

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 449**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/01** (2006.01)  
**A23J 3/34** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)  
**A23C 9/152** (2006.01)  
**A23L 33/18** (2006.01)  
**A23L 33/19** (2006.01)  
**A23L 33/00** (2006.01)  
**A61K 39/35** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011** **E 16166539 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 3081225**

54 Título: **Hidrolizados de proteína láctea y fórmulas infantiles y composiciones nutricionales preparadas con ellos**

30 Prioridad:

**01.10.2010 EP 10186222**

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

**02.09.2020**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)**  
**Entre-deux-Villes**  
**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 2 781 449 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 proteína láctea y fórmulas infantiles y composiciones nutricionales preparadas con ellos

5 **Referencia a la lista de secuencias**

Esta solicitud de patente contiene una lista de secuencias legible por ordenador. La forma legible por ordenador está incorporada aquí como referencia.

10 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere a composiciones que contienen un hidrolizado de proteína láctea obtenible mediante el tratamiento de una solución de un material proteico de tipo lácteo con enzimas procedentes una fuente microbiana. Las composiciones se pueden incorporar a fórmulas infantiles y a suplementos alimenticios para adultos. La presente invención se refiere a los dos tipos distintos de hidrolizados proteicos destinados a la prevención y al tratamiento de la alergia. En el primer caso se trata de bebés sanos, pero con riesgo de alergia debido a antecedentes de familiares alérgicos. En el segundo caso se trata de bebés o adultos que son alérgicos o tienen carencias, es decir, de enfermos.

20 **Antecedentes de la presente invención**

La leche materna humana y la lactancia materna constituyen el criterio de referencia indiscutible en cuanto a nutrición infantil. Las fórmulas infantiles que sirven de sucedáneo o complemento de la leche materna humana deben satisfacer los requisitos nutricionales de los bebés, tener un sabor aceptable y ser hipoalérgicas y tolerógenas (es decir, capaces de inducir tolerancia oral) cuando van destinadas a bebés con riesgo de alergia. La inducción de tolerancia oral a 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 llevan 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 bovino y/o caseína se emplea a menudo como fuente de proteína láctea en las fórmulas infantiles. Para reducir la alergenicidad, las proteínas de la leche de vaca son hidrolizadas por enzimas y, por lo tanto, reducidas a péptidos. Las fórmulas hipoalérgicas actuales, compuestas por estos hidrolizados de proteínas lácteas de vaca, destinadas a la prevención de alergias también incluyen otros nutrientes tales como aceites animales, aceites vegetales, almidón, maltodextrina, lactosa y sacarosa. Estos hidrolizados de proteína también se pueden incorporar a una bebida láctea para adultos o a suplementos alimenticios.

El proceso de hidrólisis usado para producir estos hidrolizados debe controlarse cuidadosamente para que el producto final hidrolizado conserve su valor nutricional y las propiedades físicas deseadas, siendo hipoalérgico y tolerógeno.

Los hidrolizados pueden definirse como "parciales" o "extensos", dependiendo del grado de realización de la reacción de hidrólisis. Actualmente no existe ninguna definición legal/clínica acordada de productos extensamente hidrolizados según las directrices de la OMA (Organización mundial de la alergia) para la alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV), pero hay acuerdo en que, según la OMA, las fórmulas hidrolizadas han resultado ser una fuente de proteínas útil y ampliamente utilizada para los lactantes que padecen APLV. En la presente invención, un hidrolizado parcial es aquel en que el 60% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular inferior a 1000 Daltons, mientras que un hidrolizado extenso es aquel en que 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.

Muchos grupos han realizado investigaciones para optimizar el proceso de hidrólisis. Las condiciones de la reacción de hidrólisis, incluida la temperatura y el volumen del reactor, el número de ciclos de hidrólisis, la elección del sustrato proteico, el tipo y la concentración de enzima(s), son algunos de los muchos factores que influyen en la reacción de hidrólisis y, por lo tanto, en las propiedades físicas, químicas y, finalmente, biológicas del producto final. En la patente EP0353122 se emplean mezclas de tripsina y quimotripsina, cuya relación de actividades de tripsina/quimotripsina es de 0,33 a 0,66, para preparar hidrolizados hipoalérgicos de proteína de suero lácteo. Las patentes WO9304593 A1 y US5039532A también revelan un proceso de hidrólisis con el uso de tripsina y quimotripsina, que incluye una reacción de hidrólisis en dos etapas, con una etapa intermedia de desnaturalización térmica para asegurar que el hidrolizado final esté prácticamente libre de proteínas alérgicas intactas. La tripsina y la quimotripsina utilizadas en estos métodos son preparaciones producidas por extracción de páncreas porcino. En el mercado hay varios productos que contienen hidrolizados de proteínas preparados a base de estos métodos. Por ejemplo, una fórmula infantil Nestlé HA® se puede preparar con un hidrolizado producido mediante el uso de tripsina y quimotripsina extraídas de páncreas animal y sus características hipoalérgicas han sido bien estudiadas y documentadas. Se han publicado tres artículos importantes que comunican los resultados de un gran estudio de intervención aleatorio y doble ciego realizado en Alemania, cuya finalidad era comparar el efecto de las fórmulas hidrolizadas respecto a la fórmula estándar de leche de vaca, para la prevención de manifestaciones alérgicas, en particular el eccema atópico, en lactantes de riesgo. Las publicaciones se enumeran a continuación. The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial [El efecto de la fórmula de leche de

*vaca hidrolizada en la prevención de alergias durante el primer año de vida: estudio alemán de intervención nutricional infantil, un ensayo aleatorizado doble ciego*. von Berg A, Koletzko S, Gröbl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; grupo de estudio alemán de intervención nutricional infantil. J Allergy Clin Immunol. 2003 marzo; 111: 533-40.

Ciertas fórmulas hidrolizadas reducen la incidencia de dermatitis atópica pero no la de asma: resultados de tres años del estudio alemán de intervención nutricional infantil. von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Gröbl A, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; grupo de estudio alemán de intervención nutricional infantil. J Allergy Clin Immunol. 2007 Mar; 119: 718-25.

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

La conclusión del último estudio GINI fue que la intervención nutricional temprana con Nestle H.A. fórmula infantil, NAN HA® en niños de alto riesgo tiene un efecto preventivo a largo plazo sobre la dermatitis atópica hasta la edad de 6 años, lo cual indica una disminución real de la enfermedad, en lugar de demorar su aparición.

