

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 905**

51 Int. Cl.:

A61K 38/01 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A23L 29/281 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A23L 33/19 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011** E 11763711 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016** EP 2621507

54 Título: **Hidrolizados de proteínas lácteas y fórmulas infantiles y composiciones nutricionales hechas con ellos**

30 Prioridad:

01.10.2010 EP 10186222

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2016

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**AFFOLTER, MICHAEL;
BUREAU-FRANZ, ISABELLE;
MAYNARD, FRANÇOISE;
MERCENIER, ANNICK y
PANCHAUD, ALEXANDRE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 586 905 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 lácteas y fórmulas infantiles y composiciones nutricionales hechas con ellos

5 Referencia al listado de secuencias

Esta solicitud de patente contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador. El formato legible por ordenador se incorpora aquí por referencia.

10 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un hidrolizado de proteínas lácteas y que se pueden obtener tratando una solución de material proteico de leche con enzimas procedentes de una fuente microbiana. Las composiciones se pueden incorporar a fórmulas infantiles y a suplementos alimenticios para adultos. La presente invención se refiere a dos tipos diferentes de hidrolizados proteicos, destinados a la prevención y al tratamiento de alergias. En el primer caso se trata de niños sanos pero en riesgo de volverse alérgicos por el historial familiar de alergias. En el segundo caso se trata de niños o adultos alérgicos o en necesidad de tratamiento, y por lo tanto enfermos.

20 Antecedentes de la presente invención

La leche materna humana y la lactancia son la referencia incontestable de la nutrición infantil. Las fórmulas infantiles que sirven de sustituto o complemento de la leche materna humana deben satisfacer las necesidades nutricionales de los bebés, tener un sabor aceptable y ser hipoalérgicas y tolerógenas (es decir, capaces de inducir tolerancia oral) cuando van destinadas a niños con riesgo de contraer alergias. La inducción a la tolerancia oral de la leche de vaca se ha descrito en la patente EP0827697. Se sabe que las alergias a la leche de vaca y a las fórmulas infantiles que contienen proteína de leche de vaca se deben al hecho de que las proteínas de la leche de vaca difieren de las proteínas de la leche materna y pueden constituir alérgenos para los humanos. Los principales alérgenos conocidos de la leche de vaca son la alfa-lactoalbúmina (aLA), la beta-lactoglobulina (bLG) y la albúmina de suero bovino (ASB). La proteína del suero de leche bovina y/o la caseína se usan frecuentemente como fuente de proteína láctea en las fórmulas infantiles. Para reducir la alergenicidad, las proteínas de la leche de vaca se hidrolizan con enzimas degradándolas a péptidos. Las actuales fórmulas hipoalérgicas compuestas de estos hidrolizados de leche de vaca, diseñadas para evitar alergias, también contienen otros nutrientes, tales como aceites animales, aceites vegetales, almidón, maltodextrina, lactosa y sacarosa. Estos hidrolizados de proteínas también se pueden incorporar a una bebida láctea para adultos o a suplementos alimenticios.

El proceso de hidrólisis para preparar estos hidrolizados se debe controlar cuidadosamente para que el producto final hidrolizado mantenga su valor nutricional y las propiedades físicas deseadas, pero es hipoalérgico y tolerógeno.

40 Los hidrolizados se pueden caracterizar como "parciales" o "extensos" en función del grado hasta el cual se realiza la reacción de hidrólisis. Actualmente no hay ninguna definición legal/clínica acordada de productos extensamente hidrolizados según las directrices de la WAO (World Allergy Organization [*Organización mundial de alergia*]) para la alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV), pero conforme a la WAO se acepta que las fórmulas hidrolizadas han resultado ser una fuente proteica útil y ampliamente utilizada para los niños que padecen APLV. En la presente invención un hidrolizado parcial es aquel en el cual el 60% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular inferior a 1000 Daltons, mientras que en un hidrolizado extenso al menos el 95% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular inferior a 1000 Daltons. Estas definiciones se usan actualmente en la industria. Los hidrolizados parciales se consideran hipoalérgicos (HA), mientras que los hidrolizados extensos se consideran no alérgicos.

50 Muchos grupos han llevado a cabo investigaciones para optimizar el proceso de hidrólisis. Las condiciones de la reacción de hidrólisis, incluyendo la temperatura y el volumen del reactor, el número de ciclos de hidrólisis, la elección del substrato proteico, el tipo de enzima(s) y la concentración son algunos de los muchos factores que influyen en la reacción de hidrólisis y por lo tanto en las propiedades físicas, químicas y en definitiva biológicas del producto final. En la patente EP0353122 se usan mezclas de tripsina y quimotripsina con una relación de actividades de tripsina/quimotripsina entre 0,33 y 0,66 para preparar hidrolizados hipoalérgicos de proteína de suero de leche. Las patentes WO9304593 A1 y US5039532A también revelan un proceso de hidrólisis con el empleo de tripsina y quimotripsina, que incluye una reacción de hidrólisis en dos etapas, con una etapa intermedia de desnaturalización térmica, a fin de asegurar que el hidrolizado final esté sustancialmente libre de proteínas alérgicas. La tripsina y la quimotripsina usada en estos métodos son preparados obtenidos por extracción de páncreas porcino. En el mercado existen varios productos que contienen hidrolizados proteicos preparados a base de estos métodos. Por ejemplo, una fórmula infantil Nestle HA® se puede preparar con un hidrolizado producido mediante el empleo de tripsina y quimotripsina extraídas del páncreas de un animal y sus características hipoalérgicas han sido bien estudiadas y documentadas. Se han publicado tres importantes artículos que presentan los resultados de un amplio estudio experimental aleatorio y doble ciego realizado en Alemania, cuya finalidad era comparar el efecto de las fórmulas hidrolizadas con el de la fórmula estándar de leche de vaca para prevenir manifestaciones alérgicas, especialmente

5 el eccema atópico, en niños de riesgo. La publicación está registrada como sigue. Efecto de la fórmula de leche de vaca hidrolizada para prevenir alergias en el primer año de vida: Estudio experimental alemán de nutrición infantil, ensayo aleatorio doble ciego. Von Berg A, Koletzko S, Grübl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; German Infant Nutritional Intervention Study Group. J Allergy Clin Immunol. 2003 Mar; 111:533-40.

10 Las patentes WO2005/035747 y WO2004/072279 describen unas nuevas proteasas de origen microbiano. Ciertas fórmulas hidrolizadas disminuyen la incidencia de la dermatitis atópica pero no la del asma: resultados de tres años del Estudio experimental alemán de nutrición infantil. Von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Grübl A, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; German Infant Nutritional Intervention Study Group. J Allergy Clin Immunol. 2007 Mar; 119:718-25.

