

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 808**

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 19208805 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023** **EP 3639838**

54 Título: **Hidrolizados de proteínas a base de leche y fórmulas para lactantes y composiciones nutricionales hechas a partir de los mismos**

30 Prioridad:

01.10.2010 EP 10186222

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2024

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 966 808 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidrolizados de proteínas a base de leche y fórmulas para lactantes y composiciones nutricionales hechas a partir de los mismos

Referencia al listado de secuencias

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador. El formato legible por ordenador se incorpora en este documento como referencia.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un hidrolizado de proteína a base de leche que se puede obtener mediante el tratamiento de una solución de un material proteináceo a base de leche con enzimas de una fuente microbiana. Las composiciones pueden incorporarse a preparados para lactantes y complementos alimenticios para adultos. La invención se refiere a dos tipos diferentes de hidrolizados de proteínas destinados a la prevención y al tratamiento de las alergias. En el primer caso, los lactantes están sanos, pero corren riesgo de sufrir alergias debido a antecedentes de alergias en la familia. En el segundo caso, los lactantes o los adultos son alérgicos o tienen necesidades y, por lo tanto, están enfermos.

Antecedentes de la invención

La leche materna humana y la lactancia materna representan el estándar de oro indiscutible en términos de nutrición de lactantes. Los preparados para lactantes que sirven como sustituto o complemento de la leche materna humana deben satisfacer las necesidades nutricionales de los lactantes, tener un sabor aceptable y ser hipoalergénicas y tolerogénicas (es decir, capaces de inducir tolerancia oral) cuando se dirigen a lactantes con riesgo de alergia. La inducción de tolerancia oral a la leche de vaca se ha descrito en el documento EP0827697. Se sabe que las alergias a la leche de vaca y a los preparados para lactantes que contienen proteínas de la 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 el hombre. Los principales alérgenos reconocidos de la leche de vaca son la alfa-lactoalbúmina (aLA), la beta-lactoglobulina (bLG) y la albúmina sérica bovina (BSA). La proteína del suero bovino y/o la caseína se usan a menudo como fuente de proteína láctea en los preparados para lactantes. Para reducir la alergenicidad, las proteínas de la leche de vaca son hidrolizadas por enzimas y así reducidas a péptidos. Los preparados hipoalergénicos actuales compuestos por estos hidrolizados de proteínas de leche de vaca destinadas a la prevención de alergias también comprenden otros nutrientes tales como aceites animales, aceites vegetales, almidón, maltodextrina, lactosa y sacarosa. Estos hidrolizados de proteínas también pueden incorporarse a una bebida láctea para adultos o a complementos alimenticios.

El procedimiento 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, pero sea hipoalergénico y tolerogénico.

Los hidrolizados se pueden caracterizar como "parciales" o "extensos" dependiendo del grado en que se lleva a cabo la reacción de hidrólisis. Actualmente no existe una definición legal/clínica acordada de productos ampliamente hidrolizados según las directrices de la WAO (World Allergy Organization) para la alergia a la proteína de la leche de vaca (CMA), pero sí hay acuerdo en que, según la WAO, los preparados hidrolizados han demostrado ser una solución útil y fuente de proteína ampliamente usada para lactantes que padecen CMA. En la presente invención, un hidrolizado parcial es aquel en el que el 60 % de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular menor que 1000 Dalton, mientras que un hidrolizado extenso es aquel en el que al menos el 95 % de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular menor que 1000 Dalton. Estas definiciones se usan actualmente en la industria. Los hidrolizados parciales se consideran hipoalergénicos (HA), mientras que los hidrolizados extensos se consideran no alérgicos.

Muchos grupos han llevado a cabo investigaciones para optimizar el procedimiento 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 proteináceo, el(los) tipo(s) de enzima(s) y la concentración, son algunos de los muchos factores que influyen en la reacción de hidrólisis y, así, en las propiedades físicas, químicas y, en última instancia, biológicas del producto final. En el documento EP0353122, se usan mezclas de tripsina y quimotripsina con una proporción de actividades de tripsina/quimotripsina de 0.33 a 0.66 para preparar hidrolizados de proteína de suero hipoalergénicos. Los documentos WO9304593 A1 y US5039532A también describen un procedimiento de hidrólisis que usa tripsina y quimotripsina, que incluye una reacción de hidrólisis de dos etapas con una etapa de desnaturalización por calor en el medio para garantizar que el hidrolizado final esté sustancialmente libre de proteínas alérgicas intactas. La tripsina y la quimotripsina usadas en estos métodos son preparados obtenidos mediante extracción de páncreas porcino. Existen en el mercado un número de productos que contienen hidrolizados de proteínas preparados basándose en estos métodos. Por ejemplo, un preparado para lactantes de Nestlé HA® se puede preparar con un hidrolizado producido con tripsina y quimotripsina extraídas del páncreas animal y sus características hipoalergénicas han sido

bien estudiadas y documentadas. Se han publicado tres artículos importantes que informan los resultados de un gran estudio de intervención aleatorizado y doble ciego realizado en Alemania, cuyo objetivo era comparar el efecto de los preparados hidrolizados frente a la fórmula estándar de leche de vaca para la prevención de manifestaciones alérgicas, especialmente el eczema atópico, en lactantes de riesgo. Las publicaciones se enumeran a continuación. El efecto de la fórmula de leche de vaca hidrolizada para la prevención de alergias en el primer año de vida: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. von Berg A, Koletzko S, Grühl A, Filipiak- Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; German Infant Nutritional Intervention Study Group. J Allergy Clin Immunol. 2003 Mar; 111:533-40.

Determinados preparados hidrolizados reducen la incidencia de la dermatitis atópica, pero no la del asma: resultados de tres años del German Infant Nutritional Intervention Study, von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Grühl A, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; German Infant Nutritional Intervention Study Group. J Allergy Clin Immunol. 2007 Mar;119:718-25.