El efecto preventivo a largo plazo, es decir, el que persiste mucho más allá del periodo de alimentación con Nan HA®, demuestra que se indujo la tolerancia oral, aunque los mecanismos inmunológicos involucrados en esta inducción de tolerancia no han sido examinados en el estudio GINI.

Además de ser hipoalérgica, sería muy conveniente que la fórmula infantil destinada al uso como complemento o sucedáneo de la leche materna tuviera la capacidad de inducir la tolerancia oral en el bebé. La tolerancia oral es la supresión específica de la reactividad inmunológica celular y/o humoral a un antígeno mediante la administración previa del antígeno por vía oral. Es una parte importante del desarrollo del sistema inmunitario en los primeros meses de vida y permite que el bebé consuma alimentos sin reacciones adversas. El fallo de la constitución de la tolerancia oral conduce a la alergia. El desarrollo de la tolerancia oral está relacionado con la educación del sistema inmunitario y termina con una reacción reducida a los antígenos alimentarios. Se cree que algunos péptidos, que pueden estar contenidos específicamente en una fórmula infantil parcialmente hidrolizada, tienen la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario e inducir la inducción de tolerancia oral. Se cree que estos péptidos deberían tener propiedades especiales, incluido un tamaño relativamente pequeño, para secundar mejor la educación del sistema inmunitario sin actuar como alérgenos. También se cree que las secuencias de los péptidos específicos pueden desempeñar un papel importante. En el núcleo de la inducción de la tolerancia oral pueden estar involucrados perfiles peptídicos específicos del hidrolizado.

Actualmente hay una tendencia general a apartarse del uso de enzimas de origen animal para emplear los de fuentes microbianas. En los últimos 20 años se ha progresado mucho en el campo de la producción de enzimas por ingeniería genética. Esto ha permitido preparar de forma reproducible grandes cantidades de enzimas de alta calidad y pureza en un espacio de tiempo relativamente corto. Por estas razones sería conveniente poder usar enzimas de una fuente microbiana para producir hidrolizados de proteínas lácteas destinados a las fórmulas infantiles hipoalérgicas. Además, sería muy deseable que estos hidrolizados de proteínas lácteas tuvieran la capacidad de inducir tolerancia oral en los lactantes.

Por lo tanto, para mantener las propiedades hipoalérgicas de los hidrolizados obtenidos con enzimas de mamíferos, los producidos con enzimas microbianos deben poseer propiedades químicas, físicas y biológicas similares. Además, cualquier nueva fórmula infantil del mercado se somete a estrictas normas legales. En Europa, por ejemplo, se aplica la directiva 2006/141/CE. Por tanto es conveniente que cualquier producto nuevo tenga un perfil peptídico muy similar al del producto ya autorizado producido con enzimas de mamíferos, para mantener un efecto preventivo de la alergia. También sería muy deseable que estos hidrolizados de proteínas lácteas tuvieran la capacidad de inducir tolerancia oral en los lactantes.

De manera similar conviene promover la reducción de alergias o efectos adversos, mejorar la absorción de proteínas o aminoácidos, favorecer el uso de proteínas o aminoácidos y/o modular los procesos inflamatorios en los pacientes enfermos, sobre todo proporcionando hidrolizados especiales de proteínas en composiciones nutricionales completas.

Se necesita un hidrolizado de proteínas lácteas preparado por la acción de enzimas no procedentes de mamíferos, preferiblemente mediante enzimas microbianos que muestren poca alergenidad y tengan la capacidad de inducir la tolerancia oral.

Es necesario que dicho hidrolizado esté contenido preferentemente en una fórmula infantil y/o en una composición nutricional destinada a individuos con riesgo de alergias.

Es necesario que dichas composiciones disminuyan el riesgo o la gravedad de las alergias durante la vida posterior y ayuden a modular la aparición de síntomas alérgicos.

Es necesario obtener hidrolizados basados en enzimas bacterianos, con perfiles peptídicos que compartan algunas similitudes con los hidrolizados obtenidos mediante los enzimas procedentes de mamíferos y que además puedan reproducir las propiedades de tolerancia oral de estos últimos, con la prevención verificada de los síntomas alérgicos.

Es necesario usar los enzimas arriba mencionados en la preparación de composiciones nutricionales para pacientes enfermos o frágiles.

Además de producir hidrolizados "parciales", estos enzimas microbianos también se pueden emplear en la producción de hidrolizados de proteínas "extensos" para ser incluidos en fórmulas terapéuticas como las destinadas a alimentar a lactantes y niños alérgicos a la leche de vaca. En este caso la población diana estaría constituida por bebés y niños enfermos (alérgicos) que ya estén sensibilizados a las proteínas de la leche de vaca.

Esos enzimas microbianos también podrían usarse para producir cualquier tipo de hidrolizados proteicos utilizados en productos para lactantes, niños o adultos con el objetivo de lograr otros beneficios distintos de los relacionados con la alergia, tales como facilitar la digestión, mejorar la absorción y la metabolización de aminoácidos, péptidos y proteínas, favorecer la convalecencia de las enfermedades, optimizar la utilización de fuentes de nitrógeno, fomentar la formación de tejido y la reserva de energía.

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. Controlaron parámetros que incluyen el rendimiento de la reacción de hidrólisis, la especificidad de los enzimas y el perfil de peso molecular de los péptidos y han comprobado que varias mezclas de enzimas específicos producen hidrolizados con las propiedades físicas, químicas y biológicas deseadas. Los hidrolizados de proteínas lácteas aquí descritos pueden obtenerse de forma eficiente y reproducible, pueden tener un sabor aceptable y el valor nutricional requerido y son hipoalérgicos. Además, los hidrolizados de la presente invención pueden inducir la tolerancia oral.

#### Resumen de la presente invención

La presente invención se refiere a composiciones tal como se definen en las reivindicaciones, que llevan hidrolizados de proteínas lácteas obtenibles mediante tratamiento de una solución de un material proteico a base 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.

Según las características tipológicas del peso molecular de los péptidos, de las secuencias peptídicas (especificidad de las endopeptidasas) y la eficacia hidrolítica de las endopeptidasas, los hidrolizados de la presente invención tienen unas propiedades similares a las de los hidrolizados de proteínas lácteas producidos por enzimas de mamíferos.

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

Los hidrolizados se pueden incorporar a una fórmula infantil inicial, a una fórmula de continuación, a una fórmula alimenticia para bebés, a una fórmula de cereales para lactantes o a una leche de crecimiento, o a una composición nutricional para adultos o a una bebida para adultos a base de proteínas lácteas destinada a individuos necesitados de terapia, y dicha composición es preferiblemente una fórmula infantil inicial.