15 El efecto preventivo de las fórmulas infantiles hidrolizadas persiste hasta la edad de 6 años: resultados a largo plazo del Estudio experimental alemán de nutrición infantil (Estudio GINI). von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Krämer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, Koletzko S, Grübl A, Heinrich J, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; GINIplus study group, J Allergy Clin Immunodol 2008;121:1442-7.

20 La conclusión del último estudio GINI es que la intervención nutricional temprana con la fórmula infantil NAN HA® de Nestlé H.A. en niños de alto riesgo tiene un efecto preventivo duradero de la dermatitis atópica hasta la edad de 6 años, lo cual indica una disminución real de la enfermedad más que el retraso de su aparición.

25 El efecto preventivo duradero más allá del periodo de alimentación con NAN HA® demuestra que se ha inducido la tolerancia oral, aunque los mecanismos inmunológicos involucrados en esta inducción de tolerancia no han sido examinados en el estudio GINI.

30 Además de ser hipoalérgica, sería muy conveniente que la fórmula infantil diseñada como complemento o sustituto de la leche materna pudiera inducir la tolerancia oral del bebé. La tolerancia oral es la supresión específica de la reactividad inmunológica celular y/o humoral a un antígeno antes de administrarlo por vía oral. Es parte importante del desarrollo del sistema inmunitario durante los primeros seis meses de vida y permite al bebé alimentarse sin reacciones adversas. La falta de establecimiento de la tolerancia oral produce alergia. El desarrollo de la tolerancia oral está relacionado con la educación del sistema inmunitario y termina con una menor reacción a los antígenos alimentarios. Se cree que algunos péptidos que puedan estar específicamente presentes en una fórmula infantil parcialmente hidrolizada tienen la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario induciendo la tolerancia oral. Se cree que estos péptidos deberían tener unas propiedades particulares, incluyendo un tamaño relativamente pequeño, para soportar mejor la educación del sistema inmunitario sin actuar ellos mismos como alérgenos. Además se cree que las secuencias de los péptidos específicos pueden jugar un papel importante. Los perfiles peptídicos específicos del hidrolizado pueden estar realmente en la base de la inducción de la tolerancia oral.

40 Actualmente hay una tendencia generalizada a dejar el uso de enzimas procedentes de animales por el empleo de aquellos que provienen de fuentes microbianas. En los últimos 20 años se ha progresado mucho en el campo de la producción enzimática por ingeniería genética. Ello ha permitido preparar de forma reproducible grandes cantidades de enzimas de elevada calidad y pureza en un tiempo relativamente corto. Por estos motivos sería conveniente poder usar enzimas de una fuente microbiana para producir hidrolizados de proteína de leche destinados a fórmulas infantiles hipoalérgicas. También sería muy conveniente que estos hidrolizados de proteína de leche tuvieran la capacidad de inducir la tolerancia oral en los niños.

50 Por tanto, para mantener las propiedades hipoalérgicas de los hidrolizados derivados de enzimas de mamíferos, los producidos con enzimas microbianos deben poseer similares características químicas, físicas y biológicas. Además cualquier fórmula infantil nueva en el mercado es sometida a estrictas normas reguladoras, por ejemplo en Europa rige la directiva 2006/141/EC. En consecuencia es conveniente que cualquier producto nuevo tenga un perfil de péptidos muy similar al del producto ya validado, hecho con enzimas de mamíferos, a fin de mantener un efecto preventivo de las alergias. También sería muy conveniente que estos hidrolizados de proteína de leche tuvieran la capacidad de inducir la tolerancia oral en los niños.

55 Análogamente conviene promover la reducción de alergias o efectos adversos, potenciar la absorción de proteínas o aminoácidos, favorecer la utilización de proteínas o aminoácidos y/o modular los procesos inflamatorios en pacientes enfermos, sobre todo aportando hidrolizados especiales de proteínas a composiciones nutricionales completas.

60 Se necesita un hidrolizado de proteínas derivadas de la leche preparado por la acción de enzimas no mamíferos, preferiblemente mediante enzimas microbianos que tengan poca alergenicidad y al mismo tiempo la capacidad de inducir tolerancia oral.

65 Se necesita un hidrolizado que esté comprendido preferiblemente en una fórmula infantil y/o en una composición nutricional destinada a sujetos con riesgo de adquirir alergias.

Se necesitan composiciones que reduzcan el riesgo o la gravedad de alergias más adelante en la vida y que ayuden a modular la aparición de síntomas alérgicos.

5 Hay necesidad de obtener hidrolizados basados en enzimas bacterianos, con perfiles peptídicos que compartan algunas similitudes con los hidrolizados obtenidos mediante enzimas de mamíferos y que incluso sean capaces de reproducir las propiedades de tolerancia oral de aquéllos, con una prevención probada de los síntomas alérgicos.

10 Hay necesidad de usar los mismos enzimas arriba citados para preparar composiciones nutricionales destinadas a pacientes enfermos o delicados.

15 Además de producir hidrolizados "parciales", estos enzimas microbianos también se pueden utilizar para producir hidrolizados "extensos" de proteínas presentes en fórmulas terapéuticas tales como las destinadas a la alimentación de los bebés y niños alérgicos a la leche de vaca. En este caso la población diana estaría constituida por bebés y niños enfermos (alérgicos) ya sensibilizados a las proteínas de la leche de vaca.

20 Estos enzimas microbianos también se podrían usar para producir cualquier tipo de hidrolizados de proteína para productos destinados a bebés, niños y adultos con el fin de lograr otros beneficios no relacionados con las alergias, por ejemplo para facilitar la digestión, favorecer la absorción y metabolización de aminoácidos, péptidos y proteínas, promover la convalecencia, utilizar de manera óptima las fuentes de nitrógeno, facilitar la formación de los tejidos y la reserva de energías.

25 Para abordar este problema los presentes inventores han llevado a cabo un extenso programa de investigación y han comparado varios enzimas microbianos como posibles candidatos para realizar la reacción de hidrólisis. Se han controlado parámetros tales como el rendimiento de la reacción de hidrólisis, la especificidad de los enzimas y el perfil de pesos moleculares de los péptidos, y han determinado que hay varias mezclas de enzimas específicos que producen hidrolizados con las propiedades físicas, químicas y biológicas deseadas. Los hidrolizados de proteína de leche aquí revelados se pueden producir de modo eficiente y reproducible, tienen un sabor aceptable, tienen el valor nutricional requerido y son hipoalérgicos. Asimismo, los hidrolizados de la presente invención pueden inducir la tolerancia oral.

