

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 663**

51 Int. Cl.:

A23L 33/19 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2012 PCT/EP2012/074639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 12795467 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2787841**

54 Título: **Péptidos de beta-lactoglobulina para tratar la alergia a la proteína de la leche de vaca**

30 Prioridad:

07.12.2011 WO PCT/EP2011/006148

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

05.02.2018

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)
Eerste Stationsstraat 186
2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**KNIPPELS, LÉON MATHIEU JOHANNES;
GARSSEN, JOHAN y
MEULENBROEK, LAURA ANTOINETTE
PETRONELLA MARIA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 652 663 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

Péptidos de beta-lactoglobulina para tratar la alergia a la proteína de la leche de vaca

- 5 [0001] La presente invención se refiere a una composición nutricional, preferiblemente enteral, para usar en el tratamiento de la alergia a la leche de vaca en bebés alérgicos a la leche de la vaca, en particular a la proteína de suero de leche, que contiene péptidos específicos de beta-lactoglobulina, que son capaces de reducir, y en particular eliminan los síntomas agudos de alergia a la proteína de la leche de vaca.
- 10 [0002] Durante el proceso común de la nutrición, las proteínas alimentarias se presentan al sistema inmunológico a través del tracto gastrointestinal sin una reacción inmunológica a los nutrientes ingeridos. A esta incapacidad de reacción se le llama tolerancia inmunitaria oral o tolerancia oral. La inducción de tolerancia inmunitaria oral es pertinente especialmente para bebés, que después de su nacimiento son expuestos por primera vez a proteínas alimentarias y deben adaptarse a ellas. Si no se establece la tolerancia inmunitaria oral en los bebés, aparecerá una alergia alimenticia.
- 15 [0003] Alrededor del 2 al 3 % de los bebés son alérgicos a la proteína de la leche de vaca. Para los bebés que sufren de alergia a la proteína de la leche de vaca, existen preparados para lactantes en el mercado que comprenden proteínas extensamente hidrolizadas (hidrolizado extenso de proteínas) o incluso simplemente aminoácidos libres como fuente de nitrógeno. En estas fórmulas no hay presencia de proteínas o péptidos alérgicos. Así, se evita la exposición a la proteína de la leche, lo que impide que se produzca una reacción alérgica. A esto se le llama una prevención secundaria de la alergia a la leche de vaca. Sin embargo, en cuanto se vuelven a introducir las proteínas de la leche de vaca en su dieta, el bebé puede padecer de nuevo una reacción alérgica.
- 20 [0004] Existen preparados hipoalérgicos en el mercado que comprenden un hidrolizado de proteínas parcial (proteínas parcialmente hidrolizadas) y tienen una alergenicidad disminuida. Estas formulaciones tienen la ventaja de que inducen por vía oral una tolerancia inmunológica a la proteína intacta, con la ventaja que, más adelante, la proteína nativa se puede introducir en la dieta con un riesgo reducido de reacciones alérgicas. A esto se le llama prevención primaria de la alergia de la proteína a la leche de vaca y estos preparados se usan típicamente en bebés con riesgo de desarrollar alergias. Sin embargo, para los bebés a los que ya se les ha diagnosticado, por ejemplo, una alergia a la proteína de la leche de vaca establecida, tales preparados no son adecuados, ya que todavía provocan una reacción alérgica.
- 25 [0005] EP 0 629 350 divulga el uso de hidrolizados de proteínas de suero de leche no alérgicos que se dice que son capaces de inducir tolerancia a la proteína de la leche de vaca.
- 30 [0006] EP 0 827 697 divulga el uso de suero de leche, que ha sido hidrolizado enzimáticamente para la preparación de composiciones que inducen tolerancia oral a la leche de vaca en mamíferos con predisposición. El suero de leche tiene un nivel de detección inmunológica de proteínas alérgicas ≥ 100 veces menor al del suero de leche no hidrolizado.
- 35 [0007] WO 00/42863 divulga una composición hipoalérgica para la inducción de tolerancia a la proteína en bebés con riesgo de alergia a la proteína, que comprende una base de proteína no alérgica extensamente hidrolizada y/o una base de aminoácido libre, dicha composición tiene como principio activo al menos un péptido tolerogénico de la proteína alérgica.
- 40 [0008] WO 02/24883 divulga el uso de bacterias de ácido láctico para expresar péptidos tolerogénicos. Las bacterias de ácido láctico son capaces de reducir la tendencia de un individuo a desarrollar reacciones alérgicas.
- 45 [0009] WO 2006/115412 divulga un alimento nutritivo líquido que comprende cadenas de ácido graso de cadena corta y un, sacárido no digerible fermentable.
- 50 [0010] WO 2008/017517 divulga péptidos inmunogénicos y su uso en trastornos inmunitarios.
- 55 [0011] JP 2010-105915 A divulga péptidos obtenidos por la hidrolización de β -lactoglobulina y para ser utilizados en alimentos y bebidas.
- 60 [0012] WO 2011/069042 divulga un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca y/o péptidos derivados del mismo para la inducción de tolerancia.
- 65 [0013] Sin embargo, las composiciones hipoalérgicas de la técnica anterior con frecuencia hacen efecto solo evitando la presencia de alérgenos potenciales, proporcionando por tanto tan solo un efecto de prevención de alergia secundaria y/o solo son adecuadas para bebés con riesgo de desarrollar una alergia, pero no para bebés con una alergia a la leche de vaca ya establecida, ya que provocarían una reacción alérgica en dichos bebés.

[0014] Así, todavía existe una necesidad de composiciones nutricionales para sujetos que sufren de alergia a la proteína de la leche de vaca con efectos mejorados en los síntomas agudos. Por lo tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar composiciones, métodos y medios para la superación de las desventajas anteriormente identificadas, en particular, para que puedan utilizarse para tratar a bebés alérgicos a la leche de vaca, esto implica, en particular, que los síntomas agudos se reducen o incluso se eliminan cuando aparece nuevamente la proteína alergénica.

[0015] Este problema técnico ha sido resuelto mediante la enseñanza de las reivindicaciones independientes.

[0016] Así, la presente invención proporciona, en particular, una composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como máximo 5 kDa, dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3. Preferiblemente, el al menos un péptido de beta-lactoglobulina de la presente invención tiene un peso molecular en particular de 0,1 a 4,9 kDa, preferiblemente de 0,5 a 4,9, más preferiblemente de 2 a 4,9 kDa y en la forma más preferida de aproximadamente 2,4 kDa. En una forma de realización preferida, el al menos un péptido de beta-lactoglobulina consiste en 18 a 30 aminoácidos, preferiblemente 18 a 25 aminoácidos, más preferiblemente 18 a 20 aminoácidos y en la forma más preferida de 18 aminoácidos.

