

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 288**

51 Int. Cl.:

A23L 33/18 (2006.01)

A23L 33/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 16187809 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3135125**

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:

03.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KNIPPELS, LEON MATTHIEU JOHANNES;
GARSEN, JOHAN y
MEULENBROEK, LAURA ANTOINETTE
PETRONELLA MARIA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 791 288 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 vaca, en particular a la proteína del suero de leche, que contiene péptidos de beta-lactoglobulina específicos, que son capaces de reducir, en particular eliminar, los síntomas agudos de la alergia a la proteína de la leche de vaca.

10 [0002] Durante el proceso común de nutrición se presentan proteínas dietéticas al sistema inmunitario a través del tracto gastrointestinal sin una respuesta inmunitaria a los nutrientes ingeridos. Esta falta de reactividad se llama tolerancia inmunitaria oral o tolerancia oral. La inducción de tolerancia inmunitaria oral es especialmente relevante para los bebés, que después del nacimiento se exponen por primera vez a proteínas dietéticas y deben adaptarse a esto. Si en los bebés no se establece la tolerancia inmunitaria oral, se producirá una alergia alimentaria.

15 [0003] Aproximadamente de un 2 a un 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 hay en el mercado fórmulas infantiles que comprenden proteínas extensamente hidrolizadas (hidrolizado de proteína extensivo) o incluso meramente aminoácidos libres como fuente de nitrógeno. En estas fórmulas no hay presente ninguna proteína o ningún péptido alérgicos. Así, la exposición a la proteína de la leche se evita previniendo por tanto una reacción alérgica. Esto se llama una prevención secundaria de la alergia a la leche de las vacas. Sin embargo, tan pronto como las proteínas de la leche de vaca se introducen de nuevo en la dieta, el bebé puede sufrir de nuevo una reacción alérgica.

20 [0004] Hay fórmulas hipoalérgicas en el mercado, que comprenden un hidrolizado parcial de proteína (proteínas parcialmente hidrolizadas), que 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 de que más adelante la proteína nativa se puede introducir en la dieta con un riesgo reducido de reacciones alérgicas. Esto se llama prevención primaria de la alergia a la proteína de la leche de vaca y estas fórmulas se usan típicamente para los bebés con riesgo de desarrollar una alergia. Sin embargo, para los bebés con una alergia a la proteína de la leche de vaca diagnosticada, es decir, ya establecida, tales fórmulas no son adecuadas, ya que todavía evocan una reacción alérgica.

[0005] La EP 0 629 350 divulga el uso de hidrolizados de proteína de suero de leche no alérgicos que se dice que son capaces de inducir la tolerancia a la proteína de la leche de vaca.

30 [0006] La EP 0 827 697 divulga el uso de suero de leche, que se ha hidrolizado enzimáticamente para la preparación de composiciones que inducen la tolerancia oral a la leche de las vacas en mamíferos susceptibles. El suero de leche tiene un nivel de detección inmunológica de proteínas alérgicas ≥ 100 veces menor que el del suero de leche no hidrolizado.

35 [0007] La WO 00/42863 divulga una composición hipoalérgica para la inducción de tolerancia a proteínas en bebés con riesgo de alergia a proteínas, que comprende una base de proteína no alérgica extensamente hidrolizada y/o una base de aminoácidos libres, donde dicha composición comprende como la sustancia activa al menos un péptido tolerogénico de la proteína alérgica.

[0008] La WO 02/24883 divulga el uso de bacterias del ácido láctico para expresar péptidos tolerogénicos. Las bacterias del ácido láctico son capaces de reducir la tendencia de un individuo a desarrollar reacciones alérgicas.

40 [0009] La WO 2006/115412 divulga un alimento líquido que comprende cadenas de acilo graso de cadenas cortas y un sacárido fermentable no digerible.

[0010] La WO 2008/017517 divulga péptidos inmunogénicos y su uso en trastornos inmunitarios.

[0011] La JP 2010-105915 A divulga péptidos obtenidos por hidrólisis de β -lactoglobulina y de uso en alimentos y bebidas.

45 [0012] La WO 2011/069042 divulga un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca y/o péptidos derivados de la misma para la inducción de tolerancia.

[0013] Sin embargo, las composiciones hipoalérgicas de la técnica anterior a menudo proporcionan sus efectos solo evitando la presencia de potenciales alérgenos, proporcionando así solo un efecto de prevención secundaria

de alergias y/o son solo adecuadas para los bebés con riesgo de desarrollar una alergia, pero no para los bebés con una alergia a la leche de vaca ya establecida, ya que evocarían una reacción alérgica en tales bebés.

5 [0014] Por tanto, todavía hay una necesidad de composiciones nutricionales para sujetos que sufren de alergia a la proteína de la leche de vaca con efectos mejorados sobre los síntomas agudos. Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar composiciones, métodos y medios para superar las desventajas anteriormente identificadas, en particular que se puedan usar para tratar bebés alérgicos a la leche de vaca, eso significa en particular que los síntomas agudos se reducen o aún se eliminan cuando se produce otro encuentro con la proteína alergénica.

[0015] Este problema técnico se resuelve por la enseñanza de las reivindicaciones independientes.

10 [0016] Por tanto, la presente invención proporciona en particular una composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral 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 mucho 5 kDa, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste
15 en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4. Preferiblemente, el al menos un péptido de beta-lactoglobulina de la presente invención tiene un peso molecular de 0,1 a 4,9 kDa, preferiblemente de 0,5 a 4,9, más preferiblemente de 2 a 4,9 kDa, de la manera más preferida de aproximadamente 2,4 kDa. En una forma de realización preferida, el al menos un péptido de beta-lactoglobulina consiste en de 12 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 14 a 25 aminoácidos, más preferiblemente de 16 a 20 aminoácidos, de la manera más preferida 18 aminoácidos.