30 Resumen de la presente invención

35 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden hidrolizados de proteína láctea, los cuales se pueden obtener tratando una solución de material proteico de leche con

- a) al menos una endopeptidasa de tipo tripsina producida a partir de un microorganismo, y
- b) al menos una endopeptidasa de tipo quimotripsina producida a partir de un microorganismo;

40 donde dicha endopeptidasa de tipo tripsina procede de una cepa de *Kutzneria albida* y tiene una secuencia idéntica a la SEQ ID NO:1 del polipéptido maduro en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%; y donde dicha endopeptidasa de tipo quimotripsina procede de una cepa de *Nocardiosis Sp.* o de *Metarhizium anisopliae* y tiene una secuencia idéntica a las de EMBL CDS CAI94179 o TREMBL:Q9Y843 en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%.

50 Por sus características relativas al perfil de pesos moleculares de los péptidos, al perfil de las secuencias peptídicas (especificidad de las endopeptidasas) y a la eficiencia hidrolítica de las endopeptidasas, los hidrolizados según la presente invención tienen propiedades análogas a los hidrolizados de proteína láctea producidos mediante enzimas de mamíferos.

55 Los hidrolizados de la presente invención tienen efectos terapéuticos y preventivos y se pueden usar especialmente para inducir la tolerancia oral en niños o pacientes que la necesiten, o para disminuir el riesgo de alergias en niños o pacientes que lo necesiten, o para reducir la gravedad de las alergias durante la infancia o en la vida posterior, sobre todo en niños o pacientes que lo necesiten.

60 Los hidrolizados se pueden incorporar a una fórmula infantil inicial, a una fórmula de continuación, a una fórmula alimenticia para bebés, a una fórmula infantil de cereales, a una leche de crecimiento, a una composición nutricional para adultos o a una bebida a base de proteína láctea para adultos, pensando en sujetos que necesiten una terapia; este tipo de composición es preferiblemente una fórmula infantil inicial.

65 En otro aspecto de la presente invención la relación de endopeptidasas de tipo tripsina a endopeptidasas de tipo quimotripsina está comprendida en el intervalo de 5:1 hasta 35:1, preferiblemente de 20:1 hasta 30:1, con mayor preferencia 27:1, basada en el peso del enzima.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: separación de los hidrolizados del ejemplo 1 por cromatografía de exclusión de tamaño de los péptidos. Los péptidos se separan por su peso molecular (PM), utilizando una columna de cromatografía de exclusión de tamaños (Superdex Peptide 10/300 GL de GE). La elución de los péptidos es controlada por UV a 215 nm. Los resultados demuestran que las distribuciones de tamaño de las combinaciones 2, 4 y 6 se parecen mucho al PTN de referencia (ensayo 1, ver texto), tal como indica el brusco descenso desde alto hasta bajo peso molecular, en comparación con las combinaciones 3 y 5, donde este descenso es menos pendiente (ver línea de tendencia). Estos resultados sugieren que la eficiencia enzimática de los ensayos 2, 4 y 6 genera una población de péptidos de tamaño muy similar, mientras que en 3 y 5 hay más péptidos de menor tamaño respecto a la referencia.

Fig. 2: análisis de la especificidad enzimática de los hidrolizados del ejemplo 1. Las secuencias peptídicas están identificadas por LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap MS con bombas de HPLC Allegro de Thermo Scientific). De cada secuencia identificada se extraen los cinco aminoácidos antes y después del punto de escisión (posición - 1) y se construye un gráfico de frecuencia (o de conservación de secuencia). Los aminoácidos están representados desde la frecuencia más alta (arriba) hasta la frecuencia más baja (abajo), siendo su tamaño vertical proporcional a su frecuencia. Los resultados demuestran que las mezclas de enzimas utilizadas en los ensayos 4 y 6 tienen una especificidad enzimática comparable con el PTN de referencia (ensayo 1).

Fig. 3: cinética del consumo de OH⁻ durante las reacciones de hidrólisis del ejemplo 1 (µmoles de OH⁻ consumido / g de proteína).

Descripción detallada de la presente invención

Los hidrolizados de proteína láctea según la presente invención se obtienen tratando una solución de un material proteico de leche con una endopeptidasa de tipo tripsina y una endopeptidasa de tipo quimotripsina, procedentes de una fuente microbiana.

Material proteico de leche

En las composiciones según la presente invención el material de partida es un material proteico de leche. Puede ser un material proteico a base de suero de leche, caseína o mezclas de material proteico de suero de leche y caseína. La fuente de caseína puede ser caseína ácida o sólidos de leche no grasa. El material proteico de suero de leche puede ser un suero procedente de la elaboración de queso, en particular un suero dulce como el resultante de la coagulación de caseína con cuajo, un suero ácido procedente de la coagulación de caseína con un ácido o con fermentos acidificantes, o incluso un suero mixto resultante de la coagulación con un ácido y cuajo. Este material de partida puede ser suero de leche desmineralizado por intercambio iónico y/o por electrodiálisis, y se conoce como proteína de suero de leche desmineralizado (PSLD). En una forma de ejecución preferida la fuente del material de partida basado en proteína de suero de leche es un suero dulce del cual se ha eliminado total o parcialmente el caseíno-glicomacropéptido (CGMP). Este material se llama suero de leche dulce modificado (SLDM). Al eliminar el CGMP del suero de leche dulce se obtiene un material proteico con un contenido de treonina y triptófano parecido al de la leche humana. En la patente EP 880902 se describe un proceso para eliminar CGMP del suero de leche dulce.

El material de partida puede ser una mezcla de PSLD y SLDM. Puede ser un concentrado de proteínas de suero de leche con 35-80 % de proteína (CPSL) o un producto aislado si la concentración de proteína de suero de leche es superior al 95% de proteína (APSL). Como ejemplo de CPSL se puede citar el producto WPC 87 Lacprodan® de Aria Foods, Dinamarca, y como ejemplo de APSL el producto Bipro® de Davisco Foods International (Minnesota USA).

El material proteico de leche puede estar en solución o en suspensión y se encuentra a una concentración del 2-30% en peso de material proteico, con mayor preferencia del 5-20%, con mayor preferencia del 6-10%.

El material de partida puede ser incluso una combinación de los materiales de partida arriba citados con lactosa. La lactosa puede estar presente como parte del concentrado de proteínas de suero de leche o se puede incorporar. La adición de lactosa al material de partida de la hidrólisis tiene la ventaja de que cualquier resto de proteína contenido en la lactosa es hidrolizado. La lactosa puede hallarse a concentraciones del 0,05 - 30% p/p, preferiblemente del 0,10 - 20% p/p, o si se prefiere un contenido más bajo de lactosa, del 0,10 al 1%, preferiblemente del 0,10 al 0,20% (p/p). En este último caso el producto final se puede destinar a niños o adultos con baja tolerancia a la lactosa. La lactosa se puede eliminar, por ejemplo, por ultrafiltración (dando suero de leche UF), seguida opcionalmente de diálisis.

El material de partida puede estar en forma de una solución acuosa verdadera o coloidal, o en forma de polvo. En el último caso el polvo se disuelve en agua preferiblemente desmineralizada para formar una solución acuosa.