[0017] Los inventores descubrieron, sorprendentemente, que las reacciones alérgicas agudas podrían ser mejoradas gracias a péptidos específicos de beta-lactoglobulina en un modelo animal con ratones alérgicos. La beta-lactoglobulina es una de las dos principales proteínas del suero de leche presentes en la leche de vaca y de oveja pero no existe en las leches humanas. Con frecuencia, en el caso de la alergia a la proteína de la leche de vaca, la beta-lactoglobulina es el alérgeno. Comprende 162 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 18,4 kDa. En los experimentos, los ratones han sido sensibilizados a la proteína de suero de leche intacta y, consecuentemente, han mostrado una respuesta alérgica cutánea aguda después de una prueba intradérmica con proteína de suero de leche intacta, es decir, se han vuelto alérgicos a la proteína de suero de leche, lo que también ha sido demostrado por un aumento en la IgE específica.

[0018] Posteriormente, estos ratones fueron tratados con diferentes péptidos y componentes proteicos, y, sorprendentemente, resultó que el tratamiento con péptidos específicos de una zona específica de la proteína de beta-lactoglobulina suprimía significativamente, es decir, reducía la reacción alérgica cuando a estos ratones se les hacía pruebas con proteína de suero de leche intacta nuevamente. De este modo, los ratones previamente alérgicos fueron tratados con los péptidos específicos de beta-lactoglobulina y mostraron una reacción alérgica significativamente reducida cuando se encontraron con el alérgeno nuevamente después del tratamiento.

[0019] Estos péptidos son, por lo tanto, adecuados para ser incorporados en un preparado para lactantes antialérgico junto con, por ejemplo, proteína extensamente hidrolizada y/o aminoácidos libres con el objetivo no solo de prevenir reacciones alérgicas evitando los alérgenos, sino también de tratar ventajosamente la alergia al reducir o mejorar la reacción alérgica aguda cuando la persona es expuesta a los alérgenos nuevamente. En otras palabras, estos péptidos se usan en una inmunoterapia oral para reducir la sensibilidad al alérgeno.

[0020] En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" designa un tratamiento terapéutico a un paciente humano o animal, en particular bebés, para curar parcial o completamente la alergia y/o para aliviar o mejorar los síntomas de la alergia. El tratamiento es, preferiblemente, una inmunoterapia oral. En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" no abarca la prevención o profilaxis de una alergia, es decir, la inducción de tolerancia oral.

[0021] En el contexto de la presente invención, el término "composición nutricional" designa una composición de valor nutricional que, al menos, incluye un componente proteico, preferiblemente incluye al menos un componente proteico y un componente lipídico, de forma especialmente preferible incluye al menos un componente proteico y un componente de carbohidrato y, en particular, al menos incluye un componente proteico, un componente lipídico y un componente de carbohidrato. En una forma de realización preferida, la composición nutricional es una composición nutricional enteral. En una forma de realización preferida la composición nutricional puede ser en forma líquida, semilíquida o sólida. En una forma de realización preferida la forma sólida es en la forma pulverulenta.

[0022] En el contexto de la presente invención, el término "alergia a la leche de vaca" o "alergia a la proteína de la leche de vaca" designa en particular una alergia a la proteína de suero de leche de vaca.

[0023] En el contexto de la presente invención, el término "como máximo 5 kDa" indica hasta e incluyendo 5 kDa.

[0024] En el contexto de la presente invención, un tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de la vaca se mide según el ejemplo 2 de la presente enseñanza en el modelo de ratón indicado para determinar una reacción alérgica aguda a las proteínas. Por consiguiente, una mejora de los síntomas agudos se revela mediante una hipersensibilidad de tipo inmediato (HTI) del 35 al 90%, con una reacción alérgica aguda que tiene un valor de HTI del 100 %. Una reducción significativa de una reacción alérgica se caracteriza por una HTI del 0 al 30%,

preferiblemente del 0 al 25%, preferiblemente del 0 al 20%, preferiblemente del 0 al 10%, y, de la forma más preferible del 0 % de la reacción alérgica con un valor HTI del 100 %. Así, un tratamiento de alergia a la proteína de la leche de la vaca significa preferiblemente una reducción de al menos del 15%, al menos del 20%, al menos del 30%, al menos del 40%, al menos del 50%, al menos del 60%, al menos del 70%, al menos del 80%, al menos del 90 % y preferiblemente del 100 % de la reacción alérgica aguda mostrada por el mismo sujeto antes del tratamiento, por ejemplo, como se indica en una HTI medida en la prueba de modelo de ratón indicada anteriormente.

[0025] El valor relativo para la HTI indica la reducción de reacciones alérgicas agudas mediante la siguiente fórmula de cálculo: $100 - \text{HTI} = \text{valor de reducción}$. Así, de la forma más preferible, el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca, según la presente invención, lleva a una reducción total de una reacción aguda, lo que significa una reducción del 60 al 100%, preferiblemente del 90 al 100%, preferiblemente del 95 al 100%, y, de la forma más preferible del 100 % de las reacciones alérgicas agudas a las proteínas alimentarias, cuando el sujeto encuentra estas proteínas nuevamente.

[0026] De forma análoga, la reacción alérgica en seres humanos se puede cuantificar por la extensión de las reacciones cutáneas después prueba cutánea. Esta prueba se realiza posando una gota de una solución que contiene un posible alérgeno sobre la piel, y una serie de rasguños o punzadas de aguja permiten que la solución penetre en la piel. Si la piel desarrolla un área roja, hinchada y pruriginosa (llamada habón), normalmente significa que la persona es alérgica al alérgeno. Esto es también una reacción HTI. El diámetro medio del habón se puede medir como se conoce en la técnica (Maccario et al, 2003. J Allerg Clin Immunol 111,750-756); de forma alternativa, se pueden realizar mediciones termográficas en la piel (Rokita et al, 2011. Med Phys 38:756772).

[0027] En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a una composición nutricional, preferiblemente una composición enteral, que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como máximo 5 kDa, dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3. En una forma de realización preferida la presente invención se refiere a una composición nutricional, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3.

[0028] En una forma de realización particularmente preferida, la composición nutricional, composición preferiblemente enteral, comprende, consiste en particular en una mezcla de dos, tres o preferiblemente los cuatro de los péptidos de beta-lactoglobulina consistentes en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3 y SEQ ID N.º 4. Esto significa que se prefiere particularmente, que la composición nutricional según la presente invención comprenda los tres péptidos consistentes en la SEC ID NOs 1 a 3. De conformidad con la presente invención, los péptidos de beta-lactoglobulina se pueden sintetizar químicamente como se conoce en la técnica, o aislar después de la expresión por un huésped modificado genéticamente tal como una cepa de E. Coli o de Lactobacillus. De forma alternativa, los péptidos se aíslan y purifican a partir de una proteína de suero de leche o de hidrolizado de beta-lactoglobulina.

[0029] Según la presente invención, los péptidos de beta-lactoglobulina no contienen un motivo redox, en particular no contienen un motivo tiorredox, puesto que tienen una actividad de reducción. En particular, no se sustituyen con tal secuencia artificial.