El efecto preventivo de los preparados para lactantes hidrolizadas persiste hasta los 6 años: resultados a largo plazo del German Infant Nutritional Intervention Study (GINI Study). von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Krämer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, Koletzko S, Grühl A, Heinrich J, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; GINIplus study group, J Allergy Clin Immunol 2008;121 :1442-7.

La conclusión del último estudio GINI fue que la intervención nutricional temprana con la fórmula para lactantes de Nestlé HA, 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 que indica una reducción real de la enfermedad en lugar de un aplazamiento de su aparición.

El efecto preventivo a largo plazo significa un efecto preventivo que dura mucho más allá del período de alimentación con Nan HA®, muestra que se indujo tolerancia oral, aunque los mecanismos inmunológicos implicados en esta inducción de tolerancia no han sido examinados en el estudio GINI.

Además de ser hipoalérgica, sería muy deseable que la fórmula para lactantes que se va a usar como complemento o sustituto de la leche materna tenga la capacidad de inducir tolerancia oral en el lactante. La tolerancia oral es la supresión específica de la reactividad inmune 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 al bebé consumir alimentos sin reacciones adversas. El fracaso del establecimiento de la tolerancia oral conduce a la alergia. El desarrollo de la tolerancia oral está relacionado con la educación del sistema inmunitario, lo que resulta en una reacción reducida a los antígenos alimentarios. Se cree que algunos péptidos, que pueden estar presentes específicamente en los preparados para lactantes parcialmente hidrolizados, tienen la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario e inducir la inducción de tolerancia oral. Se cree que estos péptidos deberían tener propiedades particulares, incluido un tamaño relativamente pequeño, para apoyar mejor la educación del sistema inmunitario sin actuar como alérgenos. También se cree que las secuencias de péptidos específicos pueden desempeñar un papel importante. Los perfiles peptídicos hidrolizados específicos pueden en realidad ser el núcleo de la inducción de la tolerancia oral.

Actualmente existe una tendencia generalizada a alejarse del uso de enzimas procedentes de animales hacia el uso de enzimas de origen microbiano. Ha habido muchos avances en los últimos 20 años en el área de la producción de enzimas mediante ingeniería genética. Esto ha hecho posible preparar de forma reproducible grandes cantidades de enzima de alta calidad y pureza en un espacio de tiempo relativamente corto. Por estas razones, sería deseable poder usar enzimas de una fuente microbiana para la producción de hidrolizados de proteínas de la leche para su uso en preparados para lactantes hipoalérgicos. Además, sería muy deseable que estos hidrolizados de proteínas de la leche tuvieran la capacidad de inducir tolerancia oral en los lactantes.

Por tanto, para conservar las propiedades hipoalérgicas de los hidrolizados derivados de enzimas de mamíferos, aquellos producidos con enzimas microbianas deben poseer propiedades químicas, físicas y biológicas similares. Además, cualquier nueva fórmula para lactantes que se comercialice está sujeta a estrictas directrices reglamentarias; por ejemplo, en Europa se aplica la Directiva 2006/141/CE. Por tanto, es deseable que cualquier producto nuevo tenga un perfil peptídico muy similar al del producto ya validado elaborado con enzimas de mamíferos para mantener un efecto preventivo de alergias. Además, sería muy deseable que estos hidrolizados de proteínas de la leche tuvieran la capacidad de inducir tolerancia oral en los lactantes.

De manera similar, es deseable promover la reducción de alergias o efectos adversos, potenciar la absorción de proteínas o aminoácidos, favorecer el uso de proteínas o aminoácidos y/o modular los procedimientos de inflamación en pacientes enfermos, especialmente proporcionando hidrolizados particulares de proteínas en composiciones nutricionales completas.

Existe la necesidad de un hidrolizado de proteínas derivadas de la leche preparado por la acción de enzimas no mamíferas, preferiblemente enzimas microbianas que presenten baja alergenidad y al mismo tiempo presenten capacidad de inducción de tolerancia oral.

Existe la necesidad de que dicho hidrolizado esté comprendido preferiblemente en un preparado para lactantes y/o una composición nutricional dirigida a personas con riesgo de alergias.

5 Existe la necesidad de composiciones de este tipo que reduzcan el riesgo o la gravedad de las alergias más adelante en la vida y ayuden a modular la aparición de síntomas alérgicos.

10 Existe la necesidad de obtener hidrolizados a base de enzimas bacterianas con perfiles peptídicos que compartan algunas similitudes con los hidrolizados obtenidos a partir de enzimas de mamíferos y, más aún, que sean capaces de reproducir las propiedades de tolerancia oral de estos últimos, con prevención demostrada de los síntomas alérgicos.

Existe la necesidad de usar las mismas enzimas mencionadas anteriormente en la preparación de composiciones nutricionales para pacientes enfermos o frágiles.

15 Además de producir hidrolizados "parciales", estas enzimas microbianas también se pueden usar para producir hidrolizados de proteínas "extensos" presentes en preparados terapéuticos, tales como los destinados a alimentar a lactantes y niños alérgicos a la leche de vaca. En este caso, la población diana sería los lactantes y niños enfermos (alérgicos) que ya están sensibilizados a las proteínas de la leche de vaca.

20 Esas enzimas microbianas también podrían usarse para producir cualquier tipo de hidrolizados de proteínas usados en productos para lactantes, niños o adultos con otros beneficios además de los relacionados con la alergia, tales como facilitar la digestión, potenciar la absorción y metabolización de aminoácidos, péptidos y proteínas, promover la recuperación tras una enfermedad, optimizar el uso de fuentes de nitrógeno, promover la acumulación de tejidos y la reserva de energía.

25 Para abordar este problema, los inventores han llevado a cabo un extenso programa de investigación y han comparado varias enzimas microbianas como candidatas potenciales para llevar a cabo la reacción de hidrólisis. Se controlaron parámetros tales como el rendimiento de la reacción de hidrólisis, la especificidad de las enzimas y

30 perfil de peso molecular del péptido y han determinado que un número de mezclas de enzimas específicas proporcionan hidrolizados con las propiedades físicas, químicas y biológicas deseadas. Los hidrolizados de proteínas de la leche divulgados en este documento pueden producirse de manera eficiente y reproducible, tienen un sabor aceptable, tienen el valor nutricional requerido y son hipoalergénicos. Además, los hidrolizados de la invención pueden inducir tolerancia oral.