Enzimas producidos por un microorganismo

La endopeptidasa de tipo tripsina y la endopeptidasa de tipo quimotripsina según la presente invención se pueden producir a partir de un microorganismo. Aquí "producido a partir de" significa obtenido por fermentación de una célula

del organismo indicado. Estas enzimas pueden ser nativos del organismo a partir del cual son producidos o pueden formarse por ingeniería genética en un organismo huésped, insertándole la secuencia de nucleótidos que codifica la endopeptidasa.

5 Endopeptidasa de tipo tripsina

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una serina proteasa que se encuentra en el sistema digestivo de muchos vertebrados, donde hidroliza proteínas. Es producida en el páncreas como el proenzima tripsinógeno inactivo. La tripsina corta cadenas de péptidos o se une principalmente al extremo carboxílico de los aminoácidos lisina o arginina, excepto cuando ambos van seguidos de prolina. En la presente invención se entiende por "endopeptidasa de tipo tripsina" un enzima que tiene una actividad similar a la actividad de la tripsina de los mamíferos, como p.ej. la tripsina extraída de tejido pancreático porcino. Por "endopeptidasa de tipo tripsina" también se entiende una endopeptidasa que corta preferentemente péptidos o proteínas por el extremo C-terminal del isómero L de arginina y/o lisina, preferiblemente de arginina y lisina.

La endopeptidasa de tipo tripsina proviene de una bacteria gram positiva, la *Kutzneria albida*. La endopeptidasa de tipo tripsina tiene una secuencia idéntica a la SEQ ID NO:1 del polipéptido maduro en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%.

La concentración de endopeptidasa de tipo tripsina puede ser de 100-500.000 unidades USP de tripsina por g de proteína alimentaria, p.ej. de 250-250.000 o 500-100.000. Una unidad USP de tripsina es la actividad que produce un cambio de absorbancia de 0,003 a 253 nm, pH 7,6 y 25°C, usando N-benzoil-L-arginina etil éster hidrocloreuro (BAEE) como sustrato.

Por otra parte, expresada como mg de proteína enzimática de pureza > 95% / ml, significa que la concentración de endopeptidasa de tipo tripsina puede variar entre 0,5 y 4, preferiblemente entre 1 y 3,5 y con mayor preferencia entre 1,5 y 3 mg por g de proteína láctea. Esto es independiente de la presencia de endopeptidasa de tipo quimotripsina.

Los enzimas: endopeptidasa de tipo quimotripsina

La quimotripsina (EC 3.4.21.4) es una serina proteasa que corta preferentemente enlaces amido peptídicos cuando al lado carboxílico del enlace amido (la posición P₁) hay tirosina, triptófano o fenilalanina. La quimotripsina también hidroliza otros enlaces amido de péptidos a velocidades inferiores, en particular de los que contienen leucina en la posición P₁. Por "endopeptidasa de tipo quimotripsina" se entiende un enzima que tiene una actividad similar a la actividad de la quimotripsina de los mamíferos, como p.ej. la quimotripsina extraída de tejido pancreático porcino. Asimismo se refiere a un enzima que tiene una mayor especificidad para cortar por el extremo carboxi-terminal de cada resto de tirosina, fenilalanina, triptófano, leucina, metionina e histidina que para cortar por el extremo carboxi-terminal de arginina y lisina.

Según una forma de ejecución la quimotripsina proviene de una cepa *Nocardiosis*, preferiblemente de *Nocardiosis* sp. EMBL CDS CAI94179 (descrita con anterioridad en la patente WO 88/03947, p.ej.). La endopeptidasa de tipo quimotripsina tiene una secuencia idéntica a EMBL CDS CAI94179 en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%.

En otra forma de ejecución la endopeptidasa de tipo quimotripsina proviene de *Metarhizium anisopliae*, y tiene p.ej. la secuencia de aminoácidos TREMBL:Q9Y843 del polipéptido maduro. La endopeptidasa de tipo quimotripsina tiene una secuencia idéntica a TREMBL:Q9Y843 en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%.

La concentración de la endopeptidasa de tipo quimotripsina es preferiblemente de 100-100.000 unidades USP de quimotripsina por g de proteína láctea, con mayor preferencia 500-50.000 y sobre todo 1.000-20.000. Una unidad USP de quimotripsina es la actividad que produce un cambio de absorbancia de 0,0075 a 237 nm, pH 7,0 y 25°C, empleando N-acetil-L-tirosina etil éster (ATEE) como sustrato. Por otra parte, expresada como mg de proteína enzimática de pureza > 95% / ml, significa que la concentración de endopeptidasa de tipo quimotripsina puede variar entre 0,05 y 2, preferiblemente entre 0,1 y 1 y con mayor preferencia entre 0,15 y 0,4 mg por gramo de proteína láctea. Esto es independiente de la presencia de endopeptidasa de tipo tripsina.

Durante el proceso de hidrólisis los enzimas se usan conjuntamente como mezcla. Por ejemplo, la endopeptidasa de tipo tripsina procedente de *Kutzneria albida* se puede combinar con endopeptidasa de tipo quimotripsina procedente de *Nocardiosis* sp o de *Metarhizium anisopliae*.

Los presentes inventores han encontrado que la relación de endopeptidasa de tipo tripsina a endopeptidasa de tipo quimotripsina (relación T/Q) debería estar comprendida en el intervalo de 5:1 hasta 35:1, preferiblemente de 20:1 hasta 30:1, con mayor preferencia 27:1, basada en el peso del enzima.

Esto es particularmente cierto para el caso de la endopeptidasa de tipo tripsina (T) procedente de *Kutzneria albida* combinada con la endopeptidasa de tipo quimotripsina (Q) procedente de *Nocardioopsis*, en una relación T/Q de 27:1.

Proceso de hidrólisis:

- 5 Las condiciones típicas para la realización del proceso de hidrólisis han sido descritas en el estado técnico previo. La temperatura puede variar aproximadamente entre 40°C y 60°C, preferiblemente tiene lugar a 50°C, el tiempo de la reacción entre 1 y 6 horas, preferiblemente 4 horas, y los valores del pH pueden estar comprendidos en el intervalo de 6,5 hasta 8,5, preferiblemente de 7,0 hasta 8,0. El pH se puede ajustar con agentes conocidos, como por ejemplo
- 10 $\text{Ca}(\text{OH})_2$. En los documentos US5039532 o EP0631731A1 se describe una reacción de hidrólisis de dos etapas, con una etapa intermedia de desnaturalización para asegurar que el hidrolizado final quede sustancialmente exento de alérgenos de proteína láctea. La etapa intermedia de desnaturalización se realiza preferiblemente a 95°C durante 5 minutos.
- 15 Opcionalmente la solución o suspensión de proteína láctea se pueden precalentar (por ejemplo a 80-100°C durante 5-30 minutos o a 130°C durante unos 30-60 segundos), a fin de asegurar la desnaturalización de las proteínas del suero de la leche, como p.ej. la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la albúmina de suero bovino (ASB).
- 20 Independientemente de cómo se efectúe la hidrólisis, el producto de la misma pasa por un tratamiento térmico que inactiva el enzima promotor de la hidrólisis. Este tratamiento térmico comprende el precalentamiento del hidrolizado a una temperatura igual o superior a 75°C y su mantenimiento a esta temperatura (preferiblemente a 75°C-85°C) durante 0,1 a 30 minutos, con el fin de promover la autodigestión del enzima. Después de este tratamiento tiene lugar ventajosamente una esterilización, preferiblemente a temperatura ultra-elevada, por ejemplo a 125°C-135°C durante 30 segundos hasta 3 minutos, mediante inyección de vapor o un intercambiador de calor.
- 25 El hidrolizado así obtenido se puede clarificar, filtrar o ultra-filtrar. También se puede concentrar. Después se puede secar, por ejemplo por liofilización, pulverización o congelación, para diferentes aplicaciones o bien se puede seguir tratando. En este último caso el enzima se puede inactivar durante el tratamiento subsiguiente.
- 30 Los hidrolizados de la presente invención pueden tener un grado de hidrólisis caracterizado por el % de NNP/NT, que significa nitrógeno no proteico dividido por el nitrógeno total x 100. El nitrógeno no proteico es nitrógeno amínico libre para reaccionar con un reactivo tal como el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). El % de NNP/NT se puede medir tal como está detallado en Adler-Nissen J., 1979, J. Agric. Food Chem., 27 (6), 1256-1262. En general los hidrolizados extensos se caracterizan por tener un % de NNP/NT mayor del 95%, mientras que un hidrolizado parcial se caracteriza por tener un % de NNP/NT comprendido en el intervalo del 75%-85%. En una forma de ejecución
- 35 preferida los hidrolizados de la presente invención tienen un % de NNP/NT comprendido en el intervalo del 70-90%, preferiblemente del 75 al 85%. Estos últimos hidrolizados son "parciales". Dichos hidrolizados también se pueden caracterizar porque el 60-70% de su población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular < 1000 Daltons.
- 40 En otra forma de ejecución preferida en la cual se desean hidrolizados "extensos", los hidrolizados de la presente invención tienen un % de NNP/NT comprendido en el intervalo superior al 95%. Estos hidrolizados también se pueden caracterizar porque al menos el 95% de su población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular < 1000 Daltons.
- 45 Los hidrolizados de la presente invención pueden tener un grado de hidrólisis caracterizado por el % de NNP/NT. El nitrógeno no proteico respecto al nitrógeno total se usa en general como medida de los péptidos solubles creados por hidrólisis enzimática. El método analítico empleado para medir el NNP es equivalente al método 991.21 de la AOAC. En los hidrolizados basados al 100% en proteína de suero de leche el contenido de NNP/NT suele estar comprendido en el intervalo del 70-90%. En una forma de ejecución preferida los hidrolizados de la presente
- 50 invención tienen un % de NNP/NT comprendido en el intervalo del 70-90%, preferiblemente del 75 al 85%. En otra forma de ejecución preferida en la cual se desea un hidrolizado extenso, los hidrolizados de la presente invención tienen un % de NNP/NT comprendido en el intervalo superior al 95%.
- 55 La distribución de pesos moleculares de los péptidos en el hidrolizado proteico resultante se puede determinar p.ej. por cromatografía de exclusión de tamaños (CET). En una forma de ejecución preferida el hidrolizado de la presente invención es un hidrolizado parcial en que menos del 1% en peso tiene un peso molecular mayor de 20.000 kDa. En una forma de ejecución más preferida los hidrolizados de la presente invención tienen una distribución ponderal de los péptidos similar a la de los hidrolizados obtenidos con enzima de mamíferos, en particular con enzima porcino, como por ejemplo el PTN 6.0S® (también conocido como PTN) de Novozyme (Dinamarca) (ver ejemplo 1, figura 1).
- 60 Este enzima de referencia es una tripsina extraída de páncreas de cerdo, que contiene tripsina como componente principal, pero también quimotripsina residual. Tiene una actividad de tripsina de 1350 USP de tripsina/g y una actividad de quimotripsina de 80 actividades USP de quimotripsina/g, lo cual da una relación T/Q de 16 basada en las actividades.
- 65 La especificidad enzimática de las mezclas de enzimas usadas durante la hidrólisis se puede evaluar secuenciando los péptidos comprendidos en el hidrolizado resultante. Las secuencias peptídicas se identifican por LC-MS/MS. En

una forma de ejecución más preferida los hidrolizados de la presente invención tienen una especificidad enzimática parecida a la de los hidrolizados obtenidos con enzima de mamíferos, en particular con enzima porcino, como por ejemplo el PTN 6.0S anteriormente descrito (ver ejemplo 1, figura 2).

5 La eficiencia de la hidrólisis se puede evaluar midiendo el consumo de álcali (OH) durante la hidrólisis. En una forma de ejecución preferida los hidrolizados de la presente invención tienen un rendimiento de hidrólisis parecido al de los hidrolizados obtenidos con enzima de mamíferos, en particular con enzima porcino, como por ejemplo el PTN arriba descrito (ver ejemplo 1, figura 3).

10 La antigenicidad residual de los hidrolizados se puede evaluar mediante inmunoensayos tales como las pruebas ELISA. Los hidrolizados de la presente invención tienen preferiblemente un contenido residual de β -lactoglobulina (BLG) < 3 mg de equivalente de BLG/g de equivalente proteico, con mayor preferencia < 2 mg de equivalente de BLG/g de equivalente proteico, sobre todo < 1 mg de equivalente de BLG/g de equivalente proteico (ver ejemplo 1).

15 Los hidrolizados de la presente invención se pueden añadir a una fórmula infantil, a una fórmula de continuación, a un producto alimenticio para bebés, a cereales para niños, a una leche de crecimiento, a un suplemento alimenticio para bebés o niños o a una composición nutricional para adultos, y todos estos preparados están diseñados para la prevención o el tratamiento de las alergias, así como para cualquier otro beneficio que los hidrolizados proteicos puedan aportar a las personas. Dicha composición es preferiblemente una fórmula infantil inicial.

20 En una forma de ejecución de la presente invención los hidrolizados de la misma se usan en combinación con probióticos escogidos, por ejemplo en fórmulas infantiles. Los probióticos seleccionados pueden ser cualquiera de los empleados corrientemente en fórmulas infantiles. Los probióticos son preferiblemente aquellos que son capaces de aportar un efecto adicional o sinérgico en las alergias y/o en la inducción de la tolerancia oral y/o en los procesos inflamatorios.