[0030] Como componente proteico adicional, es decir, aparte del péptido de beta-lactoglobulina mínimo, la composición nutricional según la presente invención preferiblemente comprende aminoácidos libres y/o proteínas de suero de leche extensamente hidrolizado. De este modo, según la presente invención, los péptidos específicos de beta-lactoglobulina no forma parte, preferiblemente, de un hidrolizado proteico de suero de leche parcial, sino, en particular, o bien son la única fuente de proteína utilizada, o bien se utilizan junto con una fuente de nitrógeno que no provoca una reacción alérgica, en particular aminoácidos libres y/o una proteína extensamente hidrolizada, en particular una proteína de suero de leche extensamente hidrolizada.

[0031] Así, según la presente invención el término "proteína" o "componente proteico" abarca proteínas, péptidos, en particular los péptidos de beta-lactoglobulina, aminoácidos libres y los componentes proteicos parcial o extensamente hidrolizadas. Normalmente, las proteínas extensamente hidrolizadas tienen un contenido de aminoácido libre de por encima de 10 g por 100 g de proteína. En la presente invención, la proteína extensamente hidrolizada se refiere a una proteína que ha sido hidrolizada y tiene menos del 3 % en peso de péptidos con un tamaño por encima de 5 kDa. Normalmente, una proteína extensamente hidrolizada ha sido obtenida por hidrólisis de proteasa seguida de una etapa de ultrafiltración en la que el filtrado se realiza con una membrana con un corte de 5 o 3 kDa. Normalmente, el tamaño medio de los péptidos en una proteína extensamente hidrolizada es de 2 a 3 aminoácidos. Preferiblemente, estos hidrolizados extensos de proteínas prácticamente no comprenden péptidos con un tamaño superior a 1,5 kDa, ya que los péptidos de más de 1,5 kDa aún pueden provocar una reacción alérgica. Se prefiere particularmente que la composición enteral comprenda proteína de suero de leche extensamente hidrolizada.

[0032] Existen preparados para lactantes extensamente hidrolizadas disponibles en el mercado, como Nutrilon pepti de Nutricia o Pregomin de Milupa.

[0033] También hay preparados para lactantes basados en aminoácidos libres disponibles en el mercado, por ejemplo Neocate de Nutricia.

5 [0034] Según la presente invención, la composición nutricional no contiene proteínas provenientes de la leche de vaca intactas o hidrolizadas solo parcialmente, en particular proteína de suero de leche. En cambio, se prefiere que la composición nutricional comprenda un componente proteico adicional seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos libres, proteína de suero de leche extensamente hidrolizada y proteínas provenientes de otras fuentes como la soja, los guisantes, el arroz, el colágeno o similares intactos o en forma parcialmente hidrolizada.

10 [0035] Así, según la presente invención, el contenido total de proteína, es decir, el componente general de proteína de la composición nutricional comprende preferiblemente, y en particular consiste en, los péptidos específicos de beta-lactoglobulina, según la presente invención, solos o al menos un componente adicional de proteína seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos libres, proteína de suero de leche extensamente hidrolizada y proteínas provenientes de otras fuentes como la soja, los guisantes, el arroz, el colágeno o similares intactos o en forma parcialmente hidrolizada.

15 [0036] En una forma de realización preferida de la presente invención, la presente composición nutricional, preferiblemente comprende al menos 10 µg, más preferiblemente al menos 30 µg, preferiblemente al menos 60 µg, preferiblemente de 10 a 5000 µg, más preferiblemente de 10 a 2000 µg y preferido particularmente de 20 a 1000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g total de proteína.

20 [0037] Además, también se prefiere que la composición nutricional, según la presente invención, comprenda una cantidad total de proteína del 5 a 25 % basada en el peso en seco de la composición. La cantidad total de proteína se refiere aquí a la suma de todos componentes proteicos, es decir, los péptidos específicos de beta-lactoglobulina junto con todos los demás componentes proteicos que pueden estar presentes en la composición nutricional, según la presente invención.

25 [0038] La presente composición contiene preferiblemente al menos el 50 % en peso del componente proteico derivado de leche no-humana, más preferiblemente al menos el 90 % en peso, cada uno basado en el peso en seco de proteína total.

30 [0039] La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, contiene preferiblemente del 5 al 25%, preferiblemente del 7 al 25%, preferiblemente del 5 al 20%, preferiblemente del 5 al 16%, preferiblemente del 5 al 12 % de proteína basada en calorías totales, de la forma más preferible del 7,0 al 12,0 % de proteína basada en las calorías totales de la composición. El valor calórico total se puede calcular según la cantidad de carbohidratos digeribles, grasa y proteína.

35 [0040] La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, contiene preferiblemente de 0,5 a 6,0 g, más preferiblemente de 1,0 a 3,0 g, aún más preferiblemente de 1,0 a 2,5 g de proteína por 100 ml de composición lista para tomar. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente al menos el 7,0 % en peso, más preferiblemente al menos el 8,0 % en peso, de la forma más preferible al menos el 9 o al menos el 10 % en peso de proteínas basado en el peso en seco de la composición total. Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende como máximo el 40 % en peso, más preferiblemente como máximo el 15 % en peso, preferiblemente como máximo el 20 % en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición total. El % en peso de proteína basado en el peso en seco de la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, se calcula según el método de Kjeldahl por el que se mide el nitrógeno total y se utiliza un factor de conversión de 6,38, preferiblemente en el caso de la caseína, o un factor de conversión de 6,25 para otras proteínas que no sean caseína.

40 [0041] Según la presente invención, la composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente como componente de carbohidrato al menos un oligosacárido no digerible. Ventajosamente y en la forma más preferida, el oligosacárido no digerible es hidrosoluble (según el método descrito en L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71: 1017-1023,1988). Los oligosacáridos no digeribles, también llamados prebióticos, no se digieren en el intestino por la acción de enzimas digestivas presentes en el tracto gastrointestinal superior humano (intestino delgado y estómago) sino que se fermentan gracias a la microbiota intestinal humana. Los oligosacáridos no digeribles provechosa e inesperadamente mejoran el efecto de los péptidos de beta-lactoglobulina presentes en el tratamiento de alergia a la proteína de la leche de vaca.

45 [0042] En una forma de realización preferida se selecciona al menos un oligosacárido no digerible del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, dextrina no digerible, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, glucomano-oligosacáridos, galactomano-oligosacárido, manano-oligosacáridos, quito-oligosacáridos, oligosacáridos de ácido urónico, sialis-oligosacáridos y fuco-oligosacáridos.

50 [0043] Preferiblemente, la composición nutricional incluye una mezcla de oligosacáridos no digeribles.