En un aspecto de la presente invención al menos una endopeptidasa de tipo tripsina procede de una cepa de *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium oxysporum*.

En otro aspecto de la presente invención al menos una endopeptidasa de tipo quimotripsina procede de una cepa de *Nocardiosis*, preferiblemente *Nocardiosis* Sp.

En otro aspecto de la presente invención, la relación entre la endopeptidasa de tipo tripsina y la endopeptidasa de tipo quimotripsina, basada en el peso del enzima, está comprendida en el intervalo de 25:1 hasta 30:1.

#### Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Separación por cromatografía de exclusión de tamaños de los péptidos de los hidrolizados del ejemplo 1. Los péptidos se separan en función de su peso molecular (PM) usando una columna de cromatografía de exclusión de tamaños (Superdex Peptide 10/300 GL de GE). La elución de los péptidos se controla por UV a 215 nm. Los resultados demuestran que las distribuciones de tamaños de las combinaciones 2, 4 y 6 son muy parecidas a la de la PTN de referencia (ensayo 1, véase el texto) tal como ilustra el fuerte descenso del peso molecular alto hacia el peso molecular bajo, en comparación con las combinaciones 3 y 5, donde se observa más bien una meseta (ver línea de tendencia). Estos resultados sugieren que la eficiencia enzimática de los ensayos 2, 4 y 6 está generando

una población de péptidos de tamaño muy parecido, mientras que los ensayos 3 y 5 están más enriquecidos en péptidos más pequeños en comparación con la referencia.

Fig. 2. Análisis de la especificidad enzimática de los hidrolizados del ejemplo 1. Las secuencias peptídicas se identifican por LC-MS/MS (MS LTQ-Orbitrap con bombas HPLC Allegro, de Thermo Scientific)). De cada secuencia identificada se extraen los cinco aminoácidos antes y después del sitio de escisión (posición -1), y se representa gráficamente la frecuencia (o conservación de secuencia). Los aminoácidos se representan desde la frecuencia más alta (superior) hasta la más baja (inferior), con su tamaño vertical proporcional a su frecuencia. Los resultados indican que las mezclas de enzimas utilizadas en los ensayos 4 y 6 tienen una especificidad enzimática comparable a la de la PTN de referencia (experimento 1).

Fig. 3. Cinética del consumo de OH<sup>-</sup> durante las reacciones de hidrólisis del ejemplo 1 (mmoles de OH<sup>-</sup> consumido / g de proteína).

### Descripción detallada de la presente invención

Los hidrolizados de proteínas lácteas según la presente invención se obtienen tratando una solución de un material proteico a base de leche con una endopeptidasa análoga a la tripsina y una endopeptidasa análoga a la quimotripsina, ambas procedentes de una fuente microbiana.

#### Material proteico a base de leche

El material de partida para las composiciones según la presente invención es un material proteico a base de leche. Puede ser un material proteico a base de suero lácteo, caseína o mezclas de material proteico a base de suero lácteo con caseína. La fuente de caseína puede ser caseína ácida o sólidos lácteos sin grasa. El material proteico a base de suero lácteo puede ser un suero procedente de la fabricación de queso, en particular un suero dulce como el resultante de la coagulación de la caseína por el cuajo, un suero ácido procedente de la coagulación de la caseína por un ácido o por fermentos acidulantes, o incluso un suero mixto resultante de la coagulación por un ácido y el cuajo. Este material de partida puede ser un suero lácteo desmineralizado por intercambio iónico y/o electrodiálisis y es conocido como proteína de suero desmineralizado (DWP). En una forma de ejecución preferida, la fuente de dicho material proteico a base de suero lácteo es suero dulce del cual se ha eliminado total o parcialmente el glucomacropéptido de caseína (GMPC) y se denomina suero dulce modificado (MSW). La eliminación del GMPC del suero dulce produce un material proteico cuyo contenido de treonina y triptófano es más parecido al de la leche humana. En la patente EP 880902 se describe un proceso para eliminar el GMPC del suero dulce.

El material de partida puede ser una mezcla de DWP y MSW. Puede ser un concentrado de proteínas de suero lácteo con 35-80% de proteína (WPC) o un aislado, si la concentración de proteína de suero lácteo es superior al 95% (WPI). Como ejemplo de WPC se puede mencionar el WPC 87 Lacprodan®, comercializado por Aria Foods, Dinamarca, y como ejemplo de WPI el Bipro®, de Davisco Foods International (Minnesota, EUA).

El material proteico a base 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%, sobre todo del 6-10%.

El material de partida también puede ser una combinación de los materiales de partida arriba mencionados y lactosa. La lactosa puede estar formando parte del concentrado de proteína de suero lácteo o estar incorporada. La adición de lactosa al material de partida de la hidrólisis tiene la ventaja de que se hidroliza cualquier proteína residual contenida en la lactosa. La lactosa puede estar a una concentración del 0,05 al 30% p/p, preferiblemente del 0,10 al 20% p/p o, en aquellos casos en los que se prefiere un menor contenido de lactosa, del 0,10 al 1%, preferiblemente del 0,10 al 0,20% (p/p). En este último caso el producto final puede ir destinado a bebés o adultos con baja tolerancia a la lactosa. La lactosa se puede eliminar, por ejemplo, por ultrafiltración (con producción de suero de 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

Aquí, "producido a partir de" debe entenderse como producido mediante fermentación por una célula del organismo en cuestión. Estos enzimas pueden ser nativos del organismo donde se originan o pueden obtenerse por ingeniería genética en un organismo huésped, insertando la secuencia de nucleótidos que codifica la endopeptidasa.

#### Endopeptidasa de tipo tripsina:

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una serina proteasa que se halla en el sistema digestivo de muchos vertebrados, donde hidroliza proteínas. Es producido en el páncreas como proenzima tripsinógeno inactivo. La tripsina escinde cadenas o enlaces peptídicos principalmente por la parte carboxílica de los aminoácidos lisina o arginina, excepto cuando uno de ellos es seguido de prolina. En la presente invención, por "endopeptidasa de tipo tripsina" se entiende un enzima que tiene una actividad semejante a la actividad de la tripsina de mamífero, como p.ej. la tripsina extraída del tejido

pancreático porcino. "Endopeptidasa de tipo tripsina" también se refiere a una endopeptidasa que escinde de manera preferente péptidos o proteínas por el lado C-terminal del isómero L de arginina y/o lisina, preferiblemente de arginina y lisina. La endopeptidasa de tipo tripsina se puede obtener de una cepa bacteriana gram-positiva tal como *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Kutzneria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces*, o de una cepa bacteriana gram-negativa tal como *Campylobacter*, *Escherichia* (con preferencia *E. coli*), *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*, o de una cepa fúngica como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Claviceps*.

