proporcionadas en el presente documento son útiles para la fabricación de otros productos lácteos incluyendo pero sin limitarse a la producción de yogur, requesón o nata ácida. El experto en la técnica también apreciará que los hidrolizados pueden adaptarse a secado por pulverización, concentración u otras etapas de procesamiento adicionales. Los hidrolizados secados por pulverización son particularmente muy adecuados para su uso para aplicaciones en las que podría usarse actualmente producto sólido de suero de la leche. También pueden usarse como sustituto de productos sólidos de la leche cuando se desea lograr inmunogenicidad reducida.

En determinadas realizaciones, las composiciones de hidrolizados de la leche y del suero de la leche proporcionadas en el presente documento se usan en otros productos alimenticios que a menudo contienen uno o más productos o subproductos de leche que no están declarados en la etiqueta, o que no tienen etiqueta, como tal, proporcionados al consumidor. En algunos casos, aunque los componentes estén indicados en una etiqueta, los consumidores que no están bien formados en nutrición no entienden que algunos de los componentes enumerados son en realidad componentes que contienen proteínas de la leche o del suero de la leche. Tales productos representan un riesgo real para individuos sensibles, por ejemplo para los que pueden sufrir reacciones alérgicas graves, y de hecho pueden ser potencialmente mortales para esos individuos. Las composiciones proporcionadas en el presente documento se adaptan fácilmente a tales usos y pueden usarse por ejemplo en bebidas, tales como café, té o modificaciones y derivados de los mismos, bebidas para deportistas y similares, así como pudines, rellenos y tentempiés. Muchos otros productos tienen cantidades minoritarias de componentes de la leche o del suero de la leche añadidos para proporcionar una funcionalidad beneficiosa conocida para el procesamiento o la aceptación del consumidor. Los hidrolizados descritos en el presente documento pueden sustituirse fácilmente por los componentes de los que se derivan. Preferiblemente conservan las propiedades funcionales, tales como textura, aroma, sensación en la boca, dispersabilidad, solubilidad y similares, de los componentes de los que se derivan. También proporcionan sabor mejorado (por ejemplo amargor reducido) y propiedades de espumación preferidas en relación con alternativas tales como proteínas del suero de la leche que están hidrolizadas más completamente con enzimas menos específicas. En algunas realizaciones, las proteínas hidrolizadas tienen capacidad mejorada de gelificación, retención de agua o unión al agua en comparación con las proteínas no hidrolizadas.

En otra realización, las proteínas de la leche o del suero de la leche hidrolizadas descritas en el presente documento se usan en la fabricación de un producto aplicado por vía tópica, tal como una loción, crema, pomada, agente de frotamiento, limpiador o similar. Por consiguiente, en el presente documento se contemplan tales productos que comprenden las composiciones de proteínas hidrolizadas descritas en el presente documento. Tales productos son

útiles por ejemplo para fines terapéuticos, por ejemplo, para proporcionar alivio frente a la piel seca, picazón, malestar y similares. Estos productos comprenden preferiblemente, además del componente de proteína hidrolizada, un lípido, cera, aceite, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, o similares. Normalmente, pueden comprender además uno o más componentes de fragancia, así como otros componentes tales como tensioactivos o emulsionantes. También se proporcionan productos cosméticos y otros productos para aspecto o productos de belleza que comprenden los hidrolizados de proteínas de la leche o del suero de la leche descritos en el presente documento. En una realización, el producto cosmético se aplica a la cara, mejillas, labios u ojos de una persona. En otra realización el producto se usa en cualquier parte del cuerpo para ayudar a mejorar el aspecto estético de la piel o, por ejemplo, para disminuir la aparición de arrugas, lunares, pecas, cicatrices, imperfecciones y similares.

Métodos de elaboración

Las composiciones de proteínas de la leche y/o suero de leche hidrolizadas descritas anteriormente pueden prepararse mediante la adición de una o más enzimas proteolíticas a un líquido o semisólido que contiene proteínas de la leche o proteínas del suero de la leche.

El tratamiento enzimático puede llevarse a cabo introduciendo o dispersando la proteasa, o una combinación de proteasas apropiadas, tal como una o más endoproteasas o endopeptidasas en una composición de leche o suero de la leche, o en una composición que contiene proteínas de la leche y/o del suero de la leche tal como se describe en el presente documento para poner en contacto la enzima con el sustrato de proteína. La introducción de la enzima en la composición de proteínas va seguida por dejar que se lleve a cabo la reacción enzimática manteniendo la mezcla en condiciones adecuadas por tanto, por ejemplo durante un tiempo de mantenimiento apropiado, a una temperatura y un pH apropiados, y en presencia de cualquier cofactor requerido. El tratamiento de las composiciones de proteínas de la leche o suero de la leche con la(s) enzima(s) descrita(s) anteriormente, puede llevarse a cabo en condiciones escogidas para adecuarse a la(s) enzima(s) seleccionada(s) según principios bien conocidos en la técnica. El experto en la técnica apreciará que cuando el producto final deseado sea para consumo humano, las condiciones pueden requerir que se sigan buenas prácticas de fabricación (BPF) y condiciones de higiene apropiadas durante el mantenimiento y el tratamiento del material que contiene proteínas en uso. De manera similar, los productos destinados para un uso distinto del consumo, tales como lociones aplicadas por vía tópica o productos cosméticos pueden tener requerimientos normativos asociados con su fabricación.

A pesar de lo anterior, el tratamiento enzimático puede llevarse a cabo a cualquier pH adecuado, tal como aproximadamente de pH 2 a 10, de pH 4 a 9 o de pH 5 a 7. Puede preferirse usar un pH de aproximadamente 7 a 8 para algunas de las enzimas comentadas en el presente documento. El experto en la técnica apreciará que cada enzima tendrá un rendimiento particular en un intervalo de pH, y que puede no sea siempre necesario o incluso deseable usar una enzima a un pH en el que su actividad es la más alta. De modo similar, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente una temperatura o temperatura para la etapa del tratamiento enzimático, adecuada. Los factores que afectan a la selección de la temperatura incluyen pero no se limitan a la termoestabilidad de la enzima o enzimas en uso, la termoestabilidad de las proteínas que están hidrolizándose y las composiciones que comprenden dichas proteínas, así como cambios en la actividad relativa de la enzima en función de la temperatura.

Opcionalmente, tras un tiempo adecuado de tratamiento enzimático, por ejemplo tras llevarse a cabo una determinada cantidad de proteólisis, por ejemplo, una cantidad deseable predeterminada de proteólisis basándose en consideraciones tales como propiedades inmunogénicas y funcionales, la actividad de la enzima puede reducirse o eliminarse. La enzima puede inactivarse parcial o completamente a través de procesos conocidos en la técnica para la eliminación o inactivación de enzimas usadas en el procesamiento de alimentos o piensos. En una realización, la enzima se inactiva térmicamente cuando la proteólisis es suficientemente amplia como para proporcionar las propiedades inmunogénicas reducidas descritas en el presente documento. En otra realización, el grado de proteólisis se monitoriza con una rápida medición de la misma, por ejemplo, el % de proteína soluble total, la viscosidad. La enzima se inactiva cuando la medición rápida alcanza la lectura deseable predeterminada. Preferiblemente, la actividad enzimática se inactiva térmicamente, más preferiblemente la inactivación térmica se combina con una etapa de procesamiento tal como un procedimiento de calentamiento requerido, pasteurización u homogenización.

Las dosificaciones enzimáticas adecuadas estarán habitualmente en el intervalo de aproximadamente el 0,01-1% (p/p). En diversas realizaciones, las proteínas de la leche y/o del suero de la leche estarán presentes en, por ejemplo, aproximadamente el 1-60%, 5-50%, 20-40%, 10-45% o aproximadamente el 10-15% del contenido de proteínas del suero de la leche. Por tanto, la dosis enzimática podría incluir cantidades tales como, por ejemplo, el 0,1-1,0%, particularmente el 0,2% (p/p), lo que corresponde a 2000 UI por 100 g de proteína de la leche o del suero de la leche.

Una UI (unidad internacional) se define como la cantidad de enzima que produce un micromol de producto de hidrólisis de proteínas por minuto en condiciones normales. "Condiciones normales" para el fin de determinar las UI son el uso del 10-15% de sólidos de proteínas del suero de la leche en agua o leche desnatada, pH 7, temperatura de 40°C. En una realización, la dosificación enzimática se basa en el contenido de proteínas en p/p de la composición que está tratándose, tal como se ilustra en los ejemplos.