[0044] En una forma de realización particularmente preferida, el oligosacárido no digerible que contiene la composición nutricional es un fructo-oligosacárido, preferiblemente una cadena corta, con un grado de polimerización medio por debajo de 7, como, por ejemplo, la inulina hidrolizada, o un fructo-oligosacárido de cadena larga con un grado de polimerización medio de por encima de 15, más preferiblemente por encima de 20, como, por ejemplo, Raftilin HP, más preferiblemente una combinación de fructo-oligosacáridos de cadena corta y cadena larga.

[0045] Un fructo-oligosacárido se refiere oligosacáridos que comprenden unidades de fructosa con enlaces β , preferiblemente con enlaces $\beta(2,1)$ y/o $\beta(2,6)$ glicosídicos, y un DP preferiblemente entre 2 y 200. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido contiene una glucosa terminal con enlace $\beta(2,1)$ glicosídico. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido contiene al menos 7 unidades de fructosa con enlace β . En otra forma de realización preferida inulina se utiliza como oligosacárido no digerible. La inulina es un tipo de fructo-oligosacárido donde al menos el 75 % de los enlaces glicosídicos son enlaces $\beta(2,1)$. Típicamente, la inulina tiene una longitud media de cadena de entre 8 y 60 unidades monosacáridas. Existe un fructo-oligosacárido adecuado para su uso en las composiciones de la presente invención que se comercializa bajo el nombre comercial Raftiline®HP (Orafti). Otras fuentes adecuadas son raftilose (Orafti), fibrulosa y fibrulina (Cosucra) y Frutafit y frutalosa (Sensus).

[0046] En una forma de realización preferida la composición nutricional no comprende galacto-oligosacáridos, en particular β -galacto-oligosacáridos. Estos galacto-oligosacáridos normalmente son derivados de lactosa y pueden contener trazas de proteína de leche.

[0047] La presente composición nutricional comprende preferiblemente del 0,05 al 20 % en peso de oligosacárido no digerible total, más preferiblemente del 0,5 al 15 % en peso, aún más preferiblemente del 1 al 10 % en peso, y de la forma más preferible del 2,0 al 10 % en peso, basado en el peso en seco de la presente composición.

[0048] Basándose en 100 ml, la presente composición nutricional comprende preferiblemente del 0,01 al 2,5 % en peso de oligosacárido no digerible total, más preferiblemente del 0,05 al 1,5 % en peso, aún más preferiblemente 0,25 a 1,5 % en peso, basado en 100 ml de la presente composición.

[0049] En otra forma de realización preferida adicional de la presente invención, la composición nutricional no contiene oligosacáridos no digeribles.

[0050] Según la presente invención, la composición nutricional comprende preferiblemente además un componente lipídico y, como un componente de carbohidrato, al menos un carbohidrato digerible.

[0051] Así, preferiblemente, la composición nutricional, preferiblemente enteral, de la presente invención puede comprender además un lípido (denominado también componente lipídico), en particular grasa. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente como lípidos lípidos vegetales y/o aceites marinos, tales como aceites de algas, aceites bacterianos, aceites animales, aceites vegetales o aceites de pescado. Preferiblemente, la composición comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, más preferiblemente ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), de la forma más preferible DHA. El DHA reduce provechosamente la síntesis de IgE y así reduce o anula las reacciones alérgicas. Preferiblemente, la composición de nutrición comprende al menos el 0,1 % en peso, más preferiblemente del 0,1 al 1 % en peso de DHA basado en los ácidos grasos totales. Preferiblemente, la composición no comprende grasa o lípidos de origen lácteo, ya que dicha grasa todavía puede comprender trazas de proteína de leche intacta.

[0052] Según la presente invención, la composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente del 15 al 40 % del componente lipídico basado en el peso en seco de la composición.

[0053] Preferiblemente, al menos un carbohidrato digerible puede comprender uno o más carbohidratos digeribles que se conocen en la técnica como adecuados para ser utilizados en productos alimenticios, en particular composiciones nutricionales infantiles, por ejemplo seleccionados de polisacáridos digeribles (como el almidón), monosacáridos digeribles (como la glucosa y la fructosa) y disacáridos digeribles (como la lactosa y la sacarosa). Se prefiere particularmente la maltodextrina. El uso de maltodextrina es ventajoso puesto que tiene un mayor peso molecular y puede compensar parcialmente el aumento en la osmolaridad provocado por aminoácidos libres, en caso de ser usado.

[0054] Preferiblemente, la cantidad de lactosa es inferior al 40 % en peso basada en carbohidratos digeribles totales. Preferiblemente, la composición nutricional, preferiblemente enteral, no incluye lactosa como un carbohidrato digerible.

[0055] La composición nutricional, preferiblemente enteral, de la invención preferiblemente comprende otros componentes, tales como vitaminas y/o minerales, preferiblemente según directivas internacionales sobre preparados para lactantes.

[0056] En una forma de realización preferida de la presente invención, la composición nutricional consiste en al menos un péptido de beta-lactoglobulina, como se especifica aquí, un componente lipídico y un carbohidrato digerible.

5 [0057] En una forma de realización preferida de la presente invención, la presente composición nutricional no comprende prebióticos.

10 [0058] En el contexto de la presente invención, el término "al menos un péptido de beta-lactoglobulina" significa que se hace referencia a dos o más péptidos de beta-lactoglobulina para, de esta forma, excluir cualquier otro componente tal como péptidos sin beta-lactoglobulina, componentes lipídicos, componentes de carbohidrato o combinaciones de los mismos. En una forma de realización preferida la presente invención se refiere a una composición nutricional, preferiblemente una composición enteral, que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como máximo 5 kDa, dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3, otro componente proteico, un componente lipídico, al menos un carbohidrato digerible y vitaminas y/o minerales.

[0059] En una forma de realización preferida, la composición nutricional, preferiblemente enteral, es un preparado para lactantes o un preparado de continuación.

20 [0060] Además, en otra forma de realización preferida, la composición nutricional, preferiblemente enteral, es en forma de un polvo seco o un líquido listo para tomar. Si la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es en forma seca, ésta es, por ejemplo, un polvo adecuado para hacer una composición líquida después de reconstituirla con una solución acuosa, preferiblemente con agua. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, puede también tener preferiblemente forma de concentrado líquido, que se diluye con agua antes de su uso. Si la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es un líquido listo para tomar, esta ya contiene un líquido solvente como agua y, por lo tanto, no es necesario reconstituirla antes de uso. Preferiblemente, si la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es en una forma líquida, tiene una viscosidad por debajo de 35 mPa.s, más preferiblemente por debajo de 6 mPa.s, medida usando un viscosímetro Brookfield a 20°C a una velocidad de cizalladura de 100 s⁻¹.

30 [0061] Cuando la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, tiene una forma líquida, el volumen administrado a diario preferido está en el rango de aproximadamente 80 a 2500 ml, más preferiblemente de aproximadamente 450 a 1000 ml al día.