20 [0017] Los inventores descubrieron sorprendentemente que las reacciones alérgicas agudas podían ser mejoradas por péptidos de beta-lactoglobulina específicos en un modelo animal con ratones alérgicos. La beta-lactoglobulina es una de dos proteínas de suero de leche principales en la leche de las vacas y las ovejas, pero no se encuentra en las leches humanas. A menudo 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,
25 se habían sensibilizado ratones a proteína de suero de leche intacta y consecuentemente mostraron una respuesta alérgica aguda cutánea después de una exposición intradérmica con proteína de suero de leche intacta, es decir, se habían vuelto alérgicos a la proteína de suero de leche, lo que se demostró también por un aumento en la IgE específica.

30 [0018] Posteriormente, estos ratones fueron tratados con varios péptidos y componentes proteicos, y sorprendentemente resultó que el tratamiento con péptidos específicos procedentes de una región específica de la proteína beta-lactoglobulina suprimió, es decir, redujo, significativamente una reacción alérgica cuando estos ratones fueron expuestos a proteína de suero de leche intacta de nuevo. Así, ratones previamente alérgicos fueron tratados con los péptidos de beta-lactoglobulina específicos y mostraron una reacción alérgica significativamente reducida cuando se produjo otro encuentro con el alérgeno después del tratamiento.

35 [0019] Por lo tanto, estos péptidos son adecuados para la incorporación a una fórmula infantil antialérgica junto con, por ejemplo, proteína extensamente hidrolizada y/o aminoácidos libres no solo para prevenir reacciones alérgicas evitando los alérgenos, sino ventajosamente también para tratar la alergia reduciendo o mejorando la reacción alérgica aguda cuando se expone a los alérgenos de nuevo. En otras palabras, estos péptidos se usan en una inmunoterapia oral para reducir la sensibilidad a la alergia.

40 [0020] En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se entiende para referirse a un tratamiento terapéutico de un paciente humano o animal, en particular bebés, en cuanto a curar parcial o completamente la alergia y/o para aliviar o mejorar los síntomas de la alergia. Preferiblemente, el tratamiento es una inmunoterapia oral. En el contexto de la presente invención, el "tratamiento" no se entiende para abarcar la prevención o la profilaxis de una alergia, es decir, la inducción de la tolerancia oral.

45 [0021] En el contexto de la presente invención, el término "composición nutricional" se refiere a una composición de valor nutricional que al menos comprende un componente proteico, preferiblemente comprende al menos un componente proteico y un componente lipídico, más preferiblemente comprende al menos un componente proteico y un componente de carbohidrato y en particular al menos comprende un componente proteico, un componente lipídico y un componente de carbohidrato. En una forma de realización preferida, la composición nutricional es una
50 composición nutricional enteral. En una forma de realización preferida, la composición nutricional puede estar en forma líquida, semilíquida o sólida. En una forma de realización preferida, la forma sólida está en forma de polvo.

[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" se entiende para referirse en particular a una alergia contra la proteína de suero de leche de vaca.

[0023] En el contexto de la presente invención el término "como mucho 5 kDa" se entiende para referirse hasta e incluyendo 5 kDa.

5 [0024] En el contexto de la presente invención, un tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca se mide según el ejemplo 2 de la presente enseñanza en el modelo de ratón dado para determinar una reacción alérgica aguda a proteínas. Por consiguiente, una mejora de los síntomas agudos está indicada por una hiperreactividad de tipo inmediato (ITH) de un 35 a un 90%, con una reacción alérgica aguda con un valor de ITH de un 100 %. Una reducción significativa de una reacción alérgica se caracteriza por una ITH de un 0 a un 30%, preferiblemente de un 0 a un 25%, preferiblemente de un 0 a un 20%, preferiblemente de un 0 a un 10%, más preferiblemente un 0 % de la reacción alérgica con un valor de ITH de un 100 %. Por tanto, un tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca significa preferiblemente al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90 % y preferiblemente un 100 % de reducción de la reacción alérgica aguda mostrada por el mismo sujeto antes del tratamiento, por ejemplo según se indica por una ITH medida en la prueba de modelo de ratón según se ha proporcionado anteriormente.

15 [0025] El valor relativo para la ITH se traduce en la reducción de las reacciones alérgicas agudas por la siguiente fórmula de cálculo: 100 menos ITH = valor de reducción. Así, más preferiblemente, el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca según la presente invención lleva a una reducción completa de una reacción aguda, es decir, a una reducción de un 60 a un 100%, preferiblemente de un 90 a un 100%, preferiblemente de un 95 a un 100%, más preferiblemente de un 100 % de las reacciones alérgicas agudas contra las proteínas dietéticas, cuando se vuelve a producir el encuentro con estas proteínas.

20 [0026] De una manera análoga, la reacción alérgica en seres humanos se puede cuantificar por la extensión de las reacciones cutáneas después de una prueba cutánea. Esta prueba se hace colocando una gota de una solución que contiene un posible alérgeno sobre la piel, y una serie de rasguños o punciones con una aguja permite que la solución entre en la piel. Si la piel desarrolla un área roja con picazón y elevada (llamada un habón), normalmente significa que la persona es alérgica a ese alérgeno. Esto es también una reacción de ITH. El diámetro medio del habón se puede medir según se conoce en la técnica (Maccario et al, 2003. J Allerg Clin Immunol 111, 750-756); alternativamente se pueden aplicar mediciones termográficas de la piel (Rokita et al, 2011. Med Phys 38: 756-772).