35 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden hidrolizados de proteínas a base de leche que se pueden obtener mediante el tratamiento de una solución de un material proteináceo a base de leche con

40 a) al menos una endopeptidasa similar a tripsina producida a partir de un microorganismo, y

b) al menos una endopeptidasa similar a quimotripsina producida a partir de un microorganismo.

45 en las que la al menos una endopeptidasa similar a tripsina se produce mediante fermentación de 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 100 % de identidad de secuencia con la secuencia indicada por SWISSPROT No. P35049, y la al menos una endopeptidasa similar a quimotripsina se produce mediante fermentación de una cepa de *Nocardia* Sp y tiene al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o 100 % de identidad de secuencia con secuencias polipeptídicas de EMBL CDS CAI94179, y la proporción de la endopeptidasa similar a tripsina a la endopeptidasa similar a quimotripsina está en el intervalo de 5:1 a 35:1, en la que la proporción se basa en el peso de la enzima, y en el que el material proteináceo a base de leche es proteína de suero, para su uso como medicamento o como composición con efecto terapéutico.

55 Según se caracteriza por el perfil de peso molecular del péptido, el perfil de secuencia del péptido (especificidad de endopeptidasa) y la eficacia de hidrólisis de las endopeptidasas, los hidrolizados de la invención tienen propiedades similares a las de los hidrolizados de proteínas a base de leche producidos por enzimas de mamíferos.

60 Los hidrolizados de la invención tienen efectos terapéuticos y preventivos, y pueden usarse especialmente para la inducción de tolerancia oral en lactantes o pacientes que la necesiten, o para reducir el riesgo de alergias en lactantes o pacientes que la necesiten, o para reducir la gravedad de alergias durante la infancia o más adelante en la vida, especialmente en lactantes o pacientes que lo necesiten.

65 Los hidrolizados se pueden incorporar en un preparado inicial para lactantes, un preparado de continuación, un preparado de alimentación para bebés, un preparado de cereales para lactantes o una leche de crecimiento, o una

composición nutricional para adultos o una bebida a base de proteínas de la leche para adultos para personas que lo necesiten. de terapia y preferiblemente dicha composición es un preparado inicial para lactantes.

En un aspecto de la invención, al menos una endopeptidasa similar a tripsina se deriva de una cepa de *Fusarium oxisporum*.

En otro aspecto de la invención, al menos una endopeptidasa similar a quimotripsina se deriva de una cepa de *Nocardopsis Sp.*

En otro aspecto de la invención, la proporción entre la endopeptidasa similar a tripsina y la endopeptidasa similar a quimotripsina, basada en el peso de la enzima, está en el intervalo de 5:1 a 35:1, preferiblemente de 20:1 a 30:1, más preferiblemente 27:1.

En otro aspecto de la invención, la proporción entre la endopeptidasa similar a tripsina y la endopeptidasa similar a quimotripsina es 9:1, basada en el peso de la enzima.

Breve descripción de los dibujos.

Figura 1 Separación por cromatografía de exclusión por tamaño de péptidos de los hidrolizados del ejemplo 1. Los péptidos se separan basándose en su peso molecular (PM) usando una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex Peptide 10/300 GL de GE). La elución de los péptidos se controla mediante UV a 215 nm. Los resultados muestran que las distribuciones de tamaño de las combinaciones 2, 4 y 6 están muy cerca del PTN de referencia (experimento 1, véase el texto), como lo ilustra el pronunciado descenso del peso molecular alto al bajo, en comparación con las combinaciones 3 y 5, para las que se observa más bien una meseta (véase la línea de tendencia). Estos resultados sugieren que la eficacia enzimática de los experimentos 2, 4 y 6 genera una población de péptidos de tamaño muy similar, mientras que los experimentos 3 y 5 están más enriquecidos en péptidos más pequeños que los de referencia.

Figura 2 Análisis de especificidad enzimática de los hidrolizados del ejemplo 1. Las secuencias de péptidos se identifican mediante LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap MS con bombas Allegro HPLC de Thermo Scientific). Para cada secuencia identificada, se extraen los cinco aminoácidos antes y después del sitio de escisión (posición -1) y se construye un gráfico de frecuencia (o gráfico de conservación de secuencia). Los aminoácidos se grafican desde la frecuencia más alta (arriba) a la más baja (abajo), siendo su tamaño vertical proporcional a su frecuencia. Los resultados muestran que las mezclas de enzimas usadas en los experimentos 4 y 6 tienen una especificidad enzimática comparable a la PTN de referencia (experimento 1).

Figura 3 Cinética del consumo de OH⁻ durante las reacciones de hidrólisis del ejemplo 1 (μmol de OH⁻ consumido/g de proteína).

Descripción detallada de la invención

Los hidrolizados de proteínas a base de leche de la presente invención se obtienen mediante el tratamiento de una solución de un material proteináceo a base de leche con una endopeptidasa similar a tripsina y una endopeptidasa similar a quimotripsina de una fuente microbiana.

Material proteináceo a base de leche

En las composiciones según la invención, el material de partida es un material proteináceo a base de leche. Puede ser un material proteináceo a base de suero, caseína o mezclas de material proteináceo a base de suero y caseína. La fuente de caseína puede ser caseína ácida o sólidos lácteos descremados. El material proteináceo a base de suero puede ser un suero procedente de la elaboración de queso, particularmente un suero dulce tal como el resultante de la coagulación de la caseína con cuajo, un suero ácido procedente de la coagulación de la caseína con un ácido, o los fermentos acidificantes, o incluso una mezcla de Suero resultante de la coagulación por un ácido y por el cuajo. Este material de partida puede ser suero desmineralizado mediante intercambio iónico y/o electrodialisis y se conoce como proteína de suero desmineralizada (DWP). En una realización preferida, la fuente de dicho material proteináceo a base de suero es suero dulce del que se ha eliminado total o parcialmente el caseino-glicomacropéptido (CGMP). Esto se llama suero dulce modificado (MSW). La eliminación del CGMP del suero dulce da como resultado un material proteináceo con contenidos de treonina y triptófano más cercanos a los de la leche humana. Un procedimiento para eliminar CGMP del suero dulce se describe en el documento EP 880902.