35 [0062] Según la presente invención, la composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente la siguiente distribución calórica: el componente lipídico proporciona preferiblemente del 30 al 60 % de las calorías totales, preferiblemente del 35 al 50 % de las calorías totales, el componente proteico proporciona preferiblemente del 5 al 20 %, más preferiblemente del 5 al 15 % de las calorías totales, en particular del 6 al 12 % de las calorías totales, y el componente de carbohidrato digerible proporciona preferiblemente del 25 al 65 % de las calorías totales, preferiblemente del 40 al 60 % de las calorías totales. La cantidad total de calorías se determina por la suma de calorías derivada de proteína, lípidos y carbohidratos digeribles.

45 [0063] Para cumplir los requisitos calóricos del bebé, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente de 50 a 200 kcal/100 ml de líquido, más preferiblemente de 60 a 90 kcal/100 ml de líquido, aún más preferiblemente de 60 a 75 kcal/100 ml de líquido. Esta densidad calórica asegura una proporción óptima entre agua y consumo de calorías. La osmolaridad de la presente composición es preferiblemente de entre 150 y 420 mOsmol/l, más preferiblemente de 260 a 380 mOsmol/l. La osmolaridad baja pretende reducir la tensión gastrointestinal.

50 [0064] La presente composición no es leche materna humana. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está preferiblemente libre de probióticos vivos o muertos, en particular bifidobacterias o lactobacilos. Ya que tales bacterias se precultivan normalmente en medios de cultivo a base de leche, añadir dichos probióticos supone el riesgo de introducir trazas de proteína de leche de vaca intacta. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está preferiblemente libre de factores de crecimiento y/o citoquinas. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está preferiblemente libre de TGF, en particular de TGF-beta.

60 [0065] La composición nutricional, preferiblemente enteral, de la presente invención es preferiblemente para usar en bebés, es decir, se trata de una composición nutricional para bebés. Por lo tanto, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, se debe administrar preferiblemente a un sujeto humano durante los 3 primeros años de vida. Preferiblemente, la presente composición es un preparado para lactantes o un preparado de continuación, o una leche de niño, es decir, para seres humanos mayores que bebés.

65 [0066] En una forma de realización del uso, según la presente invención, la composición nutricional, preferiblemente enteral, es para alimentar o se usa para alimentar a un sujeto humano con una edad de 0 a 36 meses. La presente composición nutricional se administra ventajosamente a un infante humano de 0 a 24 meses, más preferiblemente a un infante humano de 0 a 18 meses, y de la forma más preferible a un infante humano de 0 a 12 meses. La presente

composición nutricional, preferiblemente enteral, es preferiblemente para ser utilizada en el tratamiento de la alergia alimentaria. Más preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es para ser utilizada en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca. Aún más preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es para ser utilizada en el tratamiento de la alergia a la proteína de suero de leche de vaca. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es preferiblemente para ser utilizada en la inmunoterapia oral. Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es para proporcionar a un humano las necesidades nutricionales diarias, en particular para administrar y alimentar a seres humanos, en particular a bebés y niños pequeños, preferiblemente seres humanos que sufren de alergia a la leche de vaca, más particularmente bebés o niños pequeños que sufren de alergia a la leche de vaca, en particular bebés.

La presente invención también se refiere a una composición nutricional que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como máximo 5 kDa, dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina es de uso en el tratamiento de alergia a la proteína de la leche de vaca y de bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca y donde los otros componentes de dicha composición nutricional son como se especifica anteriormente.

[0067] La presente invención también se refiere una composición nutricional que comprende un componente proteico, un componente lipídico y carbohidratos digeribles, donde el componente proteico comprende, y en particular consiste en, i) al menos un péptido de beta-lactoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y ii) al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína extensamente hidrolizada y aminoácidos libres, donde en la suma de i) e ii) representa al menos 95 % en peso, preferiblemente al menos 96 % en peso, preferiblemente al menos 97 % en peso, más preferiblemente al menos 98 % en peso, y de la forma más preferible al menos 99 % en peso del componente proteico, y donde el componente lipídico comprende al menos 0,1 % en peso DHA basado en los ácidos grasos totales.

[0068] En una forma de realización, la presente invención se refiere a una composición nutricional que comprende un componente proteico, un componente lipídico y carbohidratos digeribles, donde el componente proteico comprende, y en particular consiste en, al menos el 95 % en peso, preferiblemente al menos el 96 % en peso, preferiblemente al menos el 97 % en peso, más preferiblemente al menos el 98 % en peso, y de la forma más preferible al menos el 99 % en peso del al menos un péptido de beta-lactoglobulina según la presente invención y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína extensamente hidrolizada y aminoácidos libres, y donde el componente lipídico comprende al menos 0,1 % en peso de DHA basado en ácidos grasos totales.

[0069] En una forma de realización preferida, la composición nutricional comprende al menos un oligosacárido no digerible, donde el oligosacárido no digerible es preferiblemente una cadena corta o fructo-oligosacárido de cadena larga.

[0070] En una forma de realización preferida la composición nutricional comprende de 10 a 5000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total. En una forma de realización preferida, la presente composición nutricional comprende preferiblemente al menos 10 µg, más preferiblemente al menos 30 µg, preferiblemente al menos 60 µg, preferiblemente de 10 a 5000 µg, más preferiblemente de 10 a 2000 µg y en la forma particularmente preferida de 20 a 1000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total.

[0071] Según la presente invención, la composición nutricional comprende preferiblemente una cantidad total de proteína del 5 a 25 % basada en el peso en seco de la composición.

[0072] La presente composición nutricional es preferiblemente un preparado para lactantes o un preparado de continuación. En la forma particularmente preferida, la composición nutricional es un preparado para lactantes o un preparado de continuación para ser utilizado en la alimentación de bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.

[0073] Todas composiciones y sustancias identificadas aquí como adecuadas y diseñadas para un uso según la presente invención deben ser entendidas también como adecuadas y diseñada para ser aplicadas en métodos de tratamiento o métodos para alimentar a un sujeto, en particular un sujeto humano en la necesidad de los mismos.

[0074] En el contexto de la presente invención, todas cantidades relativas presentadas en porcentaje (%) de una composición total indicada suman en total 100 % de la composición total indicada.

[0075] En el contexto de la presente invención, los verbos "comprender" y "contener" y sus conjugaciones se usan en una forma de realización preferida en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a dichos verbos, pero no se excluyen los elementos no estén específicamente mencionados. En el contexto de la presente invención, los verbos "comprender" o "contener" y sus conjugaciones se utilizan en otra forma de realización preferida en su sentido limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a dichos verbos y se excluyen los elementos que no estén específicamente mencionados, igualando el significado del verbo "consistir" y sus conjugaciones.

[0076] La referencia a un elemento de la presente invención, particularmente composición o método, mediante artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto claramente requiera que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, significa normalmente "al menos uno".

5

[0077] Otras formas de realización preferidas son el objeto de las reivindicaciones secundarias.

[0078] La invención será descrita con más detalle por medio de los ejemplos no limitativos.