Según la presente invención, la endopeptidasa de tipo tripsina es una endopeptidasa fúngica de una cepa de *Fusarium*, preferiblemente de *Fusarium oxysporum*, cuya secuencia está registrada con el nombre SWISSPROT nº P35049. La endopeptidasa de tipo tripsina tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o el 100% de identidad con la secuencia SWISSPROT nº P35049. El enzima codificado por esta última secuencia está descrito (US 5,288,627; US 5,693,520).

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

Dicho de otra forma, expresada en 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, lo cual es independiente de la presencia de quimotripsina como endopeptidasa.

#### Los enzimas: endopeptidasa de tipo quimotripsina:

La quimotripsina (EC 3.4.21.4) es una serina proteasa que escinde preferentemente enlaces peptídicos amida cuando la parte carboxílica del enlace amídico (la posición P1) es tirosina, triptófano o fenilalanina. La quimotripsina también hidroliza otros enlaces amídicos de péptidos a velocidades más lentas, sobre todo en aquellos que contienen leucina en la posición P1. Por "endopeptidasa de tipo quimotripsina" se entiende un enzima que tiene una actividad similar a la de la quimotripsina de mamíferos, p.ej. la quimotripsina extraída de tejido pancreático porcino. También se refiere a un enzima que tiene mayor especificidad para escindir por el lado carboxi-terminal de cada uno de los restos de tirosina, fenilalanina, triptófano, leucina, metionina e histidina, que para escindir por el lado carboxi-terminal de arginina y lisina.

Según la presente invención, la quimotripsina procede de una cepa de *Nocardopsis*, preferiblemente de *Nocardopsis* sp. EMBL CDS CAI94179 (descrita previamente, p.ej. en WO 88/03947). La endopeptidasa de tipo quimotripsina tiene una identidad secuencial con el polipéptido EMBL CDS CAI94179 de al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o del 100%.

Se prefiere una concentración de endopeptidasa del tipo quimotripsina de 100-100.000 unidades USP de quimotripsina por g de proteína láctea, con mayor preferencia de 500-50.000 y sobre todo de 1.000-20.000. Una unidad USP de quimotripsina es la actividad que produce un cambio en la absorbancia a 237 nm de 0,0075 a pH 7,0 y 25°C, usando N-acetil-L-tirosina etil éster (ATEE) como sustrato. Dicho de otra forma, expresada en 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 sobre todo entre 0,15 y 0,4 mg por gramo de proteína láctea, lo cual es independiente de la presencia de la endopeptidasa de tipo tripsina.

Durante el proceso de hidrólisis los enzimas se usan conjuntamente como una mezcla. Por ejemplo, la endopeptidasa de tipo tripsina procedente de *Fusarium oxysporum* se puede combinar con la endopeptidasa de tipo quimotripsina procedente de *Nocardopsis* sp.

Los presentes inventores han visto que la relación entre la endopeptidasa de tipo tripsina y la endopeptidasa de tipo quimotripsina (proporción T/C), basada en el peso del enzima, debe estar comprendida en el intervalo de 25:1 a 30: 1.

Esto es cierto en concreto para una combinación en relación T/C 27:1 de endopeptidasa tipo tripsina (T) de *Fusarium oxysporum* con endopeptidasa tipo quimotripsina (C) de *Nocardopsis*.

#### El proceso de hidrólisis:

Las condiciones normales para llevar a cabo el proceso de hidrólisis se han descrito en el estado técnico anterior. La temperatura puede variar aproximadamente entre 40°C y 60°C, preferiblemente es de 50°C; el tiempo de reacción es de 1 a 6 horas, preferiblemente de 4 horas, y los valores de pH pueden estar comprendidos en el intervalo entre 6,5 y 8,5, preferiblemente entre 7,0 y 8,0. El pH se puede ajustar con agentes conocidos, por ejemplo con Ca(OH)<sub>2</sub>. En las patentes US5039532 o EP0631731A1 se describe una reacción de hidrólisis en dos etapas, con una etapa intermedia de desnaturalización térmica para asegurar que el hidrolizado final quede prácticamente libre de alérgenos proteicos.

de la leche. La etapa de desnaturalización térmica tiene lugar preferiblemente a 95°C durante 5 minutos.

Opcionalmente, la solución o suspensión de proteínas lácteas se puede precalentar (por ejemplo a 80-100°C durante 5-30 minutos o a 130°C durante unos 30-60 segundos), para garantizar la desnaturalización de las proteínas del suero lácteo, como p.ej. la  $\alpha$ -lactoalbúmina, la  $\beta$ -lactoglobulina y la albúmina sérica (ASB).

Independientemente de cómo se lleve a cabo la hidrólisis, el producto hidrolizado se somete a un tratamiento térmico que inactiva el enzima hidrolítico. Este tratamiento térmico consiste en precalentar el hidrolizado a una temperatura igual o superior a 75°C y mantenerlo a esta temperatura (preferiblemente a 75°C-85°C) durante 0,1 hasta 30 minutos aproximadamente, para provocar la auto-digestión del enzima. Este tratamiento va seguido convenientemente de 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 en un intercambiador de calor.

El hidrolizado resultante se puede clarificar, filtrar o ultrafiltrar. También se puede concentrar. Luego se puede secar, por ejemplo por liofilización o pulverización, para diferentes aplicaciones, o incluso se puede someter a un tratamiento posterior. En este último caso el enzima puede ser inactivado durante dicho tratamiento posterior.

Los hidrolizados de la presente invención pueden tener un grado de hidrólisis caracterizado por NNP/NT%. NNP/NT% significa nitrógeno no proteico dividido por nitrógeno total x 100. El nitrógeno no proteico es nitrógeno amínico libre de reaccionar con un reactivo tal como el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). El NNP/NT% puede medirse del modo detallado en Adler-Nissen J-, 1979, J. Agric. Food Chem., 27 (6), 1256-1262. Los hidrolizados extensos se caracterizan en general, por tener un NNP/NT% mayor del 95%, mientras que un hidrolizado parcialmente hidrolizado se caracteriza por tener un NNP/NT% comprendido en el intervalo del 75%-85%. En una forma de ejecución preferida los hidrolizados de la presente invención tienen un NNP/NT% en el intervalo del 70-90%, preferiblemente del 75 al 85%. Estos últimos son hidrolizados "parciales". Estos hidrolizados también son identificables porque el 60-70% de su población proteica/peptídica tiene un peso molecular < 1000 Daltons.