Alternativamente, la dosificación enzimática puede determinarse por otras vías, tal como mediante el uso de otros ensayos descritos en el presente documento. Tales ensayos pueden proporcionar todos ellos indicadores de la magnitud (o el grado) de la hidrólisis de proteínas e incluyen determinaciones del % de hidrólisis, mediciones de viscosidad, electroforesis en gel y espectrometría de masas. En otras palabras, una cantidad de enzima requerida para producir el resultado deseado o predeterminado en una cantidad dada de tiempo de incubación también puede calcularse de manera empírica, o basándose en otros datos. En una realización, puede seleccionarse una cantidad de enzima para proporcionar una disminución específica de viscosidad; en otra, una cantidad de enzima para producir determinados fragmentos de digestión tal como se determina mediante análisis de electroforesis en gel o espectrometría de masas (EM).

En una realización, la dosificación enzimática puede retrocalcularse por el grado de hidrólisis de una muestra de proteínas. El "grado de hidrólisis" es una medida del número de enlaces peptídicos escindidos por una enzima proteolítica. En este caso, el grado de hidrólisis máximo resultaría de la escisión en sustancialmente todos los residuos de glutamato y posiblemente de aspartato en las moléculas de proteína del suero de la leche. El grado de hidrólisis puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo usando un ensayo de TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico) tal como se describe en J. Adler-Nissen, J. Agric. Food Chem. 27: 1256 (1979).

Otros métodos de determinación de la dosis de una enzima o de la actividad enzimática son ensayos, tales como a través de sustratos detectables, tales como sustratos colorimétricos o artificiales. Se ha usado Suc-AAPEpNA (sucinil-Ala-Ala-Pro-Glu-p-nitroanilida). La conversión a concentración de endoproteasa Glu-C activa puede llevarse a cabo obteniendo una medición exacta de la tasa de actividad específica y convirtiendo las unidades de actividad por volumen unitario en cantidad de enzima usando una curva patrón o un factor de conversión predeterminado. Por ejemplo, para determinados experimentos usados en el presente documento, el factor de conversión para L-MPR fue de 0,348 U/mg de enzima, y para S-MPR fue de 0,549 U/mg. El experto en la técnica apreciará como determinar la dosificación o actividad requerida según lo anterior.

El tratamiento enzimático puede llevarse a cabo en operaciones discontinuas, por ejemplo en un tanque con agitación. El tratamiento también puede ser continuo, tal como en una serie de reactores de tanque agitado. El tratamiento también puede englobar el uso de enzimas inmovilizadas y diversas enzimas modificadas, siempre que se mantenga una especificidad de hidrólisis apropiada mediante la actividad enzimática inmovilizada o modificada.

Ejemplos

Ejemplo 1

Digestión de proteínas de la leche con endopeptidasa de especificidad limitada:

Enzimas: "endopeptidasa Glu" de *Bacillus licheniformis* ("L-Glu"): Se expresó la enzima ("L-MPR" o "Endo-Glu-C") de *B. licheniformis* en *B. subtilis* y se purificó a partir de fermentaciones de 2-14 l, se reunió y se concentró. La concentración de la enzima purificada (> 90% de pureza) fue de 25,1 mg/ml. Esta proteína de 23,6 kDa tiene una similitud de secuencia con la proteasa V8 de *Streptomyces griseus* y con otras proteasas específicas Glu/ASP (por ejemplo con especificidad por Glu-Xaa, ASP-Xaa en el sitio de escisión). Es una serina endopeptidasa que está parcialmente inhibida por EDTA, sin embargo no es una metaloproteasa. Presenta un pH óptimo de aproximadamente 7,5-8. Una fuerza iónica superior disminuye la actividad. Se conoce la secuencia y puede encontrarse en bases de datos públicas. Por ejemplo, se proporciona en el número de registro principal P80057 de UniProtKB/Swiss-Prot, disponible de la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory) disponible en internet. Véase "Purification, characterization, cloning, and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580" J. Biol. Chem. 267: 23782-23788 (1992).

"Endopeptidasa Glu" de *Bacillus subtilis* ("S-Glu"): Se expresó a enzima ("S-MPR" o "Endo-Glu-C") de *B. subtilis* en *B. subtilis* y se purificó a partir de fermentaciones de 2-14 l, se reunió y se concentró. La concentración de la enzima purificada (> 85% de pureza) fue de 3,5 mg/ml. Es una serina proteasa de 23,9 kDa, proteína que tiene una similitud de secuencia con la endopeptidasa Glu "L-Glu" de *B. licheniformis*. La proteasa S-Glu es relativamente estable en un intervalo de pH más amplio. No es tan específica como la enzima L-Glu de *B. licheniformis*. Se conoce la secuencia y puede encontrarse en bases de datos públicas. Por ejemplo, se proporciona en el número de registro principal P39790 de UniProtKB/Swiss-Prot, disponible de la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory) disponible en internet. Véase "Gene encoding a glu-specific extracellular endopeptidase in *Bacillus subtilis*"; J. Bacteriol. 172: 1024-1029 (1990), y "Purification and characterization of a glutamic acid-specific endopeptidase from *Bacillus subtilis* ATCC 6051: application to the recovery of bioactive peptides from fusion proteins by sequence-specific digestion." Appl. Microbiol. Biotech. 48: 27-33 (1997).

Métodos:

Para evaluar el transcurso de tiempo de la digestión proteolítica, se disolvió el 12% de proteína del suero de la leche (13,3 gramos de polvo de suero de la leche (Lacprodan DI-9224 (Arla Foods)) en 100 ml de agua en agua de

calidad para reactivo. Se colocaron quince (15) g de esta disolución en cada uno de cuatro tubos de 50 ml y se incubaron hasta alcanzar 40°C en un agitador-incubador (por ejemplo durante quince minutos). Se añadió enzima purificada tal como se describió anteriormente a cada uno de tres tubos de 50 ml. Se usaron 500 µl de o bien S-MPR a una concentración de 1,5 mg/ml o bien endoproteasa L-MPR a una concentración de 4,2 mg/ml. Se midió la actividad usando Suc-AAPEpNA como sustrato. Las enzimas eran homogéneas en más de aproximadamente el 98% mediante SDS-PAGE. El cuarto tubo era un tubo de control que no recibió enzima añadida. Se incubaron los tubos a 40°C, 175 rpm en un agitador orbital durante el tiempo indicado. Se retiraron los tubos al final de su tiempo de incubación (2, 4 y 20 horas, respectivamente) y se centrifugaron a 3600 rpm (aproximadamente 2800 x g) durante diez minutos para separar el precipitado y el fluido sobrenadante.

Se sometió a prueba el fluido sobrenadante para obtener mediciones de la proteína total (PT) que permanecía soluble en el sobrenadante (g/l), el % de sólido seco y la viscosidad. También se analizaron los sobrenadantes mediante electroforesis usando SDS-PAGE, para monitorizar la hidrólisis. Se realizó análisis de espectrometría de masas (EM) para confirmar la presencia de productos de escisión proteolítica individuales.

Análisis de espectrometría de masas:

Preparación de la muestra: se prepararon muestras de proteína hidrolizada tal como se ha descrito. Se analizaron aproximadamente 20 µl de cada muestra de proteína digerida mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un sistema de espectrometría de masas con trampa iónica LCQ (CL/EM).

Análisis de CL/EM/EM: Se adquirieron todos los datos de EM y EM/EM usando el sistema de HPLC Surveyor acoplado a EM con trampa iónica LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San José, CA). Se usó una columna C18 de fase inversa Vydac (2,1 X 150 mm) para todas las muestras digeridas por proteólisis usando el gradiente de HPLC de desde el 0% hasta el 70% del disolvente B durante 65 minutos a una velocidad de flujo de 200 µl/min. Disolvente A: 0,1 de TFA en agua y disolvente B: 0,08% de TFA en acetonitrilo. Se realizó el procesamiento de los datos usando los programas TurboSEQUENT y Xcalibur (ThermoFinnigan).

Luego se usaron los resultados del análisis de EM con el programa Mascot, que permite usar fragmentos de digestos peptídicos como únicos datos a partir de los cuales puede identificarse la proteína fuente y su secuencia primaria usando las bases de datos públicas tales como las mantenidas por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information). Puede encontrarse más información sobre Mascot, y su predecesor, Mowse, en internet, por ejemplo en la página web (www.matrixscience.com) mantenida por Matrix Science Inc., (Boston, MA).

Resultados:

La endopeptidasa S-Glu a una concentración final de proteína enzimática del 0,188% con respecto a la concentración de proteína sustrato del suero de la leche del 12%, dio como resultado una disminución del 5,5% en la proteína total (PT) en 2 horas. En las siguientes 4 a 20 horas, la PT disminuyó adicionalmente, hasta una disminución máxima de aproximadamente el 20%.