10 [0079] SEQ ID N.º 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína completa de beta-lactoglobulina de bovino con 162 aminoácidos en total. La región en la proteína de beta-lactoglobulina que abarca los aminoácidos 13 a 48 tiene la secuencia: Gln Lys Val Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro.

15 **Ejemplo 1**

Selección de péptidos

20 [0080] Los péptidos sintéticos de 18 aminoácidos con superposición de 12 aminoácidos que abarcan la variante B de beta-lactoglobulina y seis péptidos sintéticos de la variante A de beta-lactoglobulina se obtuvieron de JPT Peptide Technologies (Berlín, Alemania).

25 [0081] Los péptidos fueron sintetizados y preseleccionados con un ensayo con líneas celulares T. Se cultivaron veinticinco células B transformadas por el virus de 18-Epstein Barr (VEB) en RPMI 1640 - GlutaMAX™-I suplementadas con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 2% de Pen/Strep. Se generaron líneas de células T específicas de la leche de vaca (LCT), como ha sido previamente descrito por Schade et al. (2000, J Allerg. Clin. Immunol. 106: 1155-62). Las LCT fueron cultivadas en Yssel's medium que contenía 2% de HS, 2% de Pen/Strep, 1% de Glut, 50 IU/ml IL-2 y 50 IU/ml IL-4 y fueron reestimuladas cada dos semanas con leche de vaca para mantenerlas en el cultivo. Para la reestimulación, las B células transformadas por el VEB autólogo fueron preincubadas durante la noche con 50 µg/ml de la mezcla de proteína de leche de vaca. Posteriormente, las células B fueron irradiadas y añadidas a las LCT.

35 [0082] La proliferación de célula T específica de péptido fue evaluada como ha sido anteriormente descrito por Ruitter et al. (2006, Clin Exp alergía 36:303-10). En resumen, las células B irradiadas transformadas por el VEB (4 x 10⁴/pocillo) fueron preincubadas durante toda la noche por triplicado en placas U de 96 pocillos con 50 µg/ml del alérgeno principal o 10 µg/ml de péptido sintético (bien una mezcla de 2 o 3 péptidos, o bien péptidos únicos). La proteína de suero de leche (prolacta) se obtuvo de Lactalis (Laval, Francia). El caseinato se compró a FrieslandCampina Domo (Amersfoort, Países Bajos). Para la mezcla de proteína de leche de vaca, se mezclaron prolacta y caseinato en una proporción 1:1. Además, la alfa-lactoalbúmina (alfa-LAC) y la beta-lactoglobulina (beta-LG) fueron evaluadas como grupos de control. Posteriormente, se añadieron 4 x 10⁴ células T a los pocillos y fueron cultivadas durante 24 horas. Al día siguiente, se añadió timidina tritiada (1 µCi/pocillo). Pasadas 18 horas, se cosecharon las células en filtros de fibra de vidrio y se midió la incorporación de [³H]-TdR mediante un contador de colonias Microbeta2 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). La incorporación se expresó en cuentas por minuto (CPM) y se sustrajo la proliferación básica de células B con VEB. Todas pruebas se realizaron en Yssel's medio con 2 % de Pen/Strep y 1% de Glut y las incubaciones se hicieron a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂ humedecida. Cada LCT fue evaluada al menos tres veces.

45 [0083] Los péptidos con mayor reactividad a las células T fueron seleccionados para otra prueba en un modelo animal. Estos nueve péptidos fueron derivados de beta-lactoglobulina. La mezcla de péptidos 1-4 tuvo el mejor efecto.

50

Tabla 1: Información sobre la secuencia de los péptidos

| Péptido | Secuencia | Aminoácidos (AA) betalactoglobulina |
|---------|--|-------------------------------------|
| 1 | Gln Lys Val Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser (SEQ ID NO 1) | AA 13-30 |
| 2 | Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser (SEQ ID NO 2) | AA 19-36 |
| 3 | Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr (SEQ ID NO 3) | AA 25-42 |
| 4 | Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro (SEQ ID NO 4) | AA 31-48 |

| | | |
|---|--|------------|
| 5 | Lys Val Leu Val Leu Asp Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu (SEQ ID NO 6) | AA 91-108 |
| 6 | Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu Pro Glu (SEQ ID NO 6) | AA 97-114 |
| 7 | Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu Pro Glu Gln Ser Leu Ala Cys Gln (SEQ ID NO 7) | AA 130-120 |
| 8 | Ala Leu Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu (SEQ ID NO 8) | AA 139-156 |
| 9 | Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu GLu Gln Cys His Ile (SEQ ID NO 9) | AA 145-162 |

Pruebas con animales

5 [0084] Poco antes del experimento, los péptidos fueron suspendidos en PBS. Los péptidos fueron combinados en tres mezclas, es decir, péptidos 1-4 en la mezcla 1, péptidos 5-7 en la mezcla 2 y péptidos 8 y 9 en la mezcla 3 (ver tabla 1, arriba). La concentración final de cada péptido en la mezcla fue de 8 mg/ml.

10 [0085] Para este experimento, se utilizaron hembras de ratón C3H/HeOuj de tres semanas de edad libres de patógenos C3H/HeOuj (Charles River Laboratories, Maastricht, Países Bajos). Los ratones fueron mantenidos con comida para ratones estándar libre de proteína de leche de vaca (AIN-93G soy, Special Diets Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se les alojó en la instalación para animales de la Universidad de Utrecht y fueron tratados de conformidad con las pautas del Comité Holandés de Experimentos con Animales (Dutch Committee of Animal Experiments).

15 [0086] Los ratones (n = 6 por grupo) fueron tratados por vía oral mediante una aguja roma con 0,5 ml de las mezclas de péptido o PBS durante la semana previa a la sensibilización (del día -7 al día -2). Durante esta semana (desde el día -7 hasta el día 0) los ratones recibieron la dieta (de control) estándar AIN-93G. Los días 0, 7, 14, 21 y 28, los ratones fueron sensibilizados por vía oral con 20 mg suero de leche y 10 µg CT en 0,5 ml de PBS. Los ratones no sensibilizados fueron tratados con 10 µg CT en 0,5 ml de PBS. Cinco días después de la última sensibilización, los ratones recibieron una prueba intradérmica en el pabellón auricular con 10 µg suero de leche en 20 µl PBS. Se midió el grosor de la oreja antes de la prueba y 1 h después utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos). La diferencia en el grosor de la oreja (inflamación de la oreja) constituye una indicación de la respuesta alérgica aguda y se expresa en delta µm. El resultado fue que, con este protocolo de pretratamiento, la mezcla de péptidos de 1 fue eficaz.

25 **Ejemplo 2**

El tratamiento con péptidos de beta-lactoglobulina en ratones alérgicos a la proteína de suero de leche tiene como resultado una ausencia de reacción alérgica

30 [0087] Para este experimento, se utilizaron hembras de ratón C3H/HeOuj de tres semanas de edad libres de patógenos C3H/HeOuj (Charles River Laboratories, Maastricht, Países Bajos). Los ratones fueron mantenidos con comida para ratones estándar libre de proteína de leche de vaca (AIN-93G soy, Special Diets Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se les alojó en la instalación para animales de la Universidad de Utrecht y fueron tratados de conformidad con las pautas del Comité Holandés de Experimentos con Animales (Dutch Committee of Animal Experiments).