25 Como ejemplos adecuados de microorganismos probióticos utilizables en la presente invención cabe citar levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, hongos como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Penicillium* y *Torulopsis* y bacterias como los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*. Como ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados cabe citar: *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei Shirota*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus GG*), *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus* y *Staphylococcus xylosum*.

40 Las cepas preferidas de bacterias probióticas incluyen *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, que se puede adquirir de Valio Oy de Finlandia con la marca comercial LGG; *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, que se pueden adquirir de BioGaia AB; *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, vendido entre otras por la compañía Christian Hansen de Dinamarca con la marca comercial Bb 12 y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 vendido por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca comercial BB536.

45 Cuando las composiciones de la presente invención contienen probióticos, su proporción es preferiblemente de 10^3 hasta 10^{12} ufc/g, con mayor preferencia de 10^6 hasta 10^{11} ufc/g, aún más preferiblemente de 10^4 hasta 10^9 ufc/g, sobre todo de 10^7 hasta 10^9 ufc/g de composición o por ml de composición.

EJEMPLOS:

55 Ejemplo 1. Se llevó a cabo una serie de reacciones de hidrólisis usando el mismo sustrato proteico de leche y un conjunto de 6 soluciones enzimáticas consistentes en una solución estándar de PTN y cinco mezclas diferentes de endopeptidasas de tripsina y quimotripsina conforme a la tabla 1. Como material de partida se usaron 500 ml de una solución de sustrato proteico de leche MWP28/DWP28 en una relación 83/17 basada en el peso de proteína. La composición final del sustrato es de un 27,7% de sólidos totales, 8% de proteína y 18,48% de lactosa.

60 El sustrato proteico se disolvió formando una disolución al 8% p/v en agua. Para la reacción se usó un volumen total de 500 ml. La temperatura se equilibró a 55°C. Luego el pH se ajustó a 7,4 con solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 10%. Tras la adición de enzima (la mitad de todo el enzima útil para la 1ª etapa de hidrólisis) el pH se mantuvo constante a 7,4 añadiendo NaOH 0,25 M con un valorador automático DL50 Graphix (de Mettler Toledo) durante 4 h a 55°C. El hidrolizado se calentó durante 5 minutos a 93°C. Después de equilibrar la temperatura a 55°C se introdujo más enzima (la mitad de todo el enzima para la 2ª etapa de hidrólisis) y el pH se mantuvo como arriba. Tras 2 horas de hidrólisis se detuvo la reacción enzimática por tratamiento térmico (5 minutos a 85°C) para inactivar los enzimas.

La tabla 1 muestra las series de ensayos realizados con las distintas relaciones de enzimas. TL1 y TL2 representan respectivamente las endopeptidasas de tipo tripsina procedentes de *Fusarium oxysporum* y *Kutzneria albida*. CTL2 y CTL3 representan respectivamente las endopeptidasas de tipo quimotripsina procedentes de *Metarhizium anisopliae* y *Nocardioopsis sp.*

5

Ensayo	Enzima (mg/g de proteína)	Relación T/Q (p/p)
Nº 1	PTN	16*
Nº 2	TL1 + CTL3 (1,8 + 0,2)	9
Nº 3	TL2 + CTL3 (1,8 + 0,3)	6
Nº 4	TL2 + CTL3 (2,7 + 0,1)	27
Nº 5	TL2 + CTL2 (1,8 + 0,6)	3
Nº 6	TL1 + CTL3 (2,7 + 0,1)	27
La relación 16* está basada en la actividad enzimática		

Los seis hidrolizados producidos se analizaron por tres métodos distintos: cromatografía de exclusión de tamaño de los péptidos, análisis de la especificidad enzimática y antigenicidad residual. La eficiencia de la hidrólisis de las seis reacciones se analizó controlando el consumo de OH⁻. Los resultados están representados respectivamente en las figuras 1-3.

10

Antigenicidad: la antigenicidad residual de los hidrolizados se analizó mediante un inmunoensayo enzimático comercial (RIDASCREEN β-Lactoglobulin (BLG), r-biopharm), diseñado para cuantificar la β-lactoglobulina nativa y procesada en productos alimenticios. Los pocillos del microvalorador se recubren con BLG. Se añaden patrones, soluciones de muestra y anticuerpos anti-BLG. La BLG libre e inmovilizada compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Después del lavado se añaden anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa, que se unen a los complejos de anticuerpo-BLG. Luego en una etapa de lavado se elimina cualquier conjugado de enzima no fijado. Se agrega sustrato enzimático y cromógeno a los pocillos. El conjugado de enzima fijado convierte el cromógeno incoloro en un producto coloreado. La medición se lleva a cabo fotométricamente y la absorción es inversamente proporcional a la concentración de BLG en la muestra.

15

20

Los seis hidrolizados analizados en el ejemplo 1 mostraron todos ellos un contenido residual de β-lactoglobulina (BLG) inferior a 0,85 mg de equivalente de BLG/g de equivalente proteico, el cual es mucho más bajo que el nivel al que una fórmula infantil puede declararse hipoalérgica según lo indicado por la directiva europea 2006/125/CE sobre fórmulas infantiles, publicada el 5 de diciembre de 2006, JO 6.12.2006 L339/16. La directiva exige que el contenido de proteína inmunorreactiva sea inferior al 1% del total de sustancias nitrogenadas. Esto equivale a 3 mg de β-lactoglobulina residual (BLG / g de equivalente proteico). La BLG constituye aproximadamente del 30% al 50% de todo el material inmunorreactivo en el suero de leche. Por tanto un nivel de BLG inferior a 3 mg de β-lactoglobulina residual/g de equivalente proteico indica que el producto no contiene más del 1% de proteína inmunorreactiva. Este nivel es congruente con el anexo IV de la directiva 2006/125/CE de la Comisión europea, la cual estipula ciertas condiciones para reivindicar que una fórmula infantil reduce el riesgo de adquirir alergias.

25

30

Conclusión:

Se han identificado varias mezclas de endopeptidasas de tipo tripsina y endopeptidasas de tipo quimotripsina procedentes de fuentes microbianas, que sirven para producir hidrolizados de proteína láctea con unas propiedades similares a las de los hidrolizados producidos mediante enzimas de mamíferos. Los presentes inventores han llevado a cabo una serie de ensayos para evaluar la relación óptima de enzimas que da lugar a unos hidrolizados con las propiedades físicas, químicas y biológicas deseadas. Se varió la fuente bacteriana y la relación de endopeptidasas de tipo tripsina a endopeptidasas de tipo quimotripsina (basada en el peso de las enzimas), así como la relación de enzima a sustrato proteico y la temperatura.