30 [0027] En una forma de realización preferida, cada péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 está independientemente sustituido en su extremo C- y/o N-terminal con de 1 a 6 aminoácidos, preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos, más preferiblemente de 1 a 4 aminoácidos, de la manera más preferida de 1 a 3 aminoácidos, que pueden ser cualquier aminoácido, donde dicha composición preferiblemente comprende una mezcla de dos, tres o preferiblemente los cuatro de los péptidos de beta-lactoglobulina consistentes en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4. Eso significa que se prefiere particularmente que la composición nutricional según la presente invención comprenda los cuatro péptidos consistentes en las SEC ID NOs 1 a 4.

35 [0028] Conforme a la presente invención, los péptidos de beta-lactoglobulina pueden sintetizarse químicamente según se conoce en la técnica o aislarse después de la expresión por un huésped genéticamente modificado tal como una cepa de *E. coli* o una cepa de *Lactobacillus*. Alternativamente, los péptidos se aíslan y se purifican a partir de un hidrolizado de proteína de suero de leche o de beta-lactoglobulina.

40 [0029] Los péptidos de beta-lactoglobulina según la presente invención no contienen un motivo redox, en particular un motivo tiorredoxina, con una actividad reductora. En particular no están sustituidos con tal secuencia artificial.

45 [0030] Como un componente proteico adicional, es decir, aparte del al menos un péptido de beta-lactoglobulina, la composición nutricional según la presente invención comprende preferiblemente aminoácidos libres y/o proteínas de suero de leche extensamente hidrolizadas. Así, los péptidos de beta-lactoglobulina específicos según la presente invención, preferiblemente, no son parte de un hidrolizado parcial de proteína de suero de leche, sino que son en particular la única fuente de proteínas usada o se utilizan junto con una fuente de nitrógeno sin evocar una reacción alérgica, en particular aminoácidos libres y/o una proteína extensamente hidrolizada, en particular una proteína de suero de leche extensamente hidrolizada.

50 [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 de proteínas hidrolizadas parcial o extensamente. Típicamente, los hidrolizados de proteína extensivos tienen un contenido de aminoácidos libres de más de 10 g por 100 g de proteína. En la presente invención, proteína extensamente hidrolizada se refiere a proteína que se ha hidrolizado y tiene menos de un 3 % en peso de péptidos con un tamaño por encima de 5 kDa. Típicamente, la proteína extensamente hidrolizada se ha obtenido por hidrólisis con proteasa seguida de un paso de ultrafiltración filtrando sobre una membrana con un corte de 5 o 3 kDa. Típicamente, el tamaño medio de

55

los péptidos en una proteína extensamente hidrolizada es de 2 a 3 aminoácidos de largo. Preferiblemente, estos hidrolizados de proteína extensivos no comprenden casi ningún péptido con un tamaño por encima de 1,5 kDa, ya que los péptidos más grandes que 1,5 kDa todavía pueden evocar una reacción alérgica. Se prefiere particularmente que la composición enteral comprenda proteína de suero de leche extensamente hidrolizada.

5 [0032] Fórmulas infantiles extensamente hidrolizadas están comercialmente disponibles, tales como Nutrilon pepti de Nutricia o Pregomin de Milupa.

[0033] También hay disponibles comercialmente fórmulas infantiles a base de aminoácidos libres, por ejemplo Neocate de Nutricia.

10 [0034] La composición nutricional según la presente invención no contiene proteína de la leche de vaca intacta o solo parcialmente hidrolizada, 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 de otras fuentes tales como soja, guisante, arroz, colágeno o similares en forma intacta o parcialmente hidrolizada.

15 [0035] Así, el contenido de proteína total, es decir, el componente proteico en conjunto, de la composición nutricional según la presente invención comprende preferiblemente, en particular consiste en, los péptidos de beta-lactoglobulina específicos según la presente invención solo o al menos un componente proteico adicional seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos libres, proteína de suero de leche extensamente hidrolizada y proteínas de otras fuentes tales como soja, guisante, arroz, colágeno o similares en forma intacta o parcialmente hidrolizada.

20 [0036] En una forma de realización preferida de la presente invención, 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 se prefiere particularmente de 20 a 1000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total.

25 [0037] Se prefiere además que la composición nutricional según la presente invención comprenda una cantidad total de proteína de un 5 a un 25 % basado en el peso en seco de la composición. La cantidad total de proteína se refiere aquí a la suma de todos los componentes proteicos, es decir, los péptidos de beta-lactoglobulina específicos más todos los demás componentes proteicos que puedan estar presentes en la composición nutricional según la presente invención.

30 [0038] La presente composición contiene preferiblemente al menos un 50 % en peso de componente proteico derivado de leche no humana, más preferiblemente al menos un 90 % en peso, cada uno basado en el peso en seco de proteína total.

35 [0039] La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, contiene preferiblemente de un 5 a un 25%, preferiblemente de un 7 a un 25%, preferiblemente de un 5 a un 20%, preferiblemente de un 5 a un 16%, preferiblemente de un 5 a un 12 % de proteína basado en las calorías totales, más preferiblemente de un 7,0 a un 12,0 % de proteína basado en las calorías totales de la composición. El valor calórico total se puede calcular basándose en la cantidad de carbohidratos, grasa y proteína digeribles.

40 [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 la composición lista para consumir. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende preferiblemente al menos un 7,0 % en peso, más preferiblemente al menos un 8,0 % en peso, más preferiblemente al menos un 9 o al menos un 10 % en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición total. Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende como mucho un 40 % en peso, más preferible como mucho un 15 % en peso, preferiblemente como mucho un 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
45 nutricional, preferiblemente enteral, se calcula conforme al método Kjeldahl midiendo el nitrógeno total y usando 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 distintas de la caseína.