40 [0088] El suero de leche se obtuvo de DMV International (Veghel, Países Bajos). Un hidrolizado de suero de leche parcial (pWH) fue fabricado en Danone Research Centre for Specialised Nutrition mediante hidrólisis enzimática según las siguientes condiciones específicas. Se vertieron 19,5 kg de agua desmineralizada (en lo sucesivo "agua demi") a 12 °C en un recipiente y se mezclaron con 4,1 kg de suero de leche desmineralizado (Deminal, Friesland Foods Domo) y 1,41 kg de Lactalis Nutriwhey800 (DMV Campina) durante 30 minutos. Se le aplicó un tratamiento térmico de 2 minutos a 78 °C a la solución. Se enfrió el producto hasta llegar a 60 °C después del tratamiento térmico. Se disolvieron 15,6 g de Ca(OH)₂, 1,84 g de Mg(OH)₂, 16,1 g de KOH y 15,25 g de NaOH en 235 ml de agua demi para obtener una solución alcalina. Se llenó el tanque de hidrólisis con 12 kg de la solución de suero de leche tratada con calor y se removió. Se mantuvo la temperatura a 58 °C. La solución alcalina se utilizó para ajustar el pH del tanque de hidrólisis hasta alcanzar un pH de 7,75. Se mezclaron 16,8 g de Alcalase y 3,8 g de Flavourzyme y se añadieron al fermentador rápidamente. La solución alcalina se utilizó para regular el pH hasta alcanzar 7,75. La hidrólisis duró 180 minutos. Se detuvo el proceso enzimático mediante enfriamiento rápido y se congeló la solución. El pWH fue caracterizado ulteriormente por el análisis del péptido mediante una cromatografía de exclusión por

tamaño líquida de alta presión. La distribución de tamaño fue de la siguiente manera: 85 % en peso < 1 kD, 8 % en peso de 1 a < 2 kDa, 4 % en peso de 2 a < 5 kDa, 1 % en peso de 5 a < 10 kDa, 0,6 % en peso de 10 a 20 kDa y 1,4 % en peso > 20 kDa.

5 [0089] La toxina de cólera (TC) se obtuvo de Quadragech Diagnostics (Epsom, Reino unido). La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se obtuvo de Cambrex Bio Science (Verviers, Bélgica).

10 [0090] Los ratones (n = 6 por grupo) fueron sensibilizados oralmente con 20 mg de suero de leche y 10 µg de TC en 0,5 ml de PBS los días 0, 7, 14,21 y 28. Los ratones no sensibilizados fueron tratados con 10 µg de TC en 0,5 ml de PBS. Cinco días después de la última sensibilización, se extrajo sangre a los ratones y se recogió plasma. Se midieron los niveles de IgE específica de la proteína de suero de leche para determinar si la sensibilización había sido exitosa. En efecto, los ratones se habían vuelto alérgicos a la proteína de suero de leche, ya que se observó un aumento en la IgE específica de la proteína de suero de leche.

15 [0091] Una semana más tarde, se dio comienzo al tratamiento. Los ratones fueron tratados por vía oral 14 veces durante cuatro semanas (la primera semana 5 veces por semana, luego 3 veces por semana) con a) 0,5 ml 100 mg/ml de suero de leche, b) 0,5 ml 1 mg/ml de suero de leche, c) 0,5 ml 100 mg/ml de pWH, d) 0,5 ml 1 mg/ml de pWH o e) 0,5 ml de una mezcla de los péptidos sintéticos 1, 2, 3 y 4. La concentración de cada péptido en esta mezcla fue 80 µg/ml.

20 [0092] Tres días después del último tratamiento, los ratones recibieron una prueba intradérmica en el pabellón auricular con 10 µg de suero de leche en 20 µl de PBS. Se midió el grosor de la oreja antes de la prueba y 1 h después utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos). La diferencia en el grosor de oreja (inflamación de la oreja) constituye una indicación de la respuesta alérgica aguda medida como hipersensibilidad de tipo inmediato (HTI) y se expresa en delta µm. Nuevamente, se determinó IgE específica de la proteína de suero de leche. También se determinaron IgG1 e IgG2 específicas de la proteína de suero de leche.

30 [0093] Los resultados se muestran en la tabla 2. El tratamiento con proteína de suero de leche (en 100 mg/ml o 1 mg/ml) o con PBS mostró un aumento significativo de la respuesta alérgica en los ratones alérgicos a la proteína de suero de leche testados con proteína de suero de leche, en comparación con los ratones no alérgicos. El tratamiento con pWH (en 100 mg/ml o 1 mg/ml) tuvo como resultado una respuesta alérgica en los ratones alérgicos que no fue estadísticamente diferente ni del grupo de control de los ratones no alérgicos, ni del grupo de control de los ratones alérgicos. Las mediciones de IgE estuvieron en consonancia con aquellas observadas en la inmunoterapia oral.

35 [0094] El tratamiento en ratones alérgicos con la mezcla de péptidos de la presente invención, sin embargo, resultó en una reducción significativa de reacción alérgica en comparación con los ratones alérgicos no tratados o los ratones tratados con proteína de suero de leche.

40 [0095] Por lo tanto, la mezcla de péptidos de la presente invención es capaz de tratar los síntomas de una reacción alérgica aguda en ratones alérgicos.

Tabla 2: Respuesta de la inflamación de oreja 1 h después de la prueba intradérmica

| Grupo | Media ΔITH µm (S.E.) | HTI relativa |
|---|----------------------|--------------|
| TC + PBS | 22,29 (4,50) | 0 % |
| TC/suero de leche +PBS | 1227,7 (14,2)* | 100 % |
| TC/suero de leche + 100 mg/ml de suero de leche | 110,9 (12,8)* | 88,2 % |
| TC/suero de leche + 1 mg/ml de suero de leche | 88,79 (10,16)* | 66,2 % |
| TC/suero de leche + 100 mg/ml de pWH | 66,69 (12,67) | 44,2 % |
| TC/suero de leche + 1 mg/ml de pWH | 52,56 (3,95) | 30,1 % |
| TC/suero de leche + mezcla de péptidos | 41,25 (6,87) # | 18,9 % |

* p<0,05 en comparación con control negativo (TC + PBS)
p<0,05 en comparación con control positivo (TC/suero de leche + PBS) y grupo tratado con suero de leche (TC/suero de leche + 100 mg/ml de suero de leche).