La cuajada precipitada tuvo un volumen agua retenida (es decir, una medida de la retención de agua en la cuajada) de peso aproximadamente igual de agua por cuajada.

La viscosidad del sobrenadante mejoró desde 3,05 cP hasta 5,99 cP tras 20 horas de incubación con la enzima S-Glu.

Se observaron resultados similares con la enzima L-Glu a la misma concentración final que anteriormente. En el plazo de 2 horas, se observó una disminución del 6,9% de PT, mejorando hasta un 10% en el punto de tiempo de 4 horas. La disminución alcanzó el 14% al final de la incubación de 20 horas.

La cuajada precipitada tenía un volumen de agua retenida de aproximadamente el 70% en peso del peso de la proteína.

La viscosidad del sobrenadante permaneció aproximadamente igual durante el transcurso de la incubación de 20 horas con endopeptidasa L-Glu.

Los resultados en el transcurso del tiempo tal como se revelan mediante SDS-PAGE se muestran en la figura 1 para ambos tratamientos enzimáticos con S-Glu y L-Glu. Los resultados del análisis de espectrometría de masas de los productos de digestión de 20 h de la muestra del suero de la leche se muestran en la figura 2 para L-Glu y en la figura 3 para S-Glu.

Las muestras de hidrolizados con endopeptidasa de proteínas del suero de la leche estaban enriquecidas en péptidos específicos cuya identidad y cantidades relativas se verificaron usando la CL/EM/EM detallada anteriormente.

Las tablas 1(a) y (b) y 2(a) y (b) a continuación muestran los datos obtenidos del análisis de Mascot de los datos de péptidos para las muestras del suero de la leche digeridas con L-Glu y S-Glu, respectivamente, en 20 h de digestión.

- 5 Tabla 1(a), (b): Análisis de Mascot de los datos de EM para la muestra de proteínas del suero de la leche digeridas con L-Glu durante 20 h.

(a) Beta lactoglobulina

```
>gi|125910|sp|P02754|LACB_ PRECURSOR DE BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA (BETA-LG)Ogi|1070647|pir||LGB0 precursor de beta-
lactoglobulina- bovina Ogi|669061 (Z48305) precursor de la variante B de la beta-lactoglobulina [Bos taurus] (MASA =19883)
MRCLLLALAL TCGAALIVT QTHKGLDIQK VAGTWYSLAH AASDISLLDA QSAPLRVYVE ELKPTPEGDL EILLQKWENG ECAQKKIIE KTKIPAVFKI
DALNENKVLV LDTDYKLYL FCHENSREPE QSLACQLVR TPEVDDEALE KFDKALKALP MHIRLSFNPT QLEEQCHI
> masa monoisotópica = 19852
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
125- 130	<u>NSARPR</u>	
???	<u>IQPIPR</u>	
62- 71	<u>ELKPTPEGDL</u>	
72- 78	<u>EILLQKWE</u>	
91- 101	<u>KTKIPAVFKID</u>	
91- 105	<u>KTKIPAVFKIDALNE</u>	

Cobertura de la proteína: 38/178 = 21,3% por recuento de aminoácidos, 4285/19852 = 21,6% en masa

(b): Kappa caseína

```
>gi|2119400|pir||I45875 precursor de kappa-caseína - bovina Ogi|162811 (H36641) precursor de kappa-caseína [Bos taurus]
[MASA=21225]
HMKSFVLVVT ILALTLPLFC AQEQHQEQPI RCEKDERFFS DKIAKYIPIQ YVLSRYPYSY LNTYQOKPVA LINNOFLPYP YYAKPAAVRS PAQILQVQL
SNTVPARSCQ AQPITHARHP HPHLSFHGAP PKKNQDKTEI PTINTIASCE PTSTPTIAV ESTVATLEAS PEVIESPPHI NTVQVTSTAV
> masa monoisotópica = 21193
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
127- 139	<u>HAIPPKKNQDKTE</u>	
162- 168	<u>STVATLE</u>	
180- 190	<u>INTVQVTSTAV</u>	
140- 158	<u>PTINTIASCEPTSTPTIA</u>	

Cobertura de la proteína: 50/190 = 26,3% por recuento de aminoácidos, 5218/21193 = 24,6% en masa

- 20 Tabla 2(a), (b): Análisis de Mascot de los datos de EM para la muestra de proteínas del suero de la leche digeridas con S-Glu durante 20 h.

(a) Beta caseína

```
>gi|2136722|pir||I46963 beta-caseína A3 - bovina Ogi|459292|bbs|140624 (567277) beta-caseína A3 (ganado, glándula mamaria, péptido, 224 aa) [Bos
taurus] (MASA=25098)
MRVLILACL V ALALARELIE LNVPGHVES LSSSEHSITR INMKIERFQS IEQQQYDEBL QDKINPFBQI QSLVTPFPDP IPHSLPQWIP PLTQTPLVVP DYLPQEVHCV SRVKIANDPK
QKEHPPKTP VEPPTESQSL TLTOVENLML PLPLQSVWH QPHQPLPPTV KFPQSVLSL SSKVLVVPQ KAVPTPQDQ PIQAFLLYQE PVLCPPVPCP PIIV
>masa monoisotópica= 25064
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
116- 120	<u>AMAPK</u>	
37- 46	<u>STIRIMKIE</u>	
137- 146	<u>SDSLITDYR</u>	
58- 72	<u>DELDKTHPPAQTQ</u>	
58- 71	<u>DELDKTHPPAQTQ</u>	
21- 29	<u>LNVPGHVR</u>	
147- 156	<u>RLRLPLLLQ</u>	

Cobertura de la proteína: 59/224 = 26,3% por recuento de aminoácidos, 6581/25064 = 24,6% en masa

(b): Beta lactoglobulina

```
>gi1125910|sp|P02754|LACB_PRECURSOR DE BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA (BETA-LG)Dgi11070647|pir|1LCB0 precursor de beta-lactoglobulina - bovina.Dgi1669061
(248305) precursor de la variante B de la beta-lactoglobulina[Bos taurus] (MASA=19883)
EKCLLLALAI TCQAQALIVT QTEKGLDIQK VAGTWYSLAH AASDISLLDR QSPRLVYVE ELKPTPIGDL KILLQKVRHG ECAQRKIIAE KYKIPAVFKI DALNHRKVLV LDTDTKNTLL
FCHEMSAREPE QSLACQCLVR TPEVDDEALE KFDKALKALP MHRLSFMPT QLEHQCHI
>masa monoisotópica= 19852
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
125- 130	NSAEP	
111	IQETPE	
50- 60	AQSAPLRYVY	
72- 78	ILLOKWA	
91- 105	ETKIPAVFKIDALNH	
92- 105	IKIPAVFKIDALNH	

Cobertura de la proteína: 39/178 = 21,9% por recuento de aminoácidos, 4419/19852 = 22,3% en masa

5 Ejemplo 2

Digestión de proteínas de la leche usando las endopeptidasas, S-Glu y L-Glu

Métodos: Se colocaron diez (10) g de leche desnatada (dos fuentes, Berkeley Farms y Sunnyside) en cada uno de ocho tubos de 15 ml. Se calentaron los tubos hasta 40°C durante 15 minutos en un agitador-incubador. Se añadió la enzima (S-Glu o L-Glu) (500 µl de disolución madre 3,8 mg/ml) a cada uno de tres tubos por cada enzima. Un tubo sirvió como control para cada fuente de leche desnatada y no recibió ninguna enzima añadida. La incubación continuó durante el tiempo indicado en las condiciones anteriores. Se retiró un tubo por cada tratamiento enzimático a 2, 4, 20 h. Luego se centrifugaron los tubos para separar el precipitado y el sobrenadante. Se sometieron a prueba los sobrenadantes para obtener mediciones de la PT (proteína total) (g/l), el % de sólido seco y la viscosidad. Se usó un SDS-PAGE para monitorizar la escisión por endopeptidasa. Se realizó un análisis de espectrometría de masas tal como se detalló anteriormente para confirmar la cantidad y la identidad de los productos de escisión generados. También se realizó un análisis de Mascot usando los péptidos generados usando los datos recogidos de la espectrometría de masas.

Resultados: Dos muestras de leche desnatada tratadas con S-Glu a una concentración final de 0,19 mg/g de leche desnatada produjeron una cuajada muy gruesa en el plazo de 2 horas de tratamiento. Se precipitó aproximadamente el 43%-57% de la proteína total de la leche desnatada en el plazo de dos horas de tratamiento enzimático. La precipitación fue casi completa, puesto que no se observó disminución significativa adicional de la proteína total en el sobrenadante a las 4 ó 20 h para ninguna de las dos fuentes de leche desnatada.