El material de partida puede ser una mezcla de DWP y MSW. Puede ser un concentrado de proteínas de suero con un 35-80 % de proteína (WPC) o un aislado si la concentración de proteína de suero es mayor que 95 % de proteína (WPI). Como ejemplo de WPC se puede citar WPC 87 Lacprodan® disponible en Arla Foods, Dinamarca y como ejemplo de WPI se puede citar Bipro® de Davisco Foods International (Minnesota EE.UU.).

El material proteínico a base de leche puede estar en solución o suspensión, y está presente en una concentración de 2-30 % en peso de material proteínico, más preferiblemente de 5-20 %, más preferiblemente de 6-10 %.

El material de partida puede ser incluso una combinación de los materiales de partida mencionados anteriormente y lactosa. La lactosa puede estar presente como parte del concentrado de proteína de suero o puede agregarse. La adición de lactosa al material de partida para la hidrólisis tiene la ventaja de que se hidroliza cualquier proteína residual contenida en la lactosa. La lactosa puede estar presente en concentraciones de 0.05 -30 % p/p, preferiblemente 0.10 -20 % p/p, o en los casos en los que se prefiere un contenido de lactosa menor, 0.10 a 1 %, preferiblemente 0.10 a 0.20 % (p/p). En este último caso el producto final podrá destinarse a lactantes o adultos con baja tolerancia a la lactosa. La lactosa se puede eliminar, por ejemplo, mediante ultrafiltración (produciendo suero UF), seguido opcionalmente de diálisis.

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

Enzimas producidas por un microorganismo.

La endopeptidasa similar a la tripsina se produce a partir de *Fusarium oxysporum* y la endopeptidasa similar a la quimotripsina se produce a partir de *Nocardia* sp. En este documento se entiende por "producido a partir de" el significado de producido por fermentación de una célula del organismo dado. Estas últimas enzimas pueden ser nativas del organismo a partir del cual se producen o pueden modificarse en un organismo huésped mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos que codifica la endopeptidasa.

Endopeptidasa similar a la tripsina:

La tripsina (CE 3.4.21.4) es una serina proteasa que se encuentra en el sistema digestivo de muchos vertebrados, donde hidroliza proteínas. Se produce en el páncreas como proenzima tripsinógeno inactivo. La tripsina escinde cadenas o enlaces peptídicos principalmente en el lado carboxilo de los aminoácidos lisina o arginina, excepto cuando cualquiera de ellos va seguido de prolina. Por "endopeptidasa similar a tripsina" en la presente invención, se entiende una enzima que tiene una actividad que se asemeja a la actividad de la tripsina de mamífero, por ejemplo, tripsina extraída de tejido pancreático porcino. Por "endopeptidasa similar a la tripsina" también se entiende una endopeptidasa que escinde preferentemente péptidos o proteínas en el lado C-terminal del isómero L de arginina y/o lisina, preferiblemente arginina y lisina. La endopeptidasa similar a la tripsina se deriva de la cepa bacteriana grampositiva *fusarium oxysporum* la cual tiene la secuencia registrada bajo el nombre SWISSPROT No. P35049. La endopeptidasa similar a la 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 100 % de identidad de secuencia con SWISSPROT No. P35049. La enzima codificada por esta última secuencia ha sido descrita (US5,288,627; US5,693,520).

La concentración de endopeptidasa similar a la tripsina puede ser de 100-500,000 unidades de tripsina USP por g de proteína alimentaria, por ejemplo, de 250-250,000 o de 500-100,000. Una unidad de tripsina USP es la actividad que provoca un cambio en la absorbancia a 253 nm de 0.003 a pH 7.6 y 25 °C usando clorhidrato de éster etílico de N-benzil-L-arginina (BAEE) como sustrato.

Expresado de otro modo en términos de mg de >95 % de proteína enzimática pura/ml, esto significa que la concentración de endopeptidasa similar a tripsina puede variar desde 0.5 a 4, preferiblemente desde 1 a 3.5 y más preferiblemente de 1.5 a 3 mg por g de proteína de leche. Esto es independiente de la presencia de quimotripsina como la endopeptidasa.

Las enzimas: endopeptidasa similar a la quimotripsina -

La quimotripsina (CE 3.4.21.4) es una serina proteasa que escinde preferentemente los enlaces peptídicos amida donde el lado carboxilo del enlace amida (la posición P₁) es una tirosina, triptófano o fenilalanina. La quimotripsina también hidroliza otros enlaces amida en péptidos a un ritmo más lento, particularmente aquellos que contienen leucina en la posición P₁. Por "endopeptidasa similar a quimotripsina" se entiende una enzima que tiene una actividad similar a la de la quimotripsina de mamífero, por ejemplo, quimotripsina extraída de tejido pancreático porcino. También se refiere a una enzima que tiene una mayor especificidad para escindir en el lado carboxi terminal de cada uno de los residuos de tirosina, fenilalanina, triptófano, leucina, metionina e histidina que para escindir en el lado carboxi terminal de arginina y lisina.

La endopeptidasa similar a la quimotripsina de la invención se deriva de la cepa bacteriana grampositiva de *Nocardia* sp. EMBL CDS CAI94179 (descrito previamente en, por ejemplo, el documento WO 88/03947). En otra realización preferida, la endopeptidasa similar a quimotripsina tiene una identidad de secuencia con el polipéptido EMBL CDS CAI94179 de al menos 70 %, 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 %.