35

40

Se encontró que una mezcla de endopeptidasa de tipo tripsina procedente de *Kutzneria albida* en combinación con una endopeptidasa de tipo quimotripsina procedente de *Nocardioopsis sp* o de *Metarhizium anisopliae* era una buena posibilidad para sustituir los enzimas de mamíferos usualmente empleados. Se ha demostrado claramente que las mezclas de la presente invención, sobre todo usando relaciones específicas de endopeptidasa de tipo tripsina a endopeptidasa de tipo quimotripsina, proporcionan unos perfiles peptídicos muy similares a los producidos con los enzimas de mamíferos.

45

Esto es particularmente cierto para el caso de la endopeptidasa de tipo tripsina (T) procedente de *Kutzneria albida* combinada con la endopeptidasa de tipo quimotripsina (Q) procedente de *Nocardioopsis* en una relación T/Q de 27:1.

50

Los hidrolizados producidos de esta forma tienen poca alergenicidad. Pueden reducir el riesgo de contraer alergias más adelante en la vida y pueden ser adecuados para incorporarlos a una fórmula infantil y/o a una composición nutricional destinada a sujetos sanos con riesgo de adquirir alergias. Son adecuados para incorporar a cualquier tipo de suplemento alimenticio para adultos, niños o bebés. También pueden tener la capacidad de inducir la tolerancia oral.

55

Aparte del aspecto de la prevención de alergias, las mezclas de tripsina y quimotripsina procedentes de fuentes microbianas se pueden utilizar para elaborar productos terapéuticos tales como los destinados a alimentar sujetos alérgicos. También se pueden usar para producir cualquier tipo de hidrolizados proteicos destinados a proporcionar otros beneficios distintos de la prevención/tratamiento de las alergias.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

10

15

- <110> NESTEC S.A.
- <120> HIDROLIZADOS PROTEICOS LÁCTEOS
- <130> 11148
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 225
- <212> PRT
- <213> Kutzneria albida
- <400> 1

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

ES 2 586 905 T3

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Glu Ala Gly Tyr Pro Gly
195 200 205

Val Tyr Thr Arg Val Ala Thr Tyr Ser Ser Leu Ile Thr Gln Gln Leu
210 215 220

Gly
225

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende hidrolizados de proteína láctea, los cuales se pueden obtener tratando una solución de material proteico de leche con
- 5 a) al menos una endopeptidasa de tipo tripsina procedente de un microorganismo, y
b) al menos una endopeptidasa de tipo quimotripsina procedente de un microorganismo,
- 10 para inducir la tolerancia oral en niños o pacientes que la necesiten, o para disminuir el riesgo de alergias en niños o pacientes que lo necesiten, o para reducir la gravedad de las alergias durante la infancia o en la vida posterior, sobre todo en niños o pacientes que lo necesiten,
- 15 donde dicha endopeptidasa de tipo tripsina procede de una cepa de *Kutzneria albida* y tiene una secuencia idéntica a la SEQ ID NO:1 del polipéptido maduro en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%;
y donde dicha endopeptidasa de tipo quimotripsina procede de una cepa de *Nocardioopsis Sp.* o de *Metarhizium anisopliae* y tiene una secuencia idéntica a las de EMBL CDS CAI94179 o TREMBL:Q9Y843 en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%.
- 20 2. Composición para usar según la reivindicación 1, caracterizada porque la relación de endopeptidasa de tipo tripsina a endopeptidasa de tipo quimotripsina está comprendida en el intervalo de 5:1 hasta 35:1, preferiblemente de 20:1 hasta 30:1, con mayor preferencia 27:1, basada en el peso del enzima.
- 25 3. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el material proteico de leche es proteína de suero de leche, caseína o mezclas de ambas, preferiblemente con una relación en peso de suero de leche/caseína de al menos 50/50, 60/40 o 70/30 y con mayor preferencia el material proteico de leche es proteína de suero de leche.
- 30 4. Composición para usar según la reivindicación 3, caracterizada porque el material proteico de leche es proteína de suero de leche dulce, del cual preferiblemente se ha eliminado total o parcialmente el caseíno-glicomacropéptido, o bien es un producto aislado de proteína de suero de leche o una mezcla de estas fuentes proteicas.
- 35 5. Composición para usar según la reivindicación 3 o 4, caracterizada porque el material proteico de leche es una mezcla de suero de leche dulce, del cual se ha eliminado total o parcialmente el caseíno-glicomacropéptido, y proteína de suero de leche desmineralizado.
- 40 6. Composición que comprende un hidrolizado de proteína de leche, la cual se pueden obtener tratando una solución de material proteico de leche con
- 45 a) al menos una endopeptidasa de tipo tripsina, procedente de una cepa de *Kutzneria albida*, que tiene una secuencia idéntica a la SEQ ID NO:1 del polipéptido maduro en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%, y
b) al menos una endopeptidasa de tipo quimotripsina, procedente de una cepa de *Nocardioopsis Sp.* o de *Metarhizium anisopliae*, que tiene una secuencia idéntica a las de EMBL CDS CAI94179 o TREMBL:Q9Y843 en al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al 100%.
- 50 7. Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque la relación de endopeptidasa de tipo tripsina a endopeptidasa de tipo quimotripsina está comprendida en el intervalo de 5:1 hasta 35:1, preferiblemente de 20:1 hasta 30:1, con mayor preferencia 27:1, basada en el peso del enzima.
- 55 8. Composición según una de las reivindicaciones 6 o 7 o para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizada porque el contenido de lactosa en el hidrolizado proteico está comprendido en el intervalo del 0,05 - 30% p/p, preferiblemente del 0,10 - 20% p/p, con mayor preferencia del 0,10 al 0,20% (p/p).
- 60 9. Composición según una de las reivindicaciones 6 a 8 o para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, la cual es una fórmula infantil, una fórmula de continuación, una fórmula alimenticia para bebés, una fórmula de cereales para niños o una leche de crecimiento, un suplemento alimenticio para bebés o niños o una composición nutricional para adultos, diseñada para la prevención o el tratamiento de las alergias, y preferiblemente dicha composición es una fórmula infantil inicial.