En contraposición con S-Glu, las muestras tratadas con L-Glu mostraron precipitación mejorada de la proteína de la leche desnatada a lo largo del tiempo. Para la muestra de leche desnatada I, el tratamiento con endopeptidasa L-Glu provocó una disminución del 32% en la concentración de la proteína a t = 2 h, el 42% en 4 horas y el 62% en 20 horas. En la muestra de leche desnatada II tratada con L-Glu, la concentración de PT disminuyó en el 11,5% a t = 2 h, en el 41% en 4 horas y en el 51,7% a las 20 horas.

Tal como puede observarse a partir de los resultados de SDS-PAGE (figuras 3 y 4, leche desnatada I y II, respectivamente), ambas endopeptidasas L-Glu y S-Glu pudieron provocar la precipitación de la caseína de la leche desnatada en el plazo de 2 h y tuvieron hidrólisis de caseína significativa, así como de lactoglobulina y lactoalbúmina.

Las muestras de leche desnatada hidrolizadas por endopeptidasa estaban enriquecidas en péptidos específicos cuya identidad y cantidades relativas se verificaron usando la CL/EM/EM detallada anteriormente. Las tablas 3(a), (b) y (c) a continuación muestran los datos obtenidos del análisis de Mascot de los datos de péptidos para la muestra de leche desnatada I digerida con L-Glu tras 20 h de digestión.

Tablas 3(a), (b), y (c): Análisis de Mascot de datos de EM para la muestra de leche desnatada I digerida con L-Glu durante 20 h.

(a) Alfa caseína

```
>gi|115646|sp|P02662|CAS1_ PRECURSOR DE ALFA-S1 CASEÍNA BOVINA [MASA=24529]
MKLLILTCIV AVALARPQHP IQHQCLPQEV LNENLLRFEV RPFPEVFGKE KVNLSKDIG SESTEDQAME DIKQMEASI SSSSEIVPNS VEQKIQKED VPSEHYLGYL EQLLELKKYK
VPQLEIVPNS ASELNLSMKE GHAQQKEPM IGVNQLRYE YPELFRQFTY LDAYPSCAWY YVPLCTQYTD APSFSQIPNP ICSESEKTT MPLW
> masa monoisotópica = 24495
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
66- 70	<u>QQAHE</u>	
94- 99	<u>KHIQKE</u>	
93- 99	<u>QKHQKE</u>	
141- 148	<u>GHAQQKE</u>	
30- 33	<u>VLEH</u>	
46- 50	<u>VFGKE</u>	
134- 140	<u>RLHSMKE</u>	
71- 76	<u>DIKOME</u>	
121- 125	<u>VPQLE</u>	
149- 156	<u>PHICVNOR</u>	
141- 156	<u>GHAQQKEPHICVNOR</u>	
40- 45	<u>VAPFPE</u>	
116- 125	<u>LKQYKVPQLE</u>	
105- 111	<u>EYLCYLE</u>	
88- 91	<u>FNSV</u>	
157- 163	<u>LAYFPPE</u>	
39- 45	<u>FVAPFPE</u>	
208- 214	<u>KTIHPLW</u>	
164- 172	<u>LFRQFTQLE</u>	
38- 45	<u>FVAPFPE</u>	
34- 39	<u>NLLRPF</u>	
34- 45	<u>NLLRPFVAPFPE</u>	
33- 45	<u>NLLRPFVAPFPE</u>	

Cobertura de la proteína: 106/214= 49,5% por recuento de aminoácidos, 12767/24495 = 52,1% en masa

5 (b) Beta caseína

```
>gi|2136722|pir|I146963 beta-caseína A3 - bovina >gi|459292|bb|I140624 (867277) beta-caseína A3 (ganado, glándula mamaria, péptido, 224 aa) [Bos
taurus] [MASA=25098]
MKVLILACIV ALALARELHE LNVPGHVES LSSSEHSITR INKCKEKQS EHQOQTEKL QDKKHPRQGT QSLVYFPFGP IPNSLPQHIP PLTQTPVVVP PFLQPEVHGV SKVKEAMAPK
QKQKQFPKYP VEPFTHSQSL TLTDVENLHL PLPLLSQYKH QPHQPLPPTV HFPFQSLSL SQSKVLVPPQ KAVPYPPQDM PIQAPLLYQE FVLCPVRCPP PIIV
> masa monoisotópica = 25064
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
47- 52	<u>KTQSEH</u>	
133- 136	<u>PPIA</u>	
107- 115	<u>VHGVSKVKE</u>	
21- 26	<u>LNVPGA</u>	
37- 46	<u>SITPINKKLE</u>	
20- 26	<u>LNVPGA</u>	
60- 72	<u>LQDRIHFFAQIQE</u>	
63- 73	<u>KIHFFAQIQEL</u>	
60- 73	<u>LQDRIHFFAQIQEL</u>	
124- 132	<u>KPPPKYVEE</u>	
123- 132	<u>KPPPKYVPA</u>	
126- 136	<u>PKKYVAPPIA</u>	
124- 136	<u>KPPPKYVAPPIA</u>	
123- 136	<u>KPPPKYVAPPIA</u>	

Cobertura de la proteína: 60/224 = 26,8% por recuento de aminoácidos, 6925/25064 = 27,6% en masa

10

Tabla 3(c): Beta lactoglobulina

```
>gi|125910|sp|P02754|LACB_ PRECURSOR DE BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA(BETA-LG)>gi|1070647|pir|I1680 precursor de beta-lactoglobulina - bovina >gi|669061
(248305) precursor de la variante B de la beta-lactoglobulina [Bos taurus] [MASA=19883]
MKCLLLALAL TCQAQALIVT QTHKGLDIQK VACTWYSLAH AASDISLDA QSAPIRVYVE ELKPTPECDL EILLQKWKNC ECAQKKILAE KTEIPAVFKI DALNENKVLV LDTDYKCYLL
FCHENSAREPE QSLACQCLVR TPEDVDRALE KFDKALKALP MCKRLSPNPT QLEHQCHI
> masa monoisotópica = 19852
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
125- 130	<u>NSALPE</u>	
72- 78	<u>LLOKHE</u>	
151- 164	<u>KFDKALKALPHIE</u>	
165- 173	<u>LSFNPTQLE</u>	
91- 105	<u>KTKIDAVFKIDALNE</u>	
161- 173	<u>KPKILSFNPTQLE</u>	
159- 173	<u>LPHHILSLFNPTQLE</u>	
158- 173	<u>ALPHHILSLFNPTQLE</u>	

15 Cobertura de la proteína: 51/178 = 28,7% por recuento de aminoácidos, 5884/19852 = 29,6% en masa

De manera similar, los datos obtenidos del análisis de Mascot de los datos de péptidos para la muestra de leche desnatada II digerida durante 20 h se muestran a continuación en las tablas 4(a) para S-Glu, y 4 (b) y (c) para L-Glu, respectivamente.

20

Tablas 4(a), (b) y (c): Análisis de Mascot de los datos de EM para la muestra de leche desnatada II digerida con endopeptidasa durante 20 h.

(a) Digestión con S-Glu. Alfa caseína

```
>gi|115646|sp|P02662|CAS1_PRECURSOR DE ALFA-S1 CASEÍNA BOVINA (MASA=24529)
MKLLILYCLV AVALARPQKP IKHQGLPQKV LNNLLRFV APFPEVPCKE KVMELSKDIC SESTDQAKH DIADHAKESI SSSSEIVPNS VEQMKCKED VPSEYLCYL EQLLRKQYK
VPQLSIVPNS ABRRLSKCKE GIKHQKQKPK IGVNQLNYP YPRLPQFTQ LDATPSCAVY TVPLCTQYD APSFSDIPSP ICSSESKRTY KPLV
> masa monoisotópica = 24495
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
66- 70	DOAMK	
66- 71	DOAMED	
65- 71	EDOAMED	
30- 33	VLNR	
135- 140	LHSKKE	
77- 90	ASISSSRRIKVPNS	
46- 50	VTCKK	
71- 76	DIKQKE	
93- 104	QKHIOKEDVPSK	
92- 104	KQKHIOKEDVPSK	
46- 54	VTGKKEVNR	
18- 29	KHPDQHQGLPQK	
141- 156	GIHQKQKPKHICVNR	
66- 76	DOAMEDIKQKE	
158- 163	AYFPPK	
106- 111	VLGYLK	
157- 163	KAYFPPK	
39- 45	FVAPFPPK	
209- 214	ITMPLV	
38- 45	FVAPFPPK	
35- 45	LIRFVAPFPPK	
34- 45	NLLRFVAPFPPK	
33- 45	NNLLRFVAPFPPK	