La concentración de endopeptidasa similar a quimotripsina es preferiblemente de 100 a 100,000 unidades de quimotripsina USP por g de proteína a base de leche, más preferiblemente de 500-50,000 y lo más preferiblemente de 1,000-20,000. Una unidad de quimotripsina USP es la actividad que provoca un cambio en la absorbancia a 237 nm de 0.0075 a pH 7.0 y 25 °C usando éster etílico de N-acetil-L-tirosina (ATEE) como sustrato. Expresado de otro modo esto en términos de mg de >95 % de proteína enzimática pura/ml, esto significa que la concentración de endopeptidasa similar a quimotripsina puede variar de 0.05 a 2, preferiblemente desde 0.1 a 1, y más preferiblemente de 0.15 a 0.4 mg por gramo de proteína de la leche. Esto es independiente de la presencia de endopeptidasa similar a la tripsina.

Durante el procedimiento de hidrólisis, las enzimas se usan juntas como una mezcla. Por ejemplo, la endopeptidasa similar a la tripsina derivada de *fusarium oxysporum* puede combinarse con endopeptidasa similar a la quimotripsina a partir de *Nocardiopsis Sp.*

Preferiblemente, la proporción de endopeptidasa similar a tripsina a endopeptidasa similar a quimotripsina (proporción T/C) basada en el peso de la enzima está en el intervalo de 5:1 a 35:1, preferiblemente de 20:1 a 30:1, más preferiblemente 27:1. 1.

Esto es particularmente cierto para la endopeptidasa similar a la tripsina (T) a partir de *fusarium oxysporum* combinado con endopeptidasa similar a quimotripsina (C) a partir de *Nocardiopsis* en T/C una proporción de 9:1.

El procedimiento de hidrólisis:

Las condiciones típicas para llevar a cabo el procedimiento de hidrólisis han sido descritas en el estado de la técnica. La temperatura puede variar desde aproximadamente 40 °C a 60 °C, preferiblemente a 50 °C, el tiempo de reacción desde 1 a 6 horas, preferiblemente 4 horas, y los valores de pH pueden estar dentro del intervalo de 6.5 a 8.5, preferiblemente de 7.0 a 8.0. El pH se puede ajustar con agentes conocidos, por ejemplo Ca(OH)₂. En los documentos US5039532 o EP0631731A1 se describe una reacción de hidrólisis de dos etapas con un etapa de desnaturalización por calor en el medio para asegurar que el hidrolizado final esté sustancialmente libre de alérgenos de proteínas de la leche. La etapa de desnaturalización por calor se lleva a cabo preferiblemente a 95 °C, durante 5 minutos.

Opcionalmente, la solución o suspensión de proteína a base de leche se puede precalentar (por ejemplo, a 80-100 °C, durante 5-30 minutos, o a 130 °C, durante aproximadamente 30-60 segundos) para asegurar la desnaturalización de las proteínas del suero, por ejemplo, α-lactoalbúmina, β-lactoglobulina y albúmina sérica (BSA).

Independientemente de cómo se lleve a cabo la hidrólisis, el producto de la hidrólisis sufre un tratamiento térmico que inactiva la enzima que lleva a cabo la hidrólisis. Este tratamiento térmico comprende precalentar el hidrolizado a una temperatura de 75 °C o superior, y mantenerlo a esa temperatura (preferiblemente entre 75 °C-85 °C) durante aproximadamente 0.1 a 30 minutos para promover la autodigestión de la enzima, a este tratamiento le sigue ventajosamente una esterilización, preferiblemente a temperatura ultra alta, por ejemplo a 125 °C-135 °C, durante 30 segundos a 3 minutos, mediante inyección de vapor o en un intercambiador de calor.

El hidrolizado así obtenido puede clarificarse, filtrarse o ultrafiltrarse. También puede estar concentrado. A continuación se puede secar, por ejemplo mediante liofilización, secado por pulverización o liofilización para diferentes aplicaciones, o incluso tratarse posteriormente. En el último caso, la enzima puede inactivarse durante el tratamiento posterior.

Los hidrolizados de la invención pueden tener un grado de hidrólisis que se caracteriza por % de NPN/TN. El % de NPN/TN significa el nitrógeno no proteináceo dividido por el nitrógeno total X 100. El nitrógeno no proteináceo es nitrógeno amino que puede reaccionar libremente con un reactivo tal como el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). El % de NPN/TN se puede medir como se detalla en Adler-Nissen J-, 1979, J. Agric. Food Chem., 27 (6), 1256-1262. En general, los hidrolizados extensivamente se caracterizan por tener un % de NPN/TN mayor que 95 %, mientras que un hidrolizado parcialmente hidrolizado se caracteriza por tener un % de NPN/TN en el intervalo de 75 %-85 %. En una realización preferida, los hidrolizados de la invención tienen un % de NPN/TN en el intervalo de 70-90 %, preferiblemente de 75 a 85 %. Estos últimos hidrolizados son hidrolizados "parciales". Estos hidrolizados también pueden caracterizarse porque el 60-70 % de su población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular < 1000 Dalton.

En otra realización preferida donde se desean hidrolizados "extensos", los hidrolizados de la invención tienen un % de NPN/TN en el intervalo mayor que 95 %. Estos hidrolizados también pueden caracterizarse porque al menos el 95 % de su población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular < 1000 Dalton.

Los hidrolizados de la invención pueden tener un grado de hidrólisis que se caracteriza por % de NPN/TN. El nitrógeno no proteináceo sobre el nitrógeno total se usa ampliamente como medida de péptidos solubles creados por hidrólisis enzimática. El método analítico usado para medir el NPN es equivalente al método AOAC 991.21. En los hidrolizados basados 100 % en proteína de suero, el contenido de NPN/TN por lo general oscila entre 70-90 %. En una realización preferida, los hidrolizados de la invención tienen un % de NPN/TN en el intervalo de 70-90 %, preferiblemente de 75

a 85 %. En otra realización preferida en la que se desea un hidrolizado extensamente hidrolizado, los hidrolizados de la invención tienen un % de NPN/TN en el intervalo mayor que 95 %.