Ejemplo 3

45 Preparado para lactantes para bebés alérgicos a la leche de vaca

[0096] Densidad energética: 0.6-0.77 kcal/ml; lípidos: 5,5 a 7 g/100 ml de preparado listo para tomar. La proteína está presente bajo la forma de aminoácidos libres y los péptidos de beta-lactoglobulina de la presente invención. Por

ES 2 652 663 T3

g de proteína están presentes aproximadamente 100 µg de mezcla de péptidos, como se ha evaluado en el ejemplo 2.

| Info. nutricional | Por 100g de polvo | Por 100 kcal* | Por 100ml |
|-------------------|-------------------|---------------|-----------|
| Energía kJ | 2918 | 413 | 292 |
| kcal | 707 | 100 | 70,7 |
| Proteínas g | 15,2 | 2,1 | 1,5 |
| Carbohidratos g | 7,6 | 1,1 | 0,76 |

| Perfil típico de aminoácidos | g / 100g de polvo |
|------------------------------|-------------------|
| L-Alanina | 0,5 |
| L-Arginina | 0,53 |
| Ácido l-aspártico | 1,1 |
| L-Cistina | 0,42 |
| Ácido l-glutámico | 3,3 |
| Glicina | 0,29 |
| L-Histidina | 0,46 |
| L-Isoleucina | 0,75 |
| L-Leucina | 1,5 |
| L-Lisina | 1,2 |
| L-Metionina | 0,43 |
| L-Fenilalanina | 0,76 |
| L-Prolina | 1,6 |
| L-Serina | 0,81 |
| L-Treonina | 0,73 |
| L-Triptófano | 0,41 |
| L-Tirosina | 0,81 |
| L-Valina | 0,99 |
| L-Carnitina | 0,03 |
| Taurina | 0,05 |

5

| Perfil de carbohidrato | g / 100g | g / 100g |
|------------------------|----------|----------|
| Polvo de carbohidrato | | |
| Dextrosa | 1,9 | 0,14 |
| Lactosa | 0,4 | 0,03 |
| Maltosa | 6,7 | 0,51 |
| Maltotriosa | 9,5 | 0,72 |
| Sacáridos más altos | 81,5 | 6,2 |

[0097] La composición comprende además grasa vegetal y microbiana, con el 0,2 % en peso de DHA basado en la grasa total.

10 Listado de secuencias

[0098]

15 <110> Nutricia N.V.

<120> Péptidos de beta-lactoglobulina para tratar la alergia a la proteína de suero de leche

<130> 203578

20 <160> 10

<170> versión de PatentIn 3,5

<210> 1

25 <211> 18

<212> PRT

ES 2 652 663 T3

<213> Bos taurus

<400> 1

Gln Lys Val Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp
 1 5 10 15

5 Ile Ser

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Bos taurus

<400> 2

Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Gln Ser

15

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

20 <213> Bos taurus

<400> 3

Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg
 1 5 10 15

Val Tyr

25

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

30 <400> 4

Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Lys Pro

35

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 5

40

Lys Val Leu Val Leu Asp Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys
 1 5 10 15

Met Glu

45

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

ES 2 652 663 T3

<213> Bos taurus

<400> 6

Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu
1 5 10 15

5 Pro Glu

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Bos traustus

<400> 7

Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu Pro Glu Gln Ser Leu Ala
1 5 10 15

Cys Gln

15

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

20 <213> Bos taurus

<400> 8

Ala Leu Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr
1 5 10 15

25 Gln Leu

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

30 <213> Bos taurus

<400> 9

Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys
1 5 10 15

His Ile

35 <210> 10

<211> 162

<212> PRT

<213> Bos taurus

40 <400> 10

Ala Tyr Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys Val Ala
1 5 10 15

Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu
20 25 30

Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro
35 40 45

ES 2 652 663 T3

Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys Trp Glu Asn Asp
50 55 60

Glu Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys Thr Lys Ile Pro Ala
65 70 75 80

Val Phe Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys Val Leu Val Leu Asp
85 90 95

Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu
100 105 110

Pro Glu Gln Ser Leu Val Cys Gln Cys Leu Val Arg Thr Pro Glu Val
115 120 125

5

Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro
130 135 140

Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys
145 150 155 160

10

His Ile

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de la vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca, que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como máximo 5 kDa, dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3.
- 10 2. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según la reivindicación 1, que comprende una mezcla de dos o tres péptidos de beta-lactoglobulina consistentes en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3.
- 15 3. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según la reivindicación 1 o 2, que comprende, como componente proteico adicional, aminoácidos libres y/o proteínas extensamente hidrolizadas.
- 20 4. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende al menos un oligosacárido no digerible seleccionado del grupo que consiste en fructo-oligosacárido, dextrina no digerible, galacto-oligosacárido, xilo-oligosacárido, arabino-oligosacárido, arabinogalacto-oligosacárido, gluco-oligosacárido, glucomano-oligosacárido, galactomano-oligosacárido, manano-oligosacárido, quito-oligosacárido, oligosacárido de ácido urónico, sialil-oligosacárido y fuco-oligosacárido.
- 25 5. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según la reivindicación 4, donde el oligosacárido no digerible es un fructo-oligosacárido de cadena corta o de cadena larga.
- 30 6. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un componente lipídico y al menos un carbohidrato digerible.
- 35 7. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende de 10 a 5000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total.
- 40 8. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende una cantidad total de proteína del 5 al 25 % basada en el peso en seco de la composición.
- 45 9. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según las reivindicaciones 4 a 8, donde la composición comprende del 0,05 al 20 % en peso del al menos un oligosacárido no digerible basado en el peso en seco de la composición.
- 50 10. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según las reivindicaciones 6 a 9, donde la composición comprende del 15 al 40 % del componente lipídico basado en el peso en seco de la composición.
- 55 11. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un preparado para lactantes o un preparado de continuación.
- 60 12. Composición nutricional para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es en forma de un polvo seco o un líquido listo para tomar.
- 65 13. Composición nutricional que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como máximo 5 kDa, dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º 3, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina es para usar en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.
14. Composición nutricional que comprende un componente proteico, un componente lipídico y carbohidratos digeribles, donde el componente proteico comprende, en particular consiste en, i) el al menos un péptido de beta-lactoglobulina según la reivindicación 1 o 2 e ii) al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína extensamente hidrolizada y aminoácidos libres, donde la suma de i) y ii) representa al menos 95 % en peso del componente proteico, y donde el componente lipídico comprende al menos 0,1 % en peso de DHA basado en los ácidos grasos totales.

15. Composición nutricional según la reivindicación 14, que comprende al menos un oligosacárido no digerible, donde el oligosacárido no digerible es un fructo-oligosacárido de cadena corta o de cadena larga.
- 5 16. Composición nutricional según la reivindicación 14 o 15, donde la composición comprende de 10 a 5000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total.
17. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 donde la composición comprende una cantidad total de proteína del 5 al 25 % basada en el peso en seco de la composición.
- 10 18. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, que es un preparado para lactantes o un preparado de continuación.
- 15 19. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, que es un preparado para lactantes o un preparado de continuación para usar en la alimentación de bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.