Cobertura de la proteína: 117/214 = 54,7% por recuento de aminoácidos, 13570/24495= 55,4% en masa

Tabla 4(b): Digestion L-Glu. Beta caseína

```
>gi|2136722|pir|I146963 beta-caseína A3 - bovina Ogi|459292|bb|140624 (S67277) beta-caseína A3 (ganado, glándula mamaria, péptido, 224 aa) (Bos
taurus) [MASA=25098]
HKVLILACLK ALALARELNE LNVPGKIVES LSSSEISITR INCKIEKQKS EQQQTEDL QDKIMFQRT QSLVYPPFGP IPHSLPQNIPL PLTQTPVVVP PPLQPEVHGV SKVKRAMAPK
QKHQPPKYP VEDPTESQSL TLTVDHMLL PLPLIQSWKH QPHQPLPPTV HFPQSVLSL SQSKVLVPVQ KAVFPQQRDH PIQAFLLYQE PVLCFVRGPP PIIV
> masa monoisotópica = 25064
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
17- 20	ALKK	
37- 46	SITRINKKIK	
37- 47	SITRINKKIKK	
58- 71	DELQKIHPPAQIQ	
139- 146	SLTLTDVR	
21- 29	LNVPGKIVK	
58- 67	DELQKIHPPK	
123- 136	HPFPKYPVPPPIK	
147- 156	NRLPLPLIQ	

Cobertura de la proteína: 70/224= 31,3% por recuento de aminoácidos, 8101/25064= 32,3% en masa

Tabla 4(c): Digestión con L-Glu:

```
>gi|115654|sp|P02663|CAS2_PRECURSOR DE ALFA-S2 CASEÍNA BOVINA Ogi|476486|pir|IKAB0S2 precursor de alfa-s2-caseína - bovina Ogi|162929 (H16644) precursor
similar al de la alfa s2 caseína [Bos taurus] [MASA=26019]
HKVFIIFCLL AVALARQTHE HVSSSEISII SQTYTQDEPK MAINPSKENL CSTFCKEVVR NNNHNYISIC SSSSESAVRA TEHVKITVDD KRYOKALNEI HQFYQKFPQT LQTYQCQPIV
LNPUDQVKKN AVPIYPTLNR EQLSTSEKSS KRTVDHSTE VFTKTKLTE EKKRNLNVLK KISQRTQKFA LPQTKTVYQ HQRAKQVUIQ PKTRVPIPTVR YL
> masa monoisotópica = 25984
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
34- 38	LYKQK	
79- 83	VATKK	
58- 65	VYRNANKK	
161- 171	VFTKTKLTKE	
161- 172	VFTKTKLTKEE	
84- 99	VKITVDDHRYOKALNE	
130- 141	NAVPIPTLNRE	

Cobertura de la proteína: 58/222= 26,1% por recuento de aminoácidos, 6711/25984= 25,8% en masa

Ejemplo 3

Digestión de caseína con actividad endopeptidasa

Métodos: Se mezclaron diez (10) g de polvo de caseína (Sigma, número de catálogo C-5890) en 50 ml de tampón fosfato 1 M, pH 6,5 y 200 ml de agua caliente. Se calentó el contenido hasta que la caseína se disolvió en el tampón. Se mantuvo la disolución de caseína a esa temperatura durante cinco minutos. Entonces se enfrió la disolución de caseína hasta temperatura ambiente y se ajustó a un volumen final de 500 ml. Se colocaron diez (10) ml de esta disolución de caseína en cada uno de ocho tubos de 15 ml y se calentó hasta 40°C durante 15 minutos en un agitador-incubador. Cada uno de tres tubos recibió endopeptidasa o bien S-Glu o bien L-Glu (500 µl de una solución madre 3,8 mg/ml). Un tubo de cada uno sirvió como control sin enzima añadida. Se retiraron los tubos de muestra a t = 2, 4 y 20 h, se enfriaron y se centrifugaron para separar el precipitado y el sobrenadante. Se sometieron a prueba los sobrenadantes para obtener mediciones de la PT (proteína total, g/l), el % de sólido seco y la viscosidad. También se analizaron los sobrenadantes por electroforesis usando SDS-PAGE, para monitorizar la hidrólisis. Se realizó análisis de espectrometría de masas (EM) para confirmar la presencia de productos de escisión proteolítica individuales. Entonces se usaron los resultados del análisis de EM con el programa Mascot, que permite usar fragmentos de digestos peptídicos como únicos datos a partir de los cuales puede identificarse la proteína fuente y su secuencia primaria usando las bases de datos públicas tales como las mantenidas por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information). Puede encontrarse más información sobre Mascot, y su predecesor, Mowse, en internet, por ejemplo en la página web (www.matrixscience.com) mantenida por Matrix Science Inc., (Boston, MA).

Resultados:

En la disolución de caseína tamponada (16,85 g/l) tratada con endopeptidasa a la concentración de 0,19 mg de enzima por g de disolución de caseína, precipitó el 58% de caseína en el plazo de 2 h usando S-Glu. Sin embargo, algo de la caseína precipitada se disolvió nuevamente, debido a hidrólisis adicional a lo largo del tiempo. Las concentraciones de proteína precipitada fueron por tanto del 53% y del 49% a las 4 y 20 h, respectivamente. El tratamiento con L-Glu proporcionó un aumento en la caseína precipitada a lo largo del tiempo de prueba. A las 2 h, se retiró el 32,5% de la proteína total (PT) de la disolución de caseína. Esto aumentó hasta el 34% en 4 h; en 20 h, la proteína total retirada fue del 54,2%. La figura 6 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE de digestos de caseína.

Los resultados del análisis de Mascot de los digestos de caseína se muestran a continuación, en la tabla 5 y 6, para los resultados de digestión tras 20 h con las enzimas L-Glu y S-Glu, respectivamente.

Tabla 5: Digestión con endopeptidasa L-Glu, 20 h. Alfa caseína.

```
>q1115646|sp|P02662|CASI_1|PRECURSOR DE ALFA-S1 CASEÍNA BOVINA (MASA=24529)
MKLLILICLV AVALARPKKP IKHGLPQEV LNENLLEFV APPEVECKE KVNLSKDIG SESTEDQRM EIKQMEASST SSSEIVPNS VEQKHQKED VPSENYLGYL EQLRLKGYK
VPQLEIVPNS ABERLNSQKE GHAQOQKEP IGVNQELAYE YPELFRQYQ LDAYPSCANY YVPLCTQYD APSFSDIGNP IGSENSENTT MPLW
> masa monoisotópica = 24495
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
65- 70	<u>DQAME</u>	
141- 149	<u>GHAQOQKE</u>	
30- 33	<u>VLNE</u>	
46- 50	<u>VFGKE</u>	
134- 140	<u>ELHSEKE</u>	
71- 76	<u>EIKQME</u>	
18- 29	<u>KHPINQGLPQE</u>	
16- 29	<u>EPHPINQGLPQE</u>	
149- 156	<u>PHICVNQE</u>	
141- 156	<u>GHAQOQKEPHICVNQE</u>	
105- 111	<u>EYLGYL</u>	
157- 163	<u>LAYFPE</u>	
39- 45	<u>ZVAPPE</u>	
208- 214	<u>KTHPLU</u>	
164- 172	<u>LFRQFYQD</u>	
38- 45	<u>FFVAPPE</u>	
34- 45	<u>NLLRFFVAPPE</u>	
33- 45	<u>ENLLRFFVAPPE</u>	

Cobertura de la proteína: 99/214= 46,3% por recuento de aminoácidos, 11898/24495= 48,6% en masa

Tabla 6: Digestión con endopeptidasa S-Glu, 20 h. Alfa caseína.