La distribución del peso molecular de los péptidos en el hidrolizado de proteínas obtenido puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). En una realización preferida, el hidrolizado de la invención es un hidrolizado parcial y está compuesto por péptidos en los que menos del 1 % en peso tiene un peso molecular superior a 20,000 kDa. En una realización más preferida, los hidrolizados de la invención tienen una distribución de peso de péptidos similar a la obtenida con enzima de mamífero, específicamente enzima porcina, por ejemplo PTN 6.0S® (también conocido como PTN) de Novozyme (Dinamarca) (véase el ejemplo 1, figura 1). Esta enzima de referencia es una tripsina extraída del páncreas de cerdo que contiene tripsina como componente principal pero también quimotripsina residual. Tiene una actividad de tripsina de 1350 actividades de quimotripsina USP/g y una actividad de quimotripsina de 80 actividades de quimotripsina USP/g. Esto conduce a una proporción T/C de 16 basándose en las actividades.

La especificidad enzimática de las mezclas de enzimas usadas durante la hidrólisis se puede evaluar secuenciando los péptidos comprendidos en el hidrolizado resultante. Las secuencias peptídicas se identifican mediante LC-MS/MS. En una realización más preferida, los hidrolizados de la invención tienen una especificidad enzimática cercana a la obtenida con la enzima de mamíferos, específicamente la enzima porcina, por ejemplo, PTN 6.0S descrita anteriormente (véase el ejemplo 1, figura 2).

La eficiencia de la hidrólisis se puede evaluar midiendo el consumo de álcali (OH) durante la hidrólisis. En una realización más preferida, los hidrolizados de la invención tienen un rendimiento de hidrólisis cercano al obtenido con enzima de mamífero, específicamente enzima porcina, por ejemplo PTN descrita anteriormente (véase el ejemplo 1, figura 3).

La antigenicidad residual de los hidrolizados puede evaluarse usando inmunoensayos estándar como las pruebas ELISA. Preferiblemente, los hidrolizados de la invención presentan una β -lactoglobulina (BLG) residual de < 3 mg de equivalente de BLG/g de equivalente de proteína, más preferiblemente < 2 mg de equivalente de BLG/g de equivalente de proteína, lo más preferiblemente < 1 mg de equivalente de BLG/g de equivalente de proteína (véase el ejemplo 1).

Los hidrolizados de la invención pueden incorporarse a preparados para lactantes, preparados de continuación, alimentos para bebés, cereales para lactantes, leches de crecimiento, complementos alimenticios para lactantes o niños o una composición nutricional para adultos, es decir, todas las preparaciones destinadas a la prevención o al tratamiento de la alergia, así como cualesquiera otros beneficios que los hidrolizados de proteínas pudieran aportar al ser humano, y, preferiblemente, dicha composición es un preparado inicial para lactantes.

En una realización de la invención, los hidrolizados de la invención se usan en combinación con probióticos seleccionados, por ejemplo en preparados para lactantes. Los probióticos seleccionados pueden ser cualquiera de los probióticos usados convencionalmente en los preparados para lactantes. Preferiblemente los probióticos son aquellos capaces de proporcionar un efecto adicional o sinérgico sobre las alergias y/o la inducción de tolerancia oral y/o procedimientos inflamatorios.

Ejemplos de microorganismos probióticos apropiados que pueden usarse en la presente invención incluyen levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, mohos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, y *Penicillium* and *Torulopsis* and 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*. 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 delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lacto-bacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (Lacto-bacillus GG), *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, y *Staphylococcus xylosus*.

Las cepas bacterianas probióticas preferidas incluyen *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 que se puede obtener de Valio Oy de Finlandia con la marca comercial LGG, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 que se puede obtener de BioGaia AB, *Bifidobacteria lactis* CNCM 1-3446 vendido *inter alia* por la empresa Christian Hansen de Dinamarca bajo la marca Bb 12 y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 vendido por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón bajo la marca BB536.

Si están presentes en las composiciones de la presente invención, los probióticos están preferiblemente presentes en una cantidad de 10^3 a 10^{12} ufc/g, más preferiblemente 10^6 a 10^{11} ufc/g, incluso más preferiblemente 10^4 a 10^9 ufc/g, lo más preferiblemente 10^7 a 10^9 ufc/g de la composición o por mL de la composición.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Se llevaron a cabo una serie de reacciones de hidrólisis usando el mismo sustrato de proteína de leche y un conjunto de 6 soluciones enzimáticas, que consistían en una solución estándar de PTN y cinco mezclas diferentes de tripsina y endopeptidasas similares a quimotripsina según la tabla 1. El material de partida fueron 500 ml de una solución al 8 % de sustrato de proteína de leche MWP28/DWP28 en una proporción de 83/17 basada en el peso de la proteína. La composición final del sustrato es 27.7 % de sólidos totales, 8 % de proteína y 18.48 % de lactosa.

El sustrato proteico se disolvió como una solución 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 pH 7.4 usando solución de Ca(OH)₂ al 10 %. Después de la adición de enzima (la mitad del total de enzima útil para la primera etapa de hidrólisis), el pH se mantuvo constante a pH 7.4 mediante la adición de NaOH 0.25 M usando un Autotitrator DL50 Graphix (Mettler Toledo durante 4 h a 55 °C. El hidrolizado se calentó durante 5 min a 93 °C. Después de equilibrar la temperatura a 55 °C, se introdujo enzima adicional (la mitad de la enzima total para la segunda de hidrólisis) y el pH se mantuvo como anteriormente. Después de 2 horas de hidrólisis, la reacción enzimática se detuvo mediante tratamiento térmico (5 min a 85 °C) para inactivar las enzimas.