En otra forma de ejecución preferida, para la cual se desean hidrolizados "extensos", los hidrolizados de la presente invención tienen un NNP/NT% superior al 95%. Estos hidrolizados también pueden caracterizarse porque al menos el 95% de su población proteica/peptídica tiene un peso molecular < 1000 Daltons.

Los hidrolizados de la presente invención pueden tener un grado de hidrólisis caracterizado por el NNP/NT%. El tanto por ciento de nitrógeno no proteico sobre el nitrógeno total se emplea generalmente como una medida del contenido de los péptidos solubles resultantes de la hidrólisis enzimática. El método analítico utilizado para medir el NNP equivale al método AOAC 991.21. En los hidrolizados basados al 100% en proteína de suero lácteo el porcentaje de NNP/NT oscila generalmente entre el 70-90%. En una forma de ejecución preferida, los hidrolizados de la presente invención tienen un 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 extensamente hidrolizado, los hidrolizados de la presente invención tienen un NNP/NT% superior al 95%.

La distribución de peso molecular 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 según la presente invención es un hidrolizado parcial, en el cual menos del 1% en peso de los péptidos que lo componen tiene un peso molecular superior a 20.000 kDa. En una forma de ejecución más preferida los hidrolizados de la presente invención tienen una distribución ponderal de péptidos análoga a la obtenida con enzima de mamífero, en particular con enzima porcino, como por ejemplo el PTN 6.0S® (también conocido como PTN) de Novozyme (Dinamarca) (véase ejemplo 1, figura 1). Este enzima de referencia es una tripsina extraída del páncreas de cerdo que lleva tripsina como componente principal, pero también quimotripsina residual. Tiene una actividad de tripsina de 1350 USP de tripsina/g y su actividad de quimotripsina es de 80 USP de quimotripsina/g, lo cual da una relación T/C de 16 basada en estas actividades.

La especificidad enzimática de las mezclas de enzimas utilizadas durante la hidrólisis puede evaluarse 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 similar a la obtenida con enzima de mamífero, en concreto con enzima porcino, por ejemplo el PTN 6.0S arriba descrito (véase el ejemplo 1, figura 2).

La eficacia de la hidrólisis puede evaluarse midiendo el consumo de álcali (OH) durante la hidrólisis. En una forma de ejecución más preferida los hidrolizados de la presente invención tienen un rendimiento hidrolítico cercano al obtenido con enzima de mamífero, en concreto con enzima porcino, por ejemplo el PTN arriba descrito (véase el ejemplo 1, figura 3).

La antigenicidad residual de los hidrolizados se puede evaluar con inmunoensayos estándar tales como las pruebas ELISA. Los hidrolizados de la presente invención contienen preferiblemente una proporción de  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) residual < 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).

Los hidrolizados de la presente invención se pueden añadir a fórmulas infantiles, fórmulas de continuación, productos alimenticios para bebés, cereales infantiles, leches de crecimiento, suplementos alimenticios para bebés o niños, o a composiciones nutricionales para adultos, es decir, a todas las preparaciones dirigidas a la prevención o al tratamiento de alergias, así como a cualquier otro beneficio que los hidrolizados proteicos puedan proporcionar a los humanos, y dicha composición es preferiblemente una fórmula infantil inicial.

En una forma de ejecución de la presente invención, los hidrolizados de la misma se usan combinados con probióticos escogidos, por ejemplo en las fórmulas infantiles. Los probióticos escogidos pueden ser cualesquiera de los probióticos que se usan normalmente en las fórmulas infantiles. Los probióticos son preferiblemente aquellos capaces de producir un efecto adicional o sinérgico sobre las alergias y/o los procesos inflamatorios y/o inducir la tolerancia oral.

Como ejemplos de microorganismos probióticos adecuados, utilizables en la presente invención, cabe citar levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, hongos como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Torulopsis*, y bacterias tales como los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*. Los ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados son: *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 delbrückii subsp. lactis*, *Lactobacillus farciminius*, *Lactobacillus gasseri*, *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*.

Las cepas bacterianas probióticas preferidas incluyen *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, que puede adquirirse a 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 puede adquirirse a BioGaia AB, *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, vendido entre otros por la empresa 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.

Cuando se incluyen en las composiciones de la presente invención, la proporción de probióticos es preferiblemente de  $10^3$  a  $10^{12}$  ufc/g, con mayor preferencia de  $10^6$  a  $10^{11}$  ufc/g, con incluso mayor preferencia de  $10^4$  a  $10^9$  ufc/g, sobre todo de  $10^7$  a  $10^9$  ufc/g de composición o por ml de composición.

#### EJEMPLOS:

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

El sustrato proteico se disolvió 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 se ajustó el pH a 7,4 con una solución de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al 10%. Tras la adición de enzima (la mitad de todo el enzima, para la 1ª etapa de hidrólisis), el pH se mantuvo constante a 7,4, añadiendo NaOH 0,25 M y usando un autovalorador DL50 Graphix (Mettler Toledo), durante 4 horas a 55°C. El hidrolizado se calentó durante 5 min 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 antes. Tras 2 horas de hidrólisis, la reacción enzimática se detuvo por tratamiento térmico (5 min a 85°C) para inactivar los enzimas.

La **tabla 1** muestra la serie de ensayos llevados a cabo con las diversas proporciones de enzimas. TL1 y TL2 denotan las endopeptidasas de tipo tripsina procedentes de *Fusarium oxysporum* y *Kutzneria albida*, respectivamente. CTL2 y CTL3 denotan las endopeptidasas de tipo tripsina quimotripsina procedentes de *Metarhizium anisopliae* y *Nocardiaopsis* sp, respectivamente.

Ensayo	Enzima (mg/g de proteína)	Relación T/C (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 obtenidos se analizaron usando tres métodos diferentes, cromatografía de exclusión de tamaño peptídico, análisis de especificidad enzimática y antigenicidad residual. La eficiencia de hidrólisis de las seis reacciones se analizó controlando el consumo de OH. Los resultados se muestran respectivamente en las figuras 1-3.