```
>gi1115646|sp|P02652|CAS1_ PRECURSOR DE ALFA-S1 CASEÍNA BOVINA [MASA=24529]
HKLLILICLV AVALARPQMP IKHQGLPQEV LNENLLRFEV APFPEVFGEK KVNELSKDIG STESTDQANE DIKQMEAEIS SSSKEIVPNS VEQKHQKED VPSERYLGYL EQLLALRKYK
VPQLEIVPNS RREELNSHKE GIMBQQKEPM IGVNQELAYE YPELFRQFYQ LDATPSGAUY YVPLGTQYTD APSFSIDIPNF ICSEHSEKFT MPILW
> masa monoisotópica = 24495
```

posición	secuencia	(enlace de BLAST de NCBI)
66- 70	<u>DQANE</u>	
66- 71	<u>DQANE</u>	
30- 33	<u>VLNE</u>	
126- 133	<u>IUPNSAEK</u>	
46- 50	<u>VFGKE</u>	
71- 76	<u>DIRQNE</u>	
133- 140	<u>ERLHSHKE</u>	
46- 54	<u>VFGKKEVNR</u>	
18- 29	<u>KHPKHQGLPQE</u>	
141- 156	<u>GIAQQKEPNICVNQR</u>	
66- 76	<u>DQANEIKQNE</u>	
150- 163	<u>AYFYPE</u>	
134- 163	<u>RLHSHKEGIAQQKEPNICVNQELAYFYPE</u>	
106- 111	<u>YLCYLE</u>	
106- 112	<u>YLCYLEQ</u>	
157- 163	<u>LAYFYPE</u>	
39- 45	<u>FVAPFPE</u>	
209- 214	<u>TINPLW</u>	
30- 45	<u>FFVAPFPE</u>	
35- 45	<u>LLRFFVAPFPE</u>	
34- 45	<u>NLLRFFVAPFPE</u>	
33- 45	<u>NNLLRFFVAPFPE</u>	
28- 56	<u>QKVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELS</u>	

5 Cobertura de la proteína: 101/214= 47,2% por recuento de aminoácidos, 11787/24495= 48,1% en masa

REIVINDICACIONES

1. Hidrolizado que comprende al menos una proteína de la leche hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que escinde preferencialmente en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico y que escinde uno o más determinantes inmunológicos presentes en la proteína, comprendiendo el hidrolizado al menos una beta lactoglobulina hidrolizada en la región entre los aminoácidos 55-98, teniendo el hidrolizado inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína y en el que el hidrolizado está enriquecido en al menos el péptido AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO. 1), en el que al menos una enzima proteolítica es una endopeptidasa y en el que la endopeptidasa no es una que tiene la secuencia de aminoácidos

```

      5      10      15      20      25      30
1 S V I G S D D R T R V T N T T A Y P Y R A I V H I S S S I G
31 S C T G W M I G P K T V A T A G H C I Y D T S S G S F A G T
61 A T V S P G R N G T S Y P Y G S V K S T R Y F I P S G W R S
91 G N T N Y D Y G A I E L S E P I G N T V G Y F G Y S Y T T S
121 S L V G T T V T I S G Y P G D K T A G T Q W Q H S G P I A I
151 S E T Y K L Q Y A M D T Y G G Q S G S P V F E Q S S R T N
181 C S G P C S L A V H T N G V Y G G S S Y N R G T R I T K E V
211 F D N L T N W K N S A Q

```

2. Hidrolizado según la reivindicación 1, en el que la endopeptidasa escinde preferencialmente en el lado carboxilo terminal de un residuo de ácido glutámico o un residuo de ácido aspártico.

3. Hidrolizado según la reivindicación 2, en el que la endopeptidasa es el número de registro principal P39790 de UniProtKB/Swiss-Prot.

4. Hidrolizado que comprende al menos una proteína de la leche hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que escinde preferencialmente en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico, en el que la enzima proteolítica es la endopeptidasa de número de registro principal P39790 de UniProtKB/Swiss-Prot, teniendo el hidrolizado inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína y en el que el hidrolizado está enriquecido en al menos el péptido AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1).

5. Hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en el que la endopeptidasa se inhibe por fluoruro de fenilmetilsulfonilo o fluorofosfato de diisopropilo.

6. Hidrolizado según la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína soluble, no micelar.

7. Hidrolizado según la reivindicación 6, en el que la proteína es proteína del suero de la leche.

8. Hidrolizado según la reivindicación 7, en el que la endopeptidasa no requiere un ión metálico para su actividad.

9. Hidrolizado según la reivindicación 7, en el que la proteína incluye al menos una lactoalbúmina, preferiblemente una alfa lactoalbúmina.

10. Hidrolizado según la reivindicación 9, en el que la proteína es al menos una de una lactoalbúmina o una lactoglobulina, preferiblemente una alfa lactoalbúmina o una beta lactoglobulina.

11. Hidrolizado según la reivindicación 10, en la que el hidrolizado está enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).

12. Hidrolizado según la reivindicación 1, que está enriquecido en péptidos que terminan en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico, en comparación con la proteína no hidrolizada.

13. Hidrolizado según la reivindicación 12, que está enriquecido en uno o más de los péptidos ELEE (SEQ ID NO: 5), VATEE (SEQ ID NO: 6), PFTE (SEQ ID NO: 7), NSAEPE (SEQ ID NO: 8), VFGKE (SEQ ID NO: 9), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3), KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), IQPTPE (SEQ ID NO: 10), LKPTPE (SEQ ID NO: 11), LKPTPEGD (SEQ ID NO: 12), LKPTPEGDL (SEQ ID NO: 13), TKIPAVFKID (SEQ ID NO: 14) o TKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 15).

14. Hidrolizado según la reivindicación 12, que está enriquecido en uno o más de los péptidos DQAME (SEQ ID NO: 16), GIHAQQKE (SEQ ID NO: 17), VLNE (SEQ ID NO: 18), VFGKE (SEQ ID NO: 19), RLHSMKE (SEQ ID NO: 20), DIKQME (SEQ ID NO: 21), KHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 22), RPKHPIKHQGLPQE (SEQ ID NO: 23), PMIGVNQE (SEQ ID NO: 24), GIHAQQKEPMGVNQE (SEQ ID NO: 25), RYLGYLE (SEQ ID NO: 26), LAYFYPE (SEQ ID NO: 27), FVAPFPE (SEQ ID NO: 28), KTTMPLW (SEQ ID NO: 29), LFRQFYQLD (SEQ ID NO: 30), FVAPFPE (SEQ ID NO: 31), NLLRFFV APFPE (SEQ ID NO: 32) o ENLLRFFVAPFPE (SEQ ID NO: 33).

15. Hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche que está enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1).
- 5 16. Hidrolizado que contiene proteínas del suero de la leche según la reivindicación 15, en el que el hidrolizado está enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).
- 10 17. Componente alimenticio que comprende un hidrolizado de proteínas del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1) que tiene inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.
- 15 18. Componente alimenticio según la reivindicación 17, en el que el hidrolizado está enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIP A VFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).
19. Producto alimenticio fabricado que comprende un hidrolizado de proteínas del suero de la leche enriquecido en AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1) que tiene inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.
- 20 20. Producto alimenticio fabricado según la reivindicación 19, en el que el hidrolizado está enriquecido en uno o más de los péptidos ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4).
- 25 21. Producto alimenticio fabricado según la reivindicación 19 o la reivindicación 20, que es una preparado para lactantes, una bebida para deportistas, un producto que contiene queso, un complemento proteico, un complemento nutricional o un producto sustituto de comida.
22. Producto no alimenticio que comprende el hidrolizado según la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en el que el producto no alimenticio es un cosmético, una loción o un limpiador para su uso en piel humana.
- 30 23. Producto no alimenticio que comprende un hidrolizado que comprende al menos una de proteína de la leche hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que escinde preferencialmente en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico, comprendiendo el hidrolizado al menos una beta-lactoglobulina hidrolizada en la región entre los aminoácidos 55-98, teniendo el hidrolizado inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína y en el que el hidrolizado está enriquecido en al menos el péptido AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1).
- 35 24. Producto no alimenticio según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, que comprende un hidrolizado de proteínas del suero de la leche enriquecido en uno o más de los péptidos AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1), ILLQKWE (SEQ ID NO: 2), KTKIPAVFKID (SEQ ID NO: 3) o KTKIPAVFKIDALNE (SEQ ID NO: 4), que tiene inmunogenicidad reducida en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a una o más proteínas del suero de la leche.
- 40 25. Composición que comprende al menos dos hidrolizados según la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en la que cada hidrolizado se produce con al menos una enzima diferente que tiene una especificidad diferente.
- 45 26. Hidrolizado según la reivindicación 2, en el que la al menos una enzima proteolítica comprende una endopeptidasa adicional.
- 50 27. Hidrolizado según la reivindicación 26, en el que la endopeptidasa adicional es el número de registro principal P80057 de UniProtKB/Swiss-Prot.
- 55 28. Uso de al menos una enzima proteolítica que escinde preferencialmente en un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico y que escinde uno o más determinantes inmunológicos presentes en al menos una proteína de la leche y en el que dicha al menos una enzima proteolítica es una endopeptidasa y en el que la endopeptidasa no es una que tiene la secuencia de aminoácidos