Tabla 1 Muestra la serie de experimentos llevados a cabo con las diversas proporciones de enzimas. TL1 y TL2 indican las endopeptidasas similares a la tripsina de *fusarium oxysporum*, y *Kutzneria albida* respectivamente. CTL2 y CTL3 indican las endopeptidasas similares a la quimotripsina de *Metarhizium anisopliae* y *Nocardiaopsis sp.* respectivamente

Experimento	Enzima (mg/g de proteína)	Proporción TIC (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 proporción 16* se basa en la actividad enzimática.		

Los experimentos números 3-5 son ejemplos de referencia y no forman parte de la presente invención.

Los seis hidrolizados producidos se analizaron usando tres métodos diferentes: cromatografía de exclusión por tamaño de péptidos, análisis de especificidad enzimática y antigenicidad residual. La eficiencia de la hidrólisis de las seis reacciones se analizó mediante el seguimiento del consumo de OH⁻. Los resultados se muestran en las figuras 1-3 respectivamente.

Antigenicidad: La antigenicidad residual de los hidrolizados se probó usando un inmunoensayo enzimático comercial (RIDASCREEN β-Lactoglobulina (BLG), r-biopharm), que está diseñado para cuantificar la β-lactoglobulina residual nativa y procesada en productos alimenticios. Los pocillos de microtitulación están recubiertos con BLG. Se agregan estándares, soluciones de muestra y anticuerpos anti-BLG. Los BLG libres e inmovilizados compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Después del lavado, se agregan anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y se unen a los complejos anticuerpo-BLG. Luego, cualquier conjugado de enzima no unido se elimina mediante una etapa de lavado. Se agregan sustrato enzimático y cromógeno a los pocillos. El conjugado de enzima unido convierte el cromógeno incoloro en un producto coloreado. La medición se realiza fotométricamente y la absorción es inversamente proporcional a la concentración de BLG en la muestra.

Los seis hidrolizados probados en el ejemplo 1 presentaron todos una β-lactoglobulina (BLG) residual menor que 0.85 mg de equivalente de BLG/g de equivalente de proteína. Esto está muy por debajo del nivel al que se puede declarar hipoalergénica la fórmula para lactantes según lo indicado por la directiva europea 2006/125/CE sobre preparados para lactantes publicada el 5 de diciembre de 2006, JO 6.12.2006 L339/16. La directiva exige que la proteína inmunorreactiva represente menos del 1 % del total de sustancias que contienen nitrógeno. Esto equivale a 3 mg de β-lactoglobulina residual (BLG/g de equivalente de proteína). BLG constituye entre el 30 % y el 50 % del material inmunorreactivo total del suero. Por tanto, un nivel de BLG menor que 3 mg de β-lactoglobulina residual/g de equivalente de proteína indica que el producto no tiene más del 1 % de proteína inmunorreactiva. Tal nivel es consistente con el Anexo IV de la Directiva 2006/125/CE de la Comisión Europea que establece determinadas condiciones para un preparado para lactantes que pretende reducir el riesgo de alergia.

Conclusión:

Se ha identificado que un número de mezclas de endopeptidasas similares a tripsina y endopeptidasas similares a quimotripsina de fuentes microbianas son adecuadas para producir hidrolizados de proteínas de la leche con propiedades similares a las de los hidrolizados lácteos producidos por enzimas de mamíferos. Los inventores han llevado a cabo una serie de experimentos para evaluar la proporción óptima de enzimas para proporcionar hidrolizados con las propiedades físicas, químicas y biológicas deseadas. Se variaron la fuente bacteriana y la proporción de endopeptidasas de similar a la tripsina a endopeptidasas de tipo quimotripsina (basadas en el peso de la enzima), así como la proporción de enzima a sustrato de proteína y la temperatura.

Una mezcla de una endopeptidasa similar a la tripsina de *fusarium oxysporum* o *Kutzneria albida* combinado con una endopeptidasa similar a la quimotripsina de *Nocardiopsis sp.* o *Metarhizium anisopliae* se encontró que era buena candidata para reemplazar las enzimas de mamíferos que se usan actualmente. Se ha demostrado claramente que las mezclas de la invención, especialmente cuando la endopeptidasa similar a tripsina y la endopeptidasa similar a quimotripsina se usan en proporciones específicas, proporcionan perfiles peptídicos muy similares a los producidos con las enzimas de mamíferos.

Esto es particularmente cierto para la endopeptidasa similar a la tripsina (T) de *fusarium oxysporum* combinado con endopeptidasa similar a quimotripsina (C) de *Nocardiopsis* en una proporción T/C (basada en el peso de la enzima) de 9:1, y para la endopeptidasa similar a la tripsina (T) de *fusarium oxysporum* combinado con endopeptidasa similar a quimotripsina (C) de *Nocardiopsis* en una proporción T/C de 27:1.

Los hidrolizados así producidos presentan una baja alergenicidad. Pueden reducir el riesgo de alergias más adelante en la vida y pueden ser apropiados para su incorporación en un preparado para lactantes y/o una composición nutricional dirigida a individuos sanos con riesgo de alergias. Son aptos para la incorporación a cualquier tipo de complemento alimenticio tanto para adultos como para niños o bebés. También pueden tener la capacidad de inducir tolerancia oral.

Aparte del aspecto de prevención de alergias, se pueden usar mezclas de tripsina y quimotripsina de fuentes microbianas para producir productos terapéuticos, tales como los destinados a alimentar a sujetos alérgicos. También se pueden usar para producir cualquier tipo de hidrolizado de proteínas que tenga otros beneficios además de la prevención/tratamiento de la alergia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende hidrolizado de proteína a base de leche que se puede obtener mediante el tratamiento de una solución de un material proteináceo a base de leche con

a) al menos una endopeptidasa similar a tripsina derivada de un microorganismo, y

b) al menos una endopeptidasa similar a quimotripsina derivada de un microorganismo,

en la que la al menos una endopeptidasa similar a tripsina se produce mediante fermentación de 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 100 % de identidad de secuencia con la secuencia indicada por SWISSPROT No. P35049, y la al menos una endopeptidasa similar a quimotripsina se produce mediante fermentación de una cepa de *Nocardia* y tiene al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o 100 % de identidad de secuencia con secuencias polipeptídicas de EMBL CDS CA194179, y la proporción de la endopeptidasa similar a tripsina a la endopeptidasa similar a quimotripsina está en el intervalo de 5:1 a 35:1, en la que la proporción se basa en el peso de la enzima, y en la que el material proteináceo a base de leche es proteína de suero, para su uso como medicamento o como composición con efecto terapéutico.