50 [0041] Preferiblemente, la composición nutricional, preferiblemente enteral, según la presente invención comprende como un componente de carbohidrato, al menos un oligosacárido no digerible. Ventajosamente y de la manera 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 las enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado

y estómago) sino que, en cambio, son fermentados por la microbiota intestinal humana. Los oligosacáridos no digeribles, ventajosamente y de forma inesperada, mejoran además el efecto de los presentes péptidos de beta-lactoglobulina en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca.

5 [0042] En una forma de realización preferida, el al menos un oligosacárido no digerible se selecciona del grupo consistente 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.

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

10 [0044] En una forma de realización particularmente preferida, el oligosacárido no digerible contenido en la composición nutricional es un fructo-oligosacárido, preferiblemente un fructo-oligosacárido de cadena corta, con un grado medio de polimerización por debajo de 7, por ejemplo tal como inulina hidrolizada, o uno de cadena larga, con un grado medio de polimerización por encima de 15, más preferiblemente por encima de 20, por ejemplo tal como Raftilin HP, más preferiblemente una combinación de fructo-oligosacáridos de cadena corta y de cadena
15 larga.

[0045] Un fructo-oligosacárido se refiere a oligosacáridos que comprenden unidades de fructosa con enlace β , que se enlazan preferiblemente por enlaces glicosídicos $\beta(2,1)$ y/o $\beta(2,6)$, y un DP preferible entre 2 y 200. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido contiene una glucosa con enlace glicosídico $\beta(2,1)$ terminal. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido contiene al menos 7 unidades de fructosa con enlace β . En una forma de
20 realización preferida adicional, la inulina se usa como oligosacárido no digerible. La inulina es un tipo de fructo-oligosacárido donde al menos un 75% de los enlaces glicosídicos son enlaces $\beta(2,1)$. Típicamente, la inulina tiene una longitud de cadena media de entre 8 y 60 unidades monosacáridas. Un fructo-oligosacárido adecuado para usar en las composiciones de la presente invención está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Raftiline®HP (Orafti). Otras fuentes adecuadas son Raftilose (Orafti), Fibrulose y Fibruline (Cosucra) y Frutafit y
25 Frutalose (Sensus).

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

30 [0047] La presente composición nutricional preferiblemente comprende de un 0,05 a un 20 % en peso de oligosacárido no digerible total, más preferiblemente de un 0,5 a un 15 % en peso, aún más preferiblemente de un 1 a un 10 % en peso, más preferiblemente de un 2,0 a un 10 % en peso, basado en el peso en seco de la presente composición.

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

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

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

40 [0051] Así, preferiblemente, la composición nutricional, preferiblemente enteral, de la presente invención puede comprender además un lípido (también denominado componente lipídico), en particular grasa. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, comprende como lípidos preferiblemente lípidos vegetales y/o aceites marinos, tales como aceites de algas, aceites bacterianos, aceites animales, aceites vegetales o aceites de
45 pescado. Preferiblemente, la composición comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, más preferiblemente ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), más preferiblemente DHA. El DHA reduce ventajosamente la síntesis de IgE y por tanto reduce o elimina las reacciones alérgicas. Preferiblemente, la composición de nutrición comprende al menos un 0,1 % en peso, más preferiblemente de un 0,1 a un 1 % en peso de DHA basado en los ácidos grasos totales. Preferiblemente, la composición no comprende grasa o lípidos de origen lácteo, ya que esta grasa puede comprender todavía trazas de proteína de la leche intacta.

50 [0052] La composición nutricional, preferiblemente enteral, según la presente invención comprende preferiblemente de un 15 a un 40 % del componente lipídico basado en el peso en seco de la composición.

5 [0053] Preferiblemente, el al menos un carbohidrato digerible puede comprender uno o más carbohidratos digeribles que se conocen en la técnica por ser adecuados para usar en productos alimenticios, en particular composiciones nutricionales infantiles, por ejemplo seleccionados de entre polisacáridos digeribles (por ejemplo almidón), monosacáridos digeribles (por ejemplo glucosa, fructosa) y disacáridos digeribles (por ejemplo lactosa, sacarosa). Se prefiere particularmente la maltodextrina. El uso de maltodextrina es ventajoso en lo concerniente a que tiene un peso molecular más alto y puede compensar parcialmente la osmolaridad aumentada causada por los aminoácidos libres, en caso de ser usados.

10 [0054] Preferiblemente, la cantidad de lactosa es inferior a un 40 % en peso basado en los 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 para fórmulas infantiles.

15 [0056] En una forma de realización preferida de la presente invención, la composición nutricional consiste en el al menos un péptido de beta-lactoglobulina según se especifica aquí, un componente lipídico y un carbohidrato digerible.

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

20 [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 excluir así cualquier otro componente tal como péptidos, componentes lipídicos o componentes de carbohidrato que no derivan de la beta-lactoglobulina o combinaciones de los mismos.

25 [0059] En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a una composición nutricional que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina con un peso molecular de como mucho 5 kDa, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina es de uso en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.

30 [0060] En una forma de realización preferida, la composición nutricional, preferiblemente enteral, es una fórmula infantil o un preparado de continuación.