Antigenicidad: La antigenicidad residual de los hidrolizados se analizó usando un inmunoensayo enzimático comercial (RIDASCREEN  $\beta$  - Lactoglobulin (BLG), r-biopharm) diseñado para cuantificar la  $\beta$ -lactoglobulina residual nativa y procesada en los productos alimenticios. Los pocillos de microvaloración se recubren con BLG. Se añaden patrones, soluciones de muestra y anticuerpos anti-BLG. La BLG libre y la inmovilizada compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Tras el lavado se añaden anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa que se unen a los complejos de anticuerpos-BLG. Cualquier conjugado enzimático no unido se elimina luego en una etapa de lavado. Se agrega sustrato enzimático y cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido transforma 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.

Los seis hidrolizados ensayados en el ejemplo 1 mostraron una  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) residual de inferior a 0,85 mg de equivalente de BLG/g de equivalente proteico, que está muy por debajo del nivel que permite declarar la fórmula infantil como 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 requiere que el contenido de proteína inmunorreactiva sea inferior al 1% del total de sustancias nitrogenadas, lo cual equivale a 3 mg de  $\beta$ -lactoglobulina residual (BLG/g de equivalente proteico). La BLG constituye entre el 30% y el 50% del material inmunorreactivo total en el suero lácteo. Por consiguiente un nivel de BLG menor de 3 mg de  $\beta$ -lactoglobulina/g de equivalente proteico residual indica que el producto no tiene más del 1% de proteína inmunorreactiva. Este nivel es coherente con el anexo IV de la directiva de la Comisión Europea 2006/125/CE, que establece determinadas condiciones para poder reivindicar que una fórmula infantil reduce el riesgo de alergia.

#### Conclusión:

Se ha comprobado que varias mezclas de endopeptidasas de tipo tripsina con endopeptidasas de tipo quimotripsina procedentes de fuentes microbianas son adecuadas para producir hidrolizados de proteínas lácteas con propiedades similares a las de los hidrolizados lácteos producidos por enzimas de mamíferos. Los presentes inventores han llevado a cabo una serie de ensayos a fin de evaluar la proporción óptima de enzimas para producir hidrolizados que tengan 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 enzima), así como la relación de enzima a sustrato proteico y la temperatura.

Se ha encontrado que una mezcla de una endopeptidasa similar a la tripsina procedente de *Fusarium oxysporum* o de *Kutzneria albida* combinada con una endopeptidasa similar a la quimotripsina procedente de *Nocardiaopsis* sp o de *Metarhizium anisopliae* es una buena opción para reemplazar los enzimas de mamíferos empleados actualmente. Se ha demostrado claramente que las mezclas de la presente invención, sobre todo si la endopeptidasa de tipo tripsina y la endopeptidasa de tipo quimotripsina se utilizan en proporciones específicas, proporcionan unos perfiles peptídicos muy parecidos a los producidos con los enzimas de mamíferos.

Esto es especialmente cierto para la endopeptidasa (T) tipo tripsina procedente de *Fusarium oxysporum* combinada con la endopeptidasa tipo quimotripsina (C) procedente de *Nocardiaopsis* en una relación T/C (basada en el peso de enzima) de 9:1, y para la tripsina tipo endopeptidasa (T) procedente de *Kutzneria albida* en combinación con la endopeptidasa tipo quimotripsina (C) procedente de *Nocardiaopsis* en una relación T/C de 27:1, y para la endopeptidasa tipo tripsina (T) procedente de *Fusarium oxysporum* combinada con la endopeptidasa tipo quimotripsina (C) procedente de *Nocardiaopsis* en una relación T/C de 27:1.

Los hidrolizados así producidos tienen poca alergenicidad. Pueden reducir el riesgo de alergias en la vida posterior y pueden ser idóneos para incorporarlos a una fórmula infantil y/o a una composición nutricional destinada a individuos sanos con riesgo de padecer alergias. Son adecuados para incorporarlos a cualquier tipo de suplementos alimenticios para adultos, niños o bebés. También pueden tener la capacidad de inducir tolerancia oral.

Aparte de la finalidad preventiva contra las alergias, las mezclas de tripsina y quimotripsina procedentes de fuentes microbianas se pueden emplear para obtener productos terapéuticos como los destinados a la alimentación de sujetos alérgicos. También se pueden usar para producir cualquier tipo de hidrolizados proteicos destinados a conseguir otros beneficios además de la prevención/tratamiento de la alergia.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NESTEC S.A.  
<120> HIDROLIZADOS A BASE DE PROTEÍNA LÁCTEA  
<130> 11148  
<160> 1

&lt;170&gt; BiSSAP 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kutzneria albida

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; FUENTE

&lt;222&gt; 1..225

&lt;223&gt; /mol\_tipo="proteína" /organismo="Kutzneria albida"

&lt;400&gt; 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
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. Una composición que contiene un hidrolizado de proteínas lácteas obtenible por tratamiento de una solución de un material proteico a base de leche con

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,

de manera que la endopeptidasa de tipo tripsina es producida mediante fermentación por una célula de un organismo de una cepa de *Fusarium oxysporum* y tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o el 100% de identidad con la secuencia indicada por SWISSPROT nº P35049 y la endopeptidasa de tipo quimotripsina es producida mediante fermentación por una célula de un organismo de la cepa *Nocardiosis Sp* y tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o el 100% de identidad con las secuencias polipeptídicas de EMBL CDS CAI94179, y la relación de endopeptidasa de tipo tripsina a endopeptidasa de tipo quimotripsina (T/C) varía entre 25:1 y 30:1,

para inducir la tolerancia oral en lactantes o pacientes que lo necesiten, o para reducir el riesgo de alergias en lactantes o pacientes que lo necesiten, o para disminuir la gravedad o la frecuencia de alergias durante la infancia o en la vida posterior de lactantes o pacientes que lo necesiten.

2. La composición para usar según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el material proteico a base de leche es proteína de suero lácteo, caseína o mezclas de ambas, preferiblemente con una relación ponderal suero lácteo/caseína de al menos 50/50, 60/40 o 70/30; y con mayor preferencia el material proteico a base de leche es proteína de suero lácteo.

3. La composición para usar según la reivindicación 2, **caracterizada porque** el material proteico a base de leche es proteína de suero lácteo dulce, del cual preferiblemente se ha eliminado total o parcialmente el glucomacropéptido de caseína, o bien es un aislado de proteína de suero lácteo o una mezcla de estas fuentes proteicos.

4. La composición para usar según la reivindicación 2 o 3, **caracterizada porque** el material proteico a base de leche es una mezcla de suero lácteo dulce del cual se ha eliminado total o parcialmente el glucomacropéptido de caseína (GMPC).