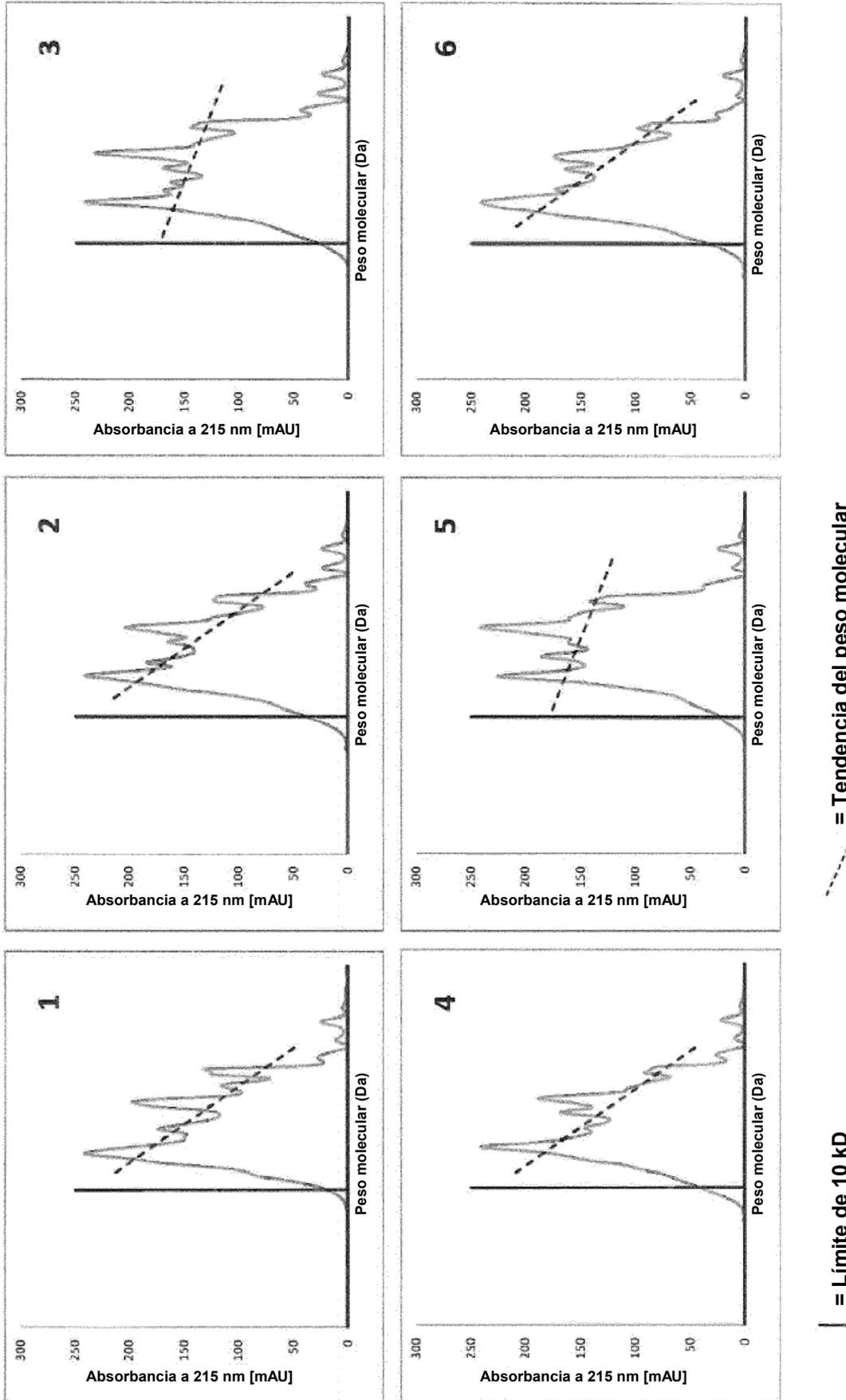


Fig. 1

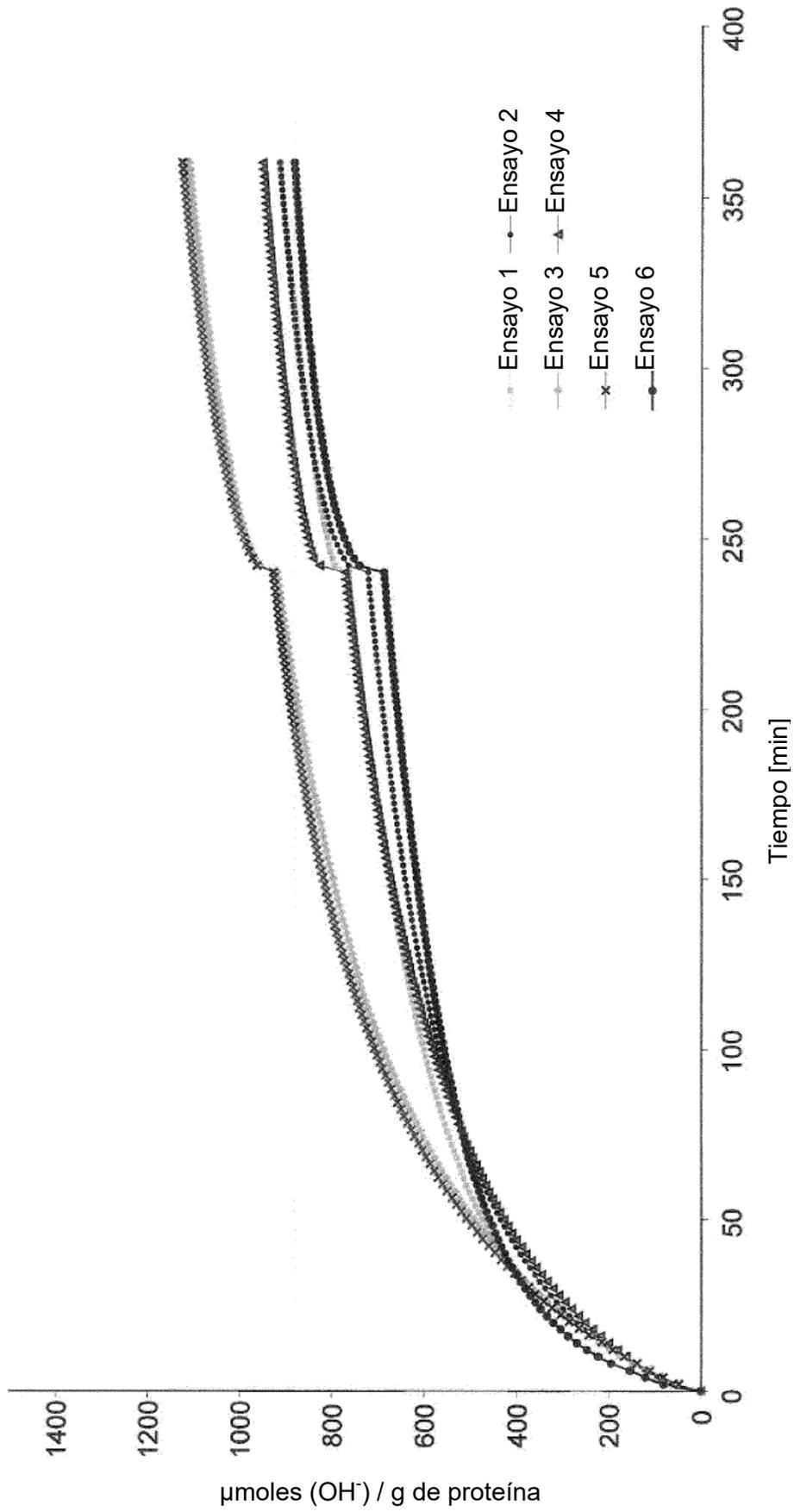


Fig. 3