```

          5      10      15      20      25      30
1  S V I G S D D R T R V T N T T A Y P Y R A I V H I S S S I G
31 S C T G W M I G P K T V A T A G H C I Y D T S S G S F A G T
61 A T V S P G R N G T S Y P Y G S V K S T R Y F I P S G W R S
91 G N T N Y D Y G A I E L S E P I G N T V G Y F G Y S Y T T S
121 S L V G T T V T I S G Y P G D K T A G T Q W Q H S G P I A I
151 S E T Y K L Q Y A H D T Y G G Q S G S P V F E Q S S S R T N
181 C S G P C S L A V H T N G V Y G G S S Y N R G T R I T K E V
211 F D N L T N W K N S A Q

```

en la fabricación de un hidrolizado que comprende al menos una proteína de la leche hidrolizada con al menos una enzima proteolítica cuyo hidrolizado comprende al menos una beta lactoglobulina hidrolizada en la región entre los aminoácidos 55-98 y en la que el hidrolizado está enriquecido en al menos el péptido AQSAPLRVYVE (SEQ ID NO: 1) para reducir la inmunogenicidad en un sujeto predispuesto a tener una reacción inmunitaria a la proteína.

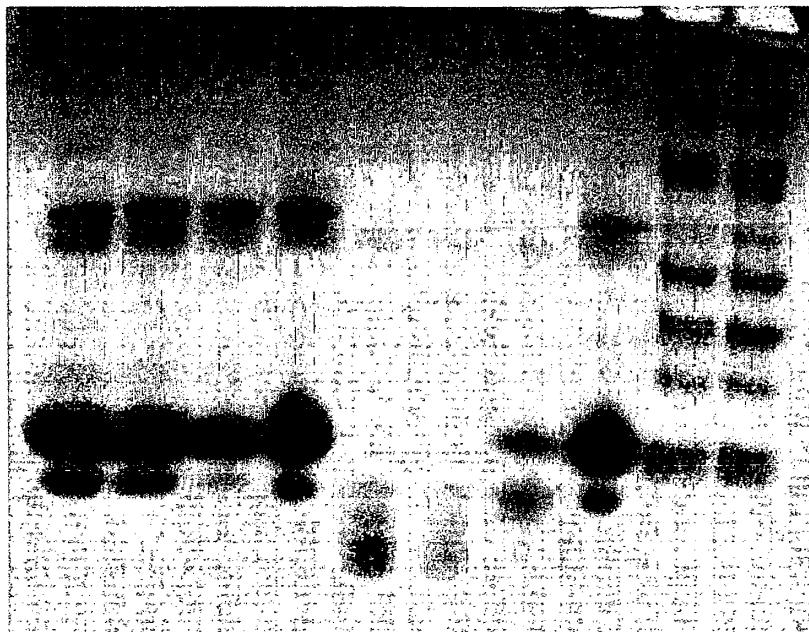


FIG. 1

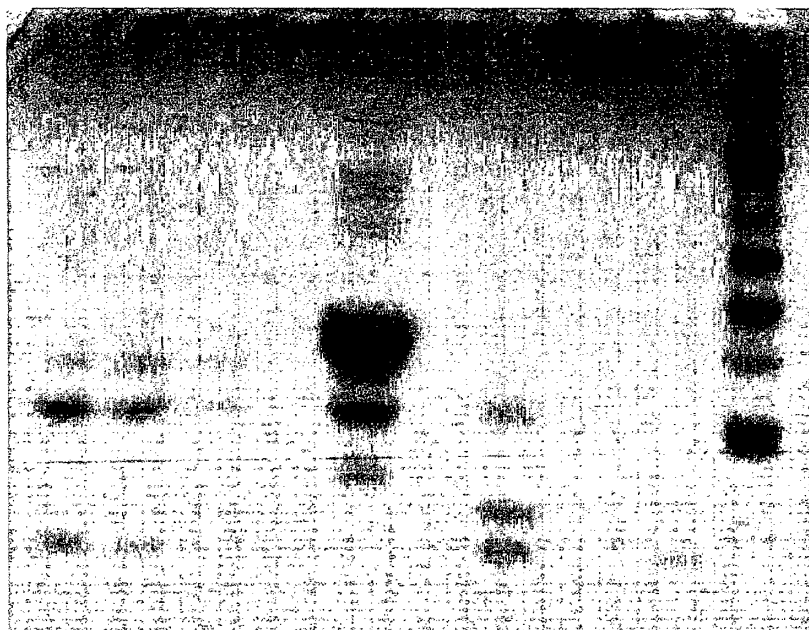
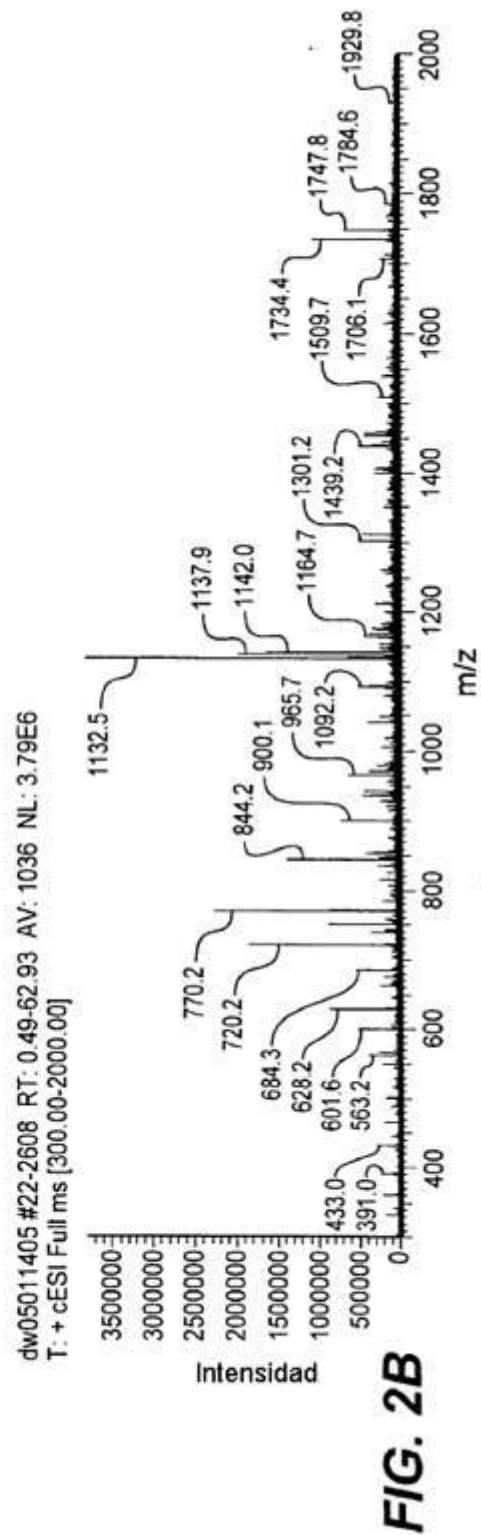
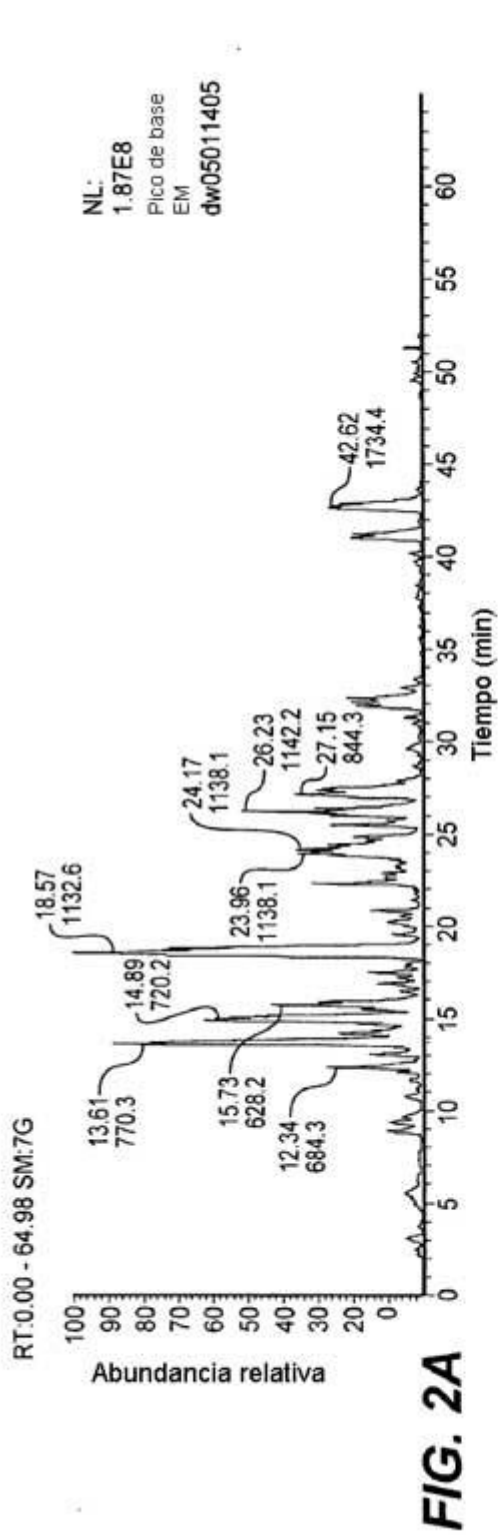


FIG. 4



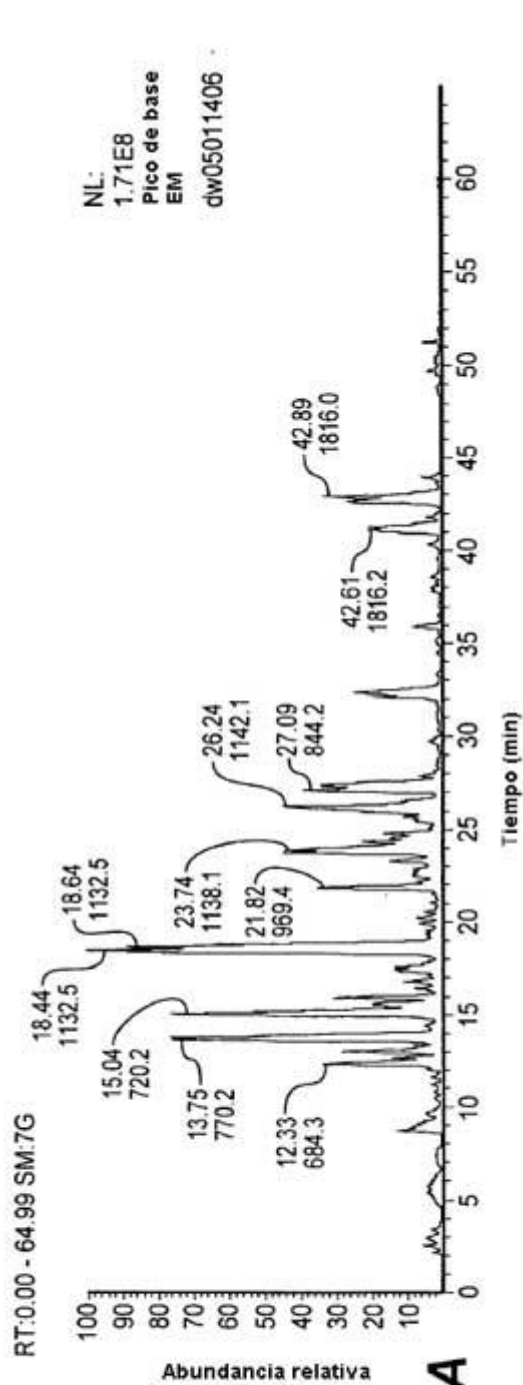


FIG. 3A

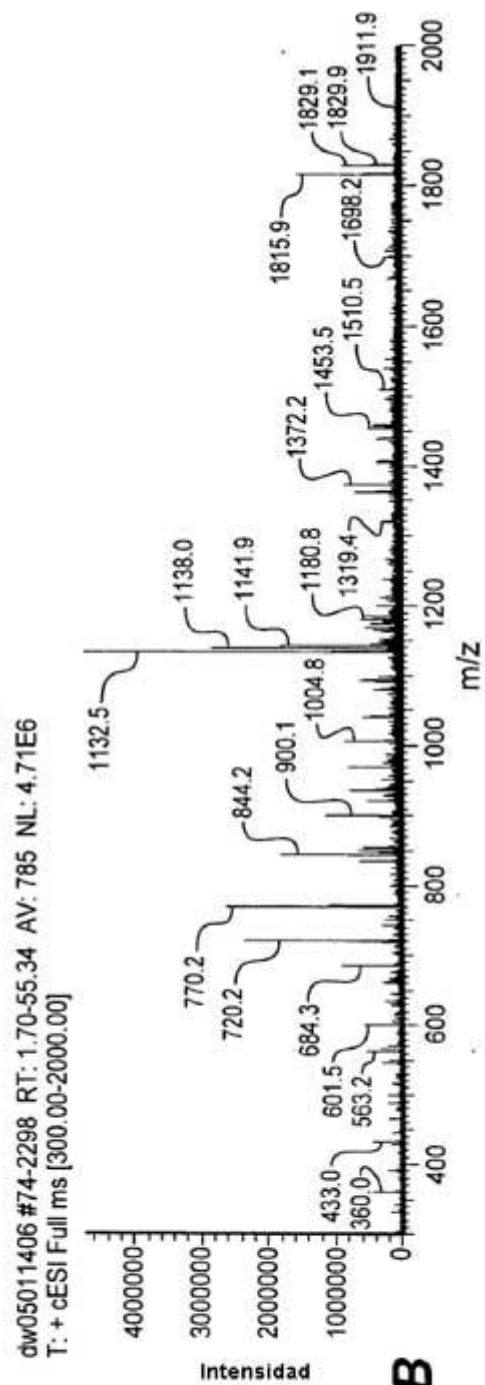


FIG. 3B

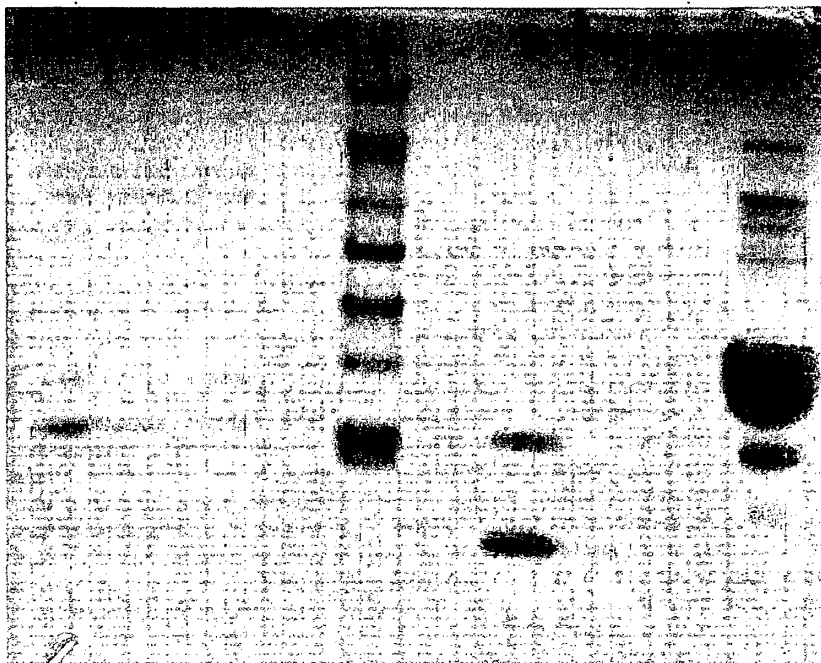


FIG. 5

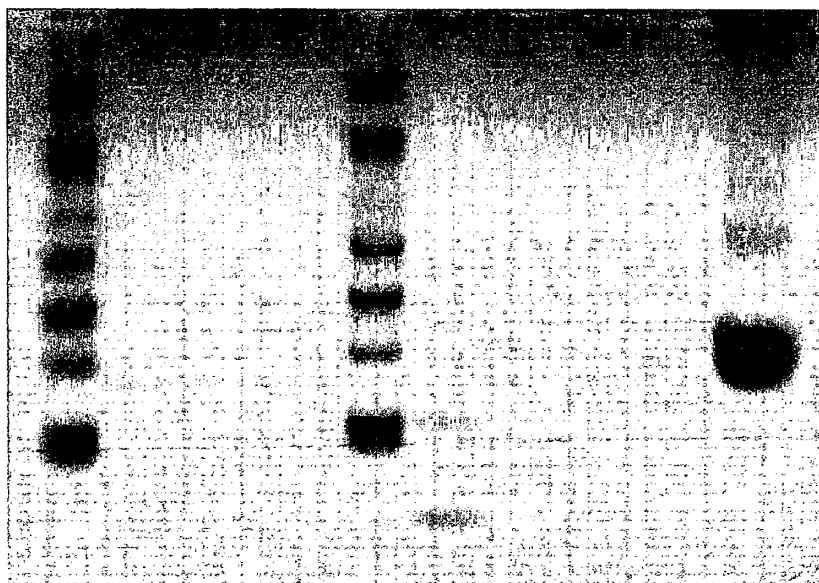


FIG. 6