2. La composición para su uso según la reivindicación 1 para la inducción de tolerancia oral en lactantes o pacientes que la necesitan, o para reducir el riesgo de alergias en lactantes o pacientes que la necesitan, o para reducir la gravedad o frecuencia de las alergias durante la infancia o más tarde en la vida, especialmente en lactantes o pacientes que lo necesitan.

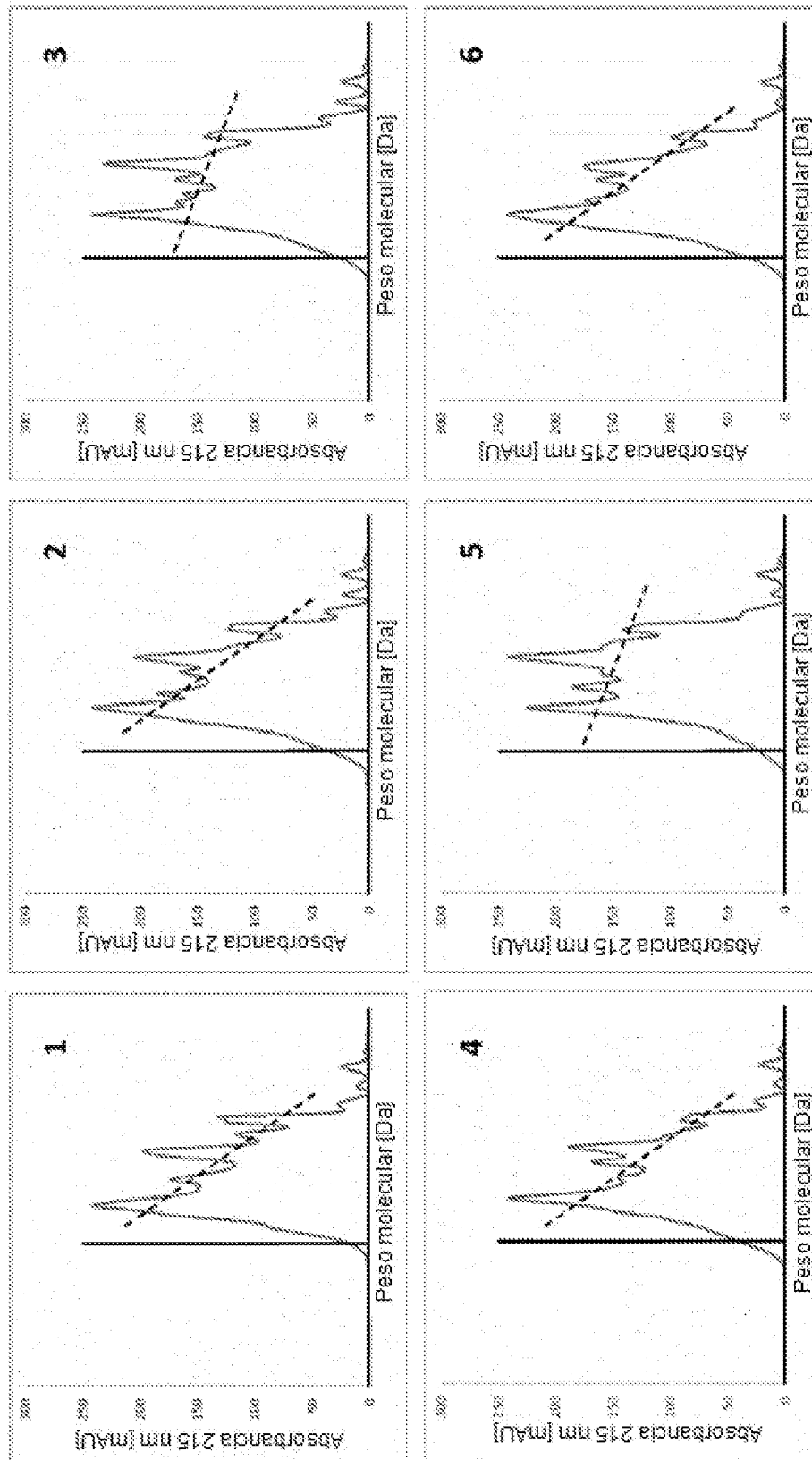
3. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque la proporción entre la endopeptidasa similar a tripsina y la endopeptidasa similar a quimotripsina está en el intervalo de 20:1 a 30:1, preferiblemente 27:1, en la que la proporción se basa en el peso de la enzima.

4. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque la proporción entre la endopeptidasa similar a tripsina y la endopeptidasa similar a quimotripsina es 9:1, en la que la proporción se basa en el peso de la enzima.

5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque el material proteináceo a base de leche es proteína de suero dulce, preferiblemente de la cual se ha eliminado total o parcialmente el caseino-glicomacropéptido o es un aislado de proteína de suero o una mezcla de estas fuentes de proteína.

6. La composición para su uso según la reivindicación 5 caracterizada porque el material proteináceo a base de leche es una mezcla de suero dulce modificado al que se le ha eliminado total o parcialmente el caseino-glicomacropéptido y la proteína de suero desmineralizada.

7. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es un preparado para lactantes, un preparado de continuación, un preparado de alimentación para bebés, un preparado de cereales para lactantes o una leche de crecimiento, un complemento alimenticio para lactantes o niños o una composición nutricional para adultos dirigida a la prevención del tratamiento de la alergia y preferiblemente dicha composición es un preparado inicial para lactantes.



— = Línea de tendencia del peso molecular

| = corte de 10 kDa

Fig. 1