35 [0061] En otra forma de realización preferida, la composición nutricional, preferiblemente enteral, está en la forma de un polvo seco o un líquido listo para consumir. Si la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está en forma seca, por ejemplo, es un polvo adecuado para hacer una composición líquida después de la reconstitución con una solución acuosa, preferiblemente con agua. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, puede también estar preferiblemente en una forma de concentrado líquido, que se diluye con agua antes del uso. Si la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es un líquido listo para consumir ya contiene un solvente líquido tal como agua y por tanto no debe reconstituirse antes del uso. Preferiblemente, si la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está en una forma líquida, tiene una viscosidad por debajo de 35 mPa.s, más preferiblemente por debajo de 6 mPa.s según se mide en un viscosímetro Brookfield a 20°C con una velocidad de cizalladura de 100 s⁻¹.

[0062] Cuando la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está en una forma líquida, el volumen preferido administrado a diario está en el rango de aproximadamente 80 a 2500 ml, más preferiblemente de aproximadamente 450 a 1000 ml al día.

45 [0063] Preferiblemente, la composición nutricional, preferiblemente enteral, según la presente invención comprende la siguiente distribución de calorías: el componente lipídico proporciona preferiblemente de un 30 a un 60 % de calorías totales, preferiblemente de un 35 a un 50 % de calorías totales, el componente proteico proporciona preferiblemente de un 5 a un 20%, más preferiblemente de un 5 a un 15 % de las calorías totales, en particular de un 6 a un 12 % de las calorías totales, y el componente de carbohidrato digerible proporciona preferiblemente de un 25 a un 65 % de las calorías totales, preferiblemente de un 40 a un 60 % de las calorías totales. La cantidad de calorías totales está determinada por la suma de calorías derivadas de proteínas, lípidos y carbohidratos digeribles.

50

5 [0064] Para satisfacer los requisitos calóricos del bebé, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, preferiblemente comprende 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 el consumo de agua y el de calorías. La osmolaridad de la presente composición está preferiblemente entre 150 y 420 mOsmol/l, más preferiblemente de 260 a 380 mOsmol/l. La baja osmolaridad pretende reducir el estrés gastrointestinal.

10 [0065] La presente composición no es leche materna humana. Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está libre de probióticos vivos o muertos, en particular bifidobacterias o lactobacilos. Ya que tales bacterias típicamente se precultivan en medios de cultivo a base de leche, la adición de tales probióticos conlleva el riesgo de introducir trazas de proteína de la leche de vaca intacta. Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está libre de factores de crecimiento y/o citocinas. Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, está libre de TGF, particularmente TGF-beta.

15 [0066] La composición nutricional, preferiblemente enteral, de la presente invención es preferiblemente para usar en bebés, es decir, es una composición nutricional infantil. Por lo tanto, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, se administra preferiblemente a un sujeto humano durante los primeros 3 años de vida. Preferiblemente, la presente composición es una fórmula infantil o un preparado de continuación, o una leche para niños pequeños, es decir, para seres humanos mayores que bebés.

20 [0067] En una forma de realización del uso según la presente invención, la composición nutricional, preferiblemente enteral, es para la alimentación o se usa para la alimentación de un sujeto humano con una edad de 0 a 36 meses. La presente composición nutricional se administra ventajosamente a un bebé humano de 0 a 24 meses, más preferiblemente a un bebé humano de 0 a 18 meses, más preferiblemente a un bebé humano de 0 a 12 meses.

25 [0068] La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es preferiblemente para usar en el tratamiento de una alergia alimentaria. Más preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es de uso en el tratamiento de la alergia a la proteína de la leche de vaca. Aún más preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es de uso en el tratamiento de la alergia a proteína de suero de la leche de vaca. La presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es preferiblemente para usar en la inmunoterapia oral.

30 [0069] Preferiblemente, la presente composición nutricional, preferiblemente enteral, es para proporcionar los requisitos nutricionales diarios a un ser humano, en particular para la administración a, en particular para la alimentación de, seres humanos, en particular bebés, incluidos 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.

35 [0070] 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 mucho 5 kDa, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina es de uso en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca, y donde los componentes adicionales de dicha composición nutricional son según se ha especificado anteriormente.

40 [0071] La presente invención también se refiere a una 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 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y ii) al menos uno seleccionado del grupo consistente en proteína extensamente hidrolizada y aminoácidos libres, donde la suma de i) y ii) representa al menos un 95 % en peso, preferiblemente al menos un 96 % en peso, preferiblemente al menos un 97 % en peso, más preferiblemente al menos un 98 % en peso, más preferiblemente al menos un 99 % en peso del componente proteico, y donde el componente lipídico comprende al menos un 0,1 % en peso de DHA basado en los ácidos grasos totales.

50 [0072] 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, en particular consiste en, al menos un 95 % en peso, preferiblemente al menos un 96 % en peso, preferiblemente al menos un 97 % en peso, más preferiblemente al menos un 98 % en peso, más preferiblemente al menos un 99 % en peso del al menos un péptido de beta-lactoglobulina tal como se ha definido anteriormente y al menos uno seleccionado del grupo consistente en proteína extensamente hidrolizada y aminoácidos libres, y donde el componente lipídico comprende al menos un 0,1 % en peso de DHA basado en los ácidos grasos totales.

[0073] En una forma de realización preferida, la composición nutricional comprende al menos un oligosacárido no digerible, donde el oligosacárido no digerible es preferiblemente un fructo-oligosacárido de cadena corta o de cadena larga.

5 [0074] 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 se prefiere particularmente de 20 a 1000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total.

10 [0075] Preferiblemente, la composición nutricional según la presente invención comprende una cantidad total de proteína de un 5 a un 25 % basado en el peso en seco de la composición.

[0076] La presente composición nutricional es preferiblemente una fórmula infantil o un preparado de continuación. Se prefiere particularmente que la composición nutricional sea una fórmula infantil o un preparado de continuación para usar en la alimentación de los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.