5. Una composición que contiene un hidrolizado de proteínas lácteas obtenible por tratamiento de una solución de un material proteico a base de leche con

a) al menos una endopeptidasa de tipo tripsina producida mediante fermentación por una célula de un organismo de una cepa de *Fusarium oxysporum* que tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o el 100% de identidad con la secuencia SWISSPROT No. P35049,

b) al menos una endopeptidasa de tipo quimotripsina producida mediante fermentación por una célula de un organismo de una cepa de *Nocardiosis Sp* que tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o el 100% de identidad con la secuencia EMBL CDS CAI94179,

**caracterizado porque** la relación de endopeptidasa de tipo tripsina a endopeptidasa de tipo quimotripsina, basada en el peso de enzima, es de 25:1 hasta 30:1, con mayor preferencia de 27:1.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de una fórmula infantil, una fórmula de continuación, una fórmula alimenticia para bebés, una fórmula de cereales para bebés o una leche de crecimiento, un suplemento alimenticio para bebés o niños o una composición nutricional para adultos destinada a la prevención o al tratamiento de la alergia, preferiblemente en forma de una fórmula infantil inicial.

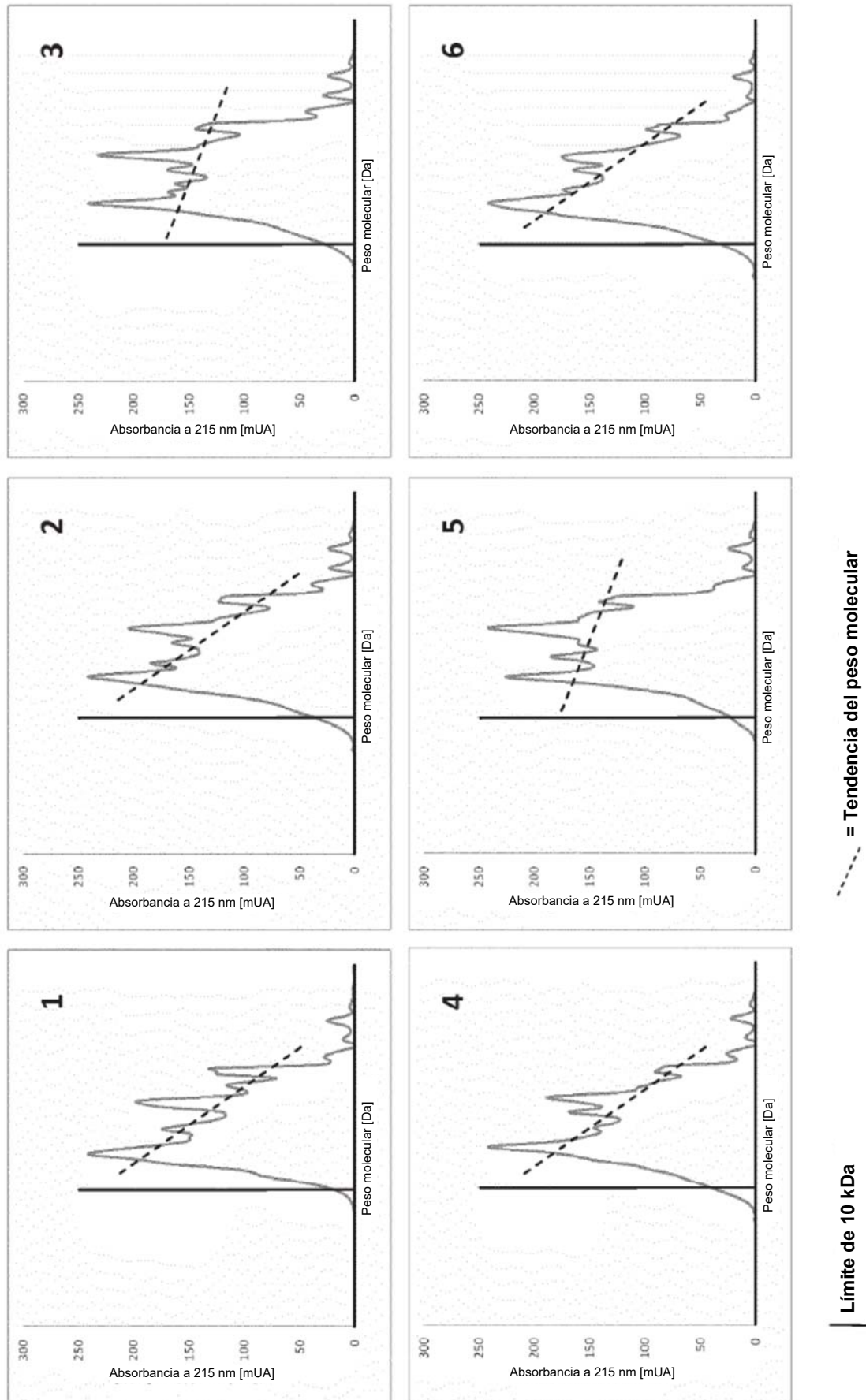


Fig. 1

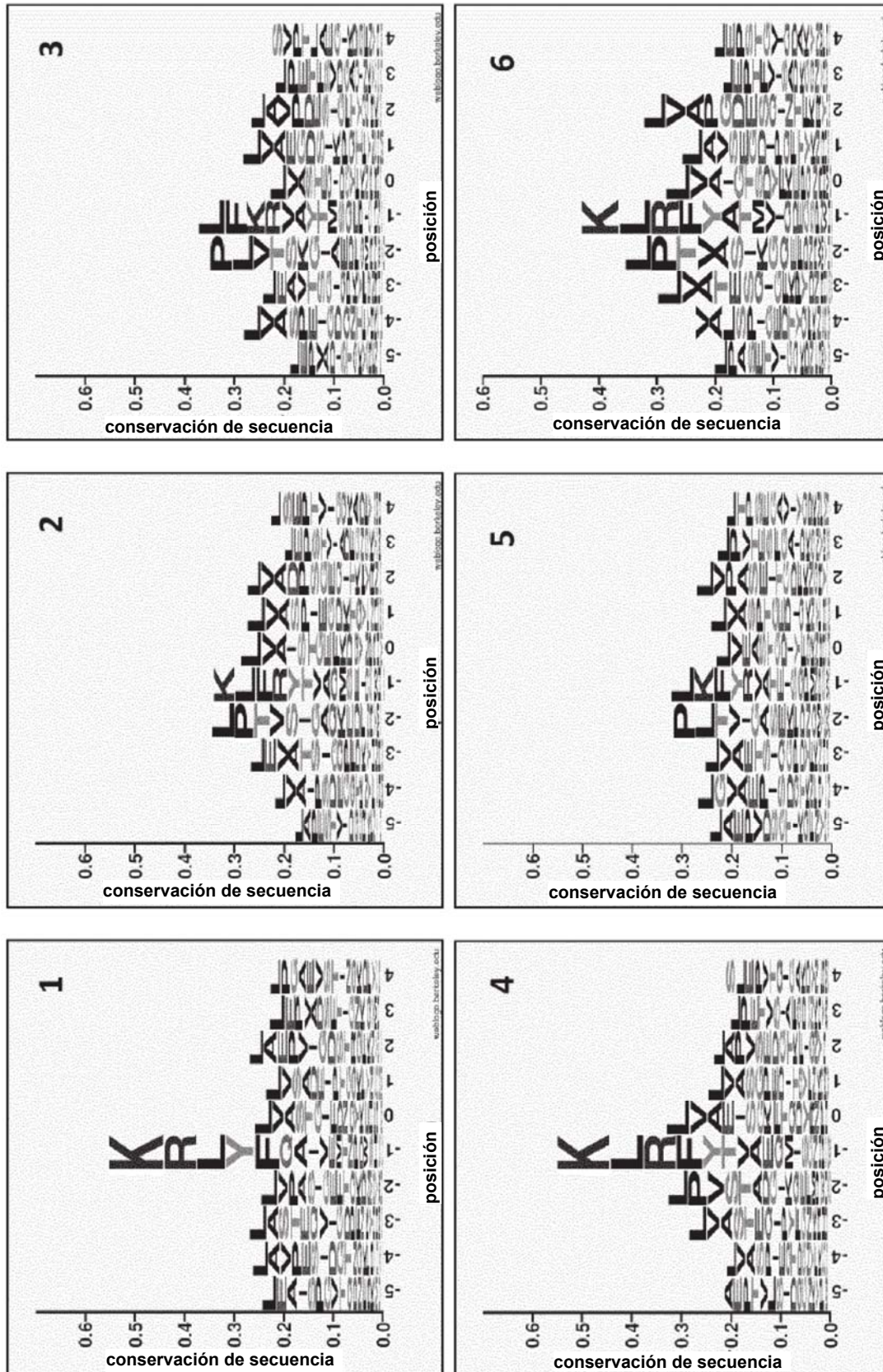


Fig. 2



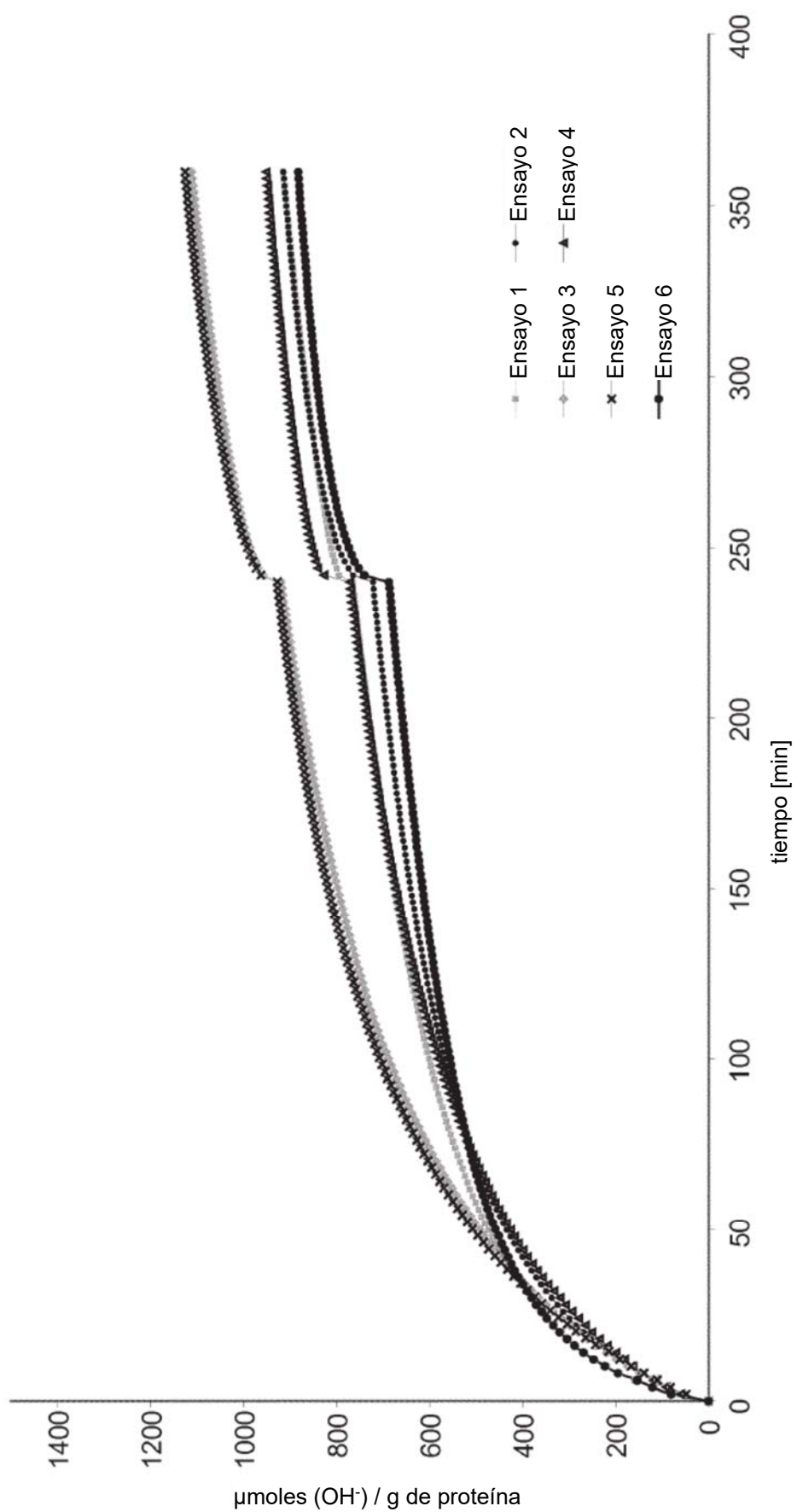


Fig. 3