15 [0077] Todas las composiciones y las sustancias identificadas aquí como adecuadas y diseñadas para un uso según la presente invención se deben entender también como adecuadas y diseñadas para ser aplicadas en métodos de tratamiento o métodos para la alimentación de un sujeto, en particular un sujeto humano, que los necesita.

[0078] En el contexto de la presente invención, todas las cantidades relativas dadas en porcentaje (%) de una composición en conjunto indicada suman hasta un 100 % de la composición en conjunto indicada.

20 [0079] En el contexto de la presente invención, las expresiones "comprender" y "contener" y sus conjugaciones se usan en una forma de realización preferida en su sentido no limitativo para referirse a que los artículos que siguen a la expresión están incluidos, pero no se excluyen los artículos no específicamente mencionados. En el contexto de la presente invención, la expresión "comprender" o "contener" y sus conjugaciones se usan en otra forma de realización preferida en su sentido limitativo para referirse a que los artículos que siguen a las expresiones están
25 incluidos y se excluyen los artículos no específicamente mencionados, igualando así el significado de la expresión "consistir" y sus conjugaciones.

[0080] La referencia a un elemento de la presente invención, particularmente una composición o un método, por el artículo indefinido "una" o "un" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "una" o "un" significa por tanto normalmente "al menos uno/a".
30

[0081] Formas de realización preferidas adicionales son el objeto de las reivindicaciones secundarias.

[0082] La invención será adicionalmente descrita mediante los ejemplos no limitativos.

[0083] La SEQ ID NO 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína beta-lactoglobulina bovina completa con 162 aminoácidos en total. La región en la proteína beta-lactoglobulina que abarca desde 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.
35

Ejemplo 1

Selección de péptidos

40 [0084] Se obtuvieron de JPT Peptide Technologies (Berlín, Alemania) péptidos sintéticos de 18 aminoácidos de longitud con un solapamiento de 12 aminoácidos que abarcan la variante B de la beta-lactoglobulina y seis péptidos sintéticos de la variante A de la beta-lactoglobulina.

[0085] Los péptidos se sintetizaron y preseleccionaron con un ensayo con líneas de células T. Se cultivaron veinticinco células B transformadas con virus Epstein Barr-18 (EBV) en RPMI 1640 - GlutaMAX™-I complementado con un 10% de FBS inactivado por calor y un 2% de Pen/Strep. Líneas de células T (TCL) específicas para leche de vaca se generaron como han descrito previamente Schade et al. (2000, J Allerg. Clin. Immunol. 106: 1155-62). Las TCL se cultivaron en medio de Yssel con un 2% de HS, un 2% de Pen/Strep, un 1% de Glut, 50 IU/ml de IL-2 y 50 IU/ml de IL-4 y fueron reestimuladas cada dos semanas con leche de vaca para mantenerlas en cultivo. Para
45

la reestimulación, las células B autólogas transformadas con EBV se preincubaron durante toda la noche con 50 µg/ml de mezcla de proteína de la leche de vaca. Posteriormente, las células B fueron irradiadas y se añadieron a las TCL.

5 [0086] La proliferación de las células T específicas de péptido se evaluó como se ha descrito antes por Rüter et al. (2006, Clin Exp Allergy 36: 303-10). En resumen, las células B transformadas con EBV irradiadas (4×10^4 /pocillo) se preincubaron durante toda la noche por triplicado en placas en U de 96 pocillos con 50 µg/ml de alérgeno principal o 10 µg/ml de péptido sintético (o una mezcla de 2 o 3 péptidos, o péptidos únicos). Se obtuvo proteína de suero de leche (Prolacta) de Lactalis (Laval, Francia). Se compró caseinato de FrieslandCampina Domo (Amersfoort, Países Bajos). Para la mezcla de proteína de la leche de vaca, se mezclaron Prolacta y caseinato en una proporción 10 1:1. También se evaluaron la alfa-lactoalbúmina (alfa-LAC) y la beta-lactoglobulina (beta-LG) como controles. Posteriormente, se añadieron a los pocillos 4×10^4 células T y se cultivaron durante 24 horas. El día siguiente, se añadió timidina tritiada (1 µCi/pocillo). Después de 18 horas, las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio y se midió la incorporación de [³H]-TdR usando un contador de placas Microbeta2 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). La incorporación se expresó como recuentos por minuto (CPM) y se sustrajo la proliferación de fondo de las 15 células B EBV. Todas las pruebas se realizaron en medio de Yssel con un 2% de Pen/Strep y un 1% de Glut y las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Cada TCL se evaluó al menos tres veces.

20 [0087] Los péptidos con la máxima reactividad de células T se seleccionaron para una evaluación adicional en un modelo animal. Estos nueve péptidos derivaban de la beta-lactoglobulina. La mezcla de los péptidos 1-4 tuvo el mejor efecto.

Tabla 1: información de secuencia de los péptidos.

Péptido	Secuencia	Aminoácidos (AA) de beta-lactoglobulina
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 5)	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 103-120
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

Evaluación en animales

[0088] Poco antes del experimento, los péptidos se suspendieron en PBS. Los péptidos se combinaron en tres mezclas, en concreto los péptidos 1-4 en la mezcla 1, los péptidos 5-7 en la mezcla 2 y los péptidos 8 y 9 en la mezcla 3 (véase la tabla 1, arriba). La concentración final de cada péptido en la mezcla era de 8 mg/ml.

- 5 [0089] Para este experimento se usaron ratones C3H/HeOuj hembra de 3 semanas de edad libres de patógenos (Charles River Laboratories, Maastricht, Países Bajos). Los ratones se mantuvieron a base de comida para ratones estándar libre de proteína de la leche de vaca (soja AIN-93G, Special Diets Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se alojaron en la instalación para animales de la Universidad de Utrecht y fueron tratados según las pautas del Comité Holandés de Experimentos con Animales.
- 10 [0090] Los ratones (n = 6 por grupo) fueron tratados por vía oral usando una aguja roma con 0,5 ml de las mezclas de péptidos o PBS en la semana previa a la sensibilización (desde el día -7 hasta el día -2). Durante esta semana (desde el día -7 hasta el día 0) los ratones recibieron la dieta estándar AIN-93G (control). Los días 0, 7, 14, 21 y 28, los ratones fueron sensibilizados por vía oral con 20 mg de suero de leche y 10 µg de CT en 0,5 ml de PBS. Los ratones no sensibilizados fueron tratados con 10 µg de CT en 0,5 ml de PBS. Cinco días después de la última
- 15 sensibilización, los ratones recibieron una exposición intradérmica en el pabellón auricular con 10 µg de suero de leche en 20 µl de PBS. Antes y 1 h después de la exposición, se midió el grosor de la oreja usando un micrómetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos). La diferencia en el grosor de la oreja (inflamación de la oreja) es una indicación de la respuesta alérgica aguda y se expresa como delta µm. Resultó que, en este protocolo de pretratamiento, la mezcla de péptidos 1 fue eficaz.

20 Ejemplo 2

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

- 25 [0091] Para este experimento se usaron ratones C3H/HeOuj hembra de 3 semanas de edad libres de patógenos (Charles River Laboratories, Maastricht, Países Bajos). Los ratones se mantuvieron a base de comida para ratones estándar libre de proteína de la leche de vaca (soja AIN-93G, Special Diets Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se alojaron en la instalación para animales de la Universidad de Utrecht y fueron tratados según las pautas del Comité Holandés de Experimentos con Animales.

[0092] Se obtuvo suero de leche de DMV International (Veghel, Países Bajos). Se fabricó un hidrolizado parcial de suero de leche (pWH) en el Centro de Investigación para la Nutrición Especializada de Danone por hidrólisis

enzimática bajo las siguientes condiciones especificadas. Se pusieron 19,5 kg de agua desmineralizada (en lo subsiguiente "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 dio a la solución un tratamiento térmico de 2 minutos a 78 °C. El producto se enfrió 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 de base. El tanque de hidrólisis se llenó con 12 kg de la solución de suero de leche tratada con calor y se agitó. La temperatura se mantuvo a 58 °C. La solución de base se usó para ajustar el pH del tanque de hidrólisis a 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 de base se usó para regular el pH a 7,75. La hidrólisis se produjo durante 180 minutos. El proceso enzimático se detuvo por enfriamiento rápido y se congeló la solución. El pWH se caracterizó además por análisis del péptido mediante cromatografía de exclusión de tamaño en fase líquida de alto rendimiento. La distribución de tamaño fue la siguiente: 85 % en peso < 1 kDa, 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.

[0093] La toxina del cólera (CT) se obtuvo de Quadrachem Diagnostics (Epsom, Reino Unido). La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se obtuvo de Cambrex Bio Science (Verviers, Bélgica).

[0094] Los ratones (n = 6 por grupo) fueron sensibilizados por vía oral con 20 mg de suero de leche y 10 µg de CT en 0,5 ml de PBS los días 0, 7, 14, 21 y 28. Los ratones no sensibilizados fueron tratados con 10 µg de CT en 0,5 ml de PBS. Cinco días después de la última sensibilización, se extrajo sangre de los ratones y se recogió el plasma. Se midieron los niveles de IgE específica de proteína de suero de leche para determinar si la sensibilización fue exitosa. De hecho, los ratones se habían vuelto alérgicos a la proteína de suero de leche, ya que se observó un aumento en la IgE específica de proteína de suero de leche.

[0095] Una semana más tarde, se empezó el tratamiento. Los ratones fueron tratados por vía oral 14x durante cuatro semanas (la primera semana 5x por semana, luego 3x por semana) con a) 0,5 ml de 100 mg/ml de suero de leche, b) 0,5 ml de 1 mg/ml de suero de leche, c) 0,5 ml de 100 mg/ml de pWH, d) 0,5 ml de 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 de 80 µg/ml.

[0096] Tres días después del último tratamiento, los ratones recibieron una exposición intradérmica en el pabellón auricular con 10 µg de suero de leche en 20 µl de PBS. Antes y 1 h después de la exposición, se midió el grosor de la oreja usando un micrómetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos). La diferencia en el grosor de la oreja (inflamación de la oreja) es una indicación de la respuesta alérgica aguda medida como hiperreactividad de tipo inmediato (ITH) y se expresa como delta µm. De nuevo se determinó la IgE específica de proteína de suero de leche. También se determinaron las IgG1 e IgG2a específicas de proteína de suero de leche.

[0097] 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 expuestos a proteína de suero de leche, en comparación con los ratones no alérgicos. El tratamiento con pWH (en 100 mg/ml o 1 mg/ml) resultó en una respuesta alérgica en ratones alérgicos que no fue estadísticamente diferente de los ratones no alérgicos de control, ni de los ratones alérgicos de control. Las mediciones de IgE estaban en línea con aquellos observados para la inmunoterapia oral.

[0098] El tratamiento con la mezcla de péptidos de la presente invención en ratones alérgicos, sin embargo, resultó en una reducción significativa de la reacción alérgica en comparación con los ratones alérgicos no tratados o los ratones alérgicos tratados con proteína de suero de leche.

[0099] 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 inflamación de la oreja 1 h después de la exposición intradérmica

Grupo	ΔITH µm media (E.E.)	ITH relativa
CT + PBS	22,29 (4,50)	0%
CT/suero de leche + PBS	122,7 (14,2)*	100%
CT/suero de leche + 100 mg/ml de suero de leche	110,9 (12,8)*	88,2%
CT/suero de leche + 1 mg/ml de suero de leche	88,79 (10,16)*	66,2%
CT/suero de leche + 100 mg/ml pWH	66,69 (12,67)	44,2%
CT/suero de leche + 1 mg/ml pWH	52,56 (3,95)	30,1%

ES 2 791 288 T3

CT/suero de leche + mezcla de péptidos	41,25 (6,87)#	18,9%
* p<0,05 en comparación con el control negativo (CT +PBS) # p<0,05 en comparación con el control positivo (CT/suero de leche +PBS) y grupo tratado con suero de leche (CT/suero de leche + 100 mg/ml de suero de leche).		

Ejemplo 3

Fórmula infantil para bebés alérgicos a la leche de vaca

[0100] Densidad energética: 0,6-0,77 kcal/ml; lípidos: 5,5 a 7 g/100 ml de fórmula lista para usar. La proteína está presente en forma de aminoácidos libres y los péptidos de beta-lactoglobulina de la presente invención. Por g de proteína están presentes aproximadamente 100 µg de mezcla de péptidos según se evalúa en el ejemplo 2.

5

Información nutricional	Por 100 g de polvo	Por 100 kcal*	Por 100 ml**
Energía kJ	2918	413	292
kcal	707	100	70,7
Proteína g	15,2	2,1	1,5
Carbohidrato g	7,6	1,1	0,76

Perfil de aminoácidos típico	g/100 g 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-iso-leucina	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	

Perfil de carbohidratos	g/100 g	
Polvo de carbohidratos		
Dextrosa	1,9	0,14
Lactosa	0,4	0,03

Maltosa	6,7	0,51
Maltotriosa	9,5	0,72
Sacáridos superiores	81,5	6,2

[0101] La composición comprende además grasa vegetal y microbiana, con un 0,2 % en peso de DHA basado en la grasa total.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0102]

- 5 <110> Nutricia N.V.
- <120> Péptidos de betalactoglobulina para tratar la alergia a la proteína de suero de leche
- <130> 203578
- <160> 10
- <170> Versión de PatentIn 3.5
- 10 <210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Bos taurus
- <400> 1
- 15 Gln Lys Val Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp
1 5 10 15
- Ile Ser
- <210> 2
<211> 18
<212> PRT
20 <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
- <210> 3
<211> 18
25 <212> PRT
<213> Bos taurus
- <400> 3

ES 2 791 288 T3

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

Val Tyr

5 <210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 4

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

Lys Pro

10 <210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 5

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

Met Glu

15 <210> 6
<211> 18
<212> PRT
<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

Pro Glu

20 <210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 7

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

25 Cys Gln

<210> 8
<211> 18

ES 2 791 288 T3

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

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

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

His Ile

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral 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 mucho 5 kDa, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.
- 10 2. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según la reivindicación 1, donde cada péptido está independientemente sustituido en su extremo C- y/o N-terminal con de 1 a 6 aminoácidos, que pueden ser cualquier aminoácido, donde dicha composición preferiblemente comprende una mezcla de dos, tres o cuatro de los péptidos de beta-lactoglobulina consistentes en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.
3. 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 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende como un componente proteico adicional aminoácidos libres y/o proteínas extensamente hidrolizadas.
- 15 4. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos un oligosacárido no digerible seleccionado del grupo consistente 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, y donde el oligosacárido no digerible es preferiblemente un fructo-oligosacárido de cadena corta o de cadena larga.
- 20 5. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los 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.
- 25 6. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los 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.
- 30 7. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los 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 de un 5 a un 25 % basado en el peso en seco de la composición.
8. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende de un 0,05 a un 20 % en peso del al menos un oligosacárido no digerible basado en el peso en seco de la composición.
- 35 9. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende de un 15 a un 40 % del componente lipídico basado en el peso en seco de la composición.
- 40 10. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una fórmula infantil o un preparado de continuación.
11. Composición nutricional para usar en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está en la forma de un polvo seco o un líquido listo para consumir.
- 45 12. Composición nutricional que comprende al menos un péptido de beta-lactoglobulina que tiene un peso molecular de como mucho 5 kDa, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, donde el al menos un péptido de beta-lactoglobulina es de uso en la inmunoterapia oral de la alergia a la proteína de la leche de vaca en los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.

- 5 13. 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 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y ii) al menos uno seleccionado del grupo consistente en proteína extensamente hidrolizada y aminoácidos libres, donde la suma de i) y ii) representa al menos un 95 % en peso del componente proteico, y donde el componente lipídico comprende al menos un 0,1 % en peso de DHA basado en los ácidos grasos totales, donde dicha composición comprende preferiblemente al menos un oligosacárido no digerible, donde el oligosacárido no digerible es un fructo-oligosacárido de cadena corta o de cadena larga.
- 10 14. Composición nutricional según la reivindicación 13, donde la composición comprende de 10 a 5000 µg del al menos un péptido de beta-lactoglobulina por g de proteína total.
- 15 15. Composición nutricional según las reivindicaciones 13 o 14, donde la composición comprende una cantidad total de proteína de un 5 a un 25 % basado en el peso en seco de la composición.
16. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que es una fórmula infantil o un preparado de continuación.
- 15 17. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que es una fórmula infantil o un preparado de continuación para usar en la alimentación de los bebés alérgicos a la proteína de la leche de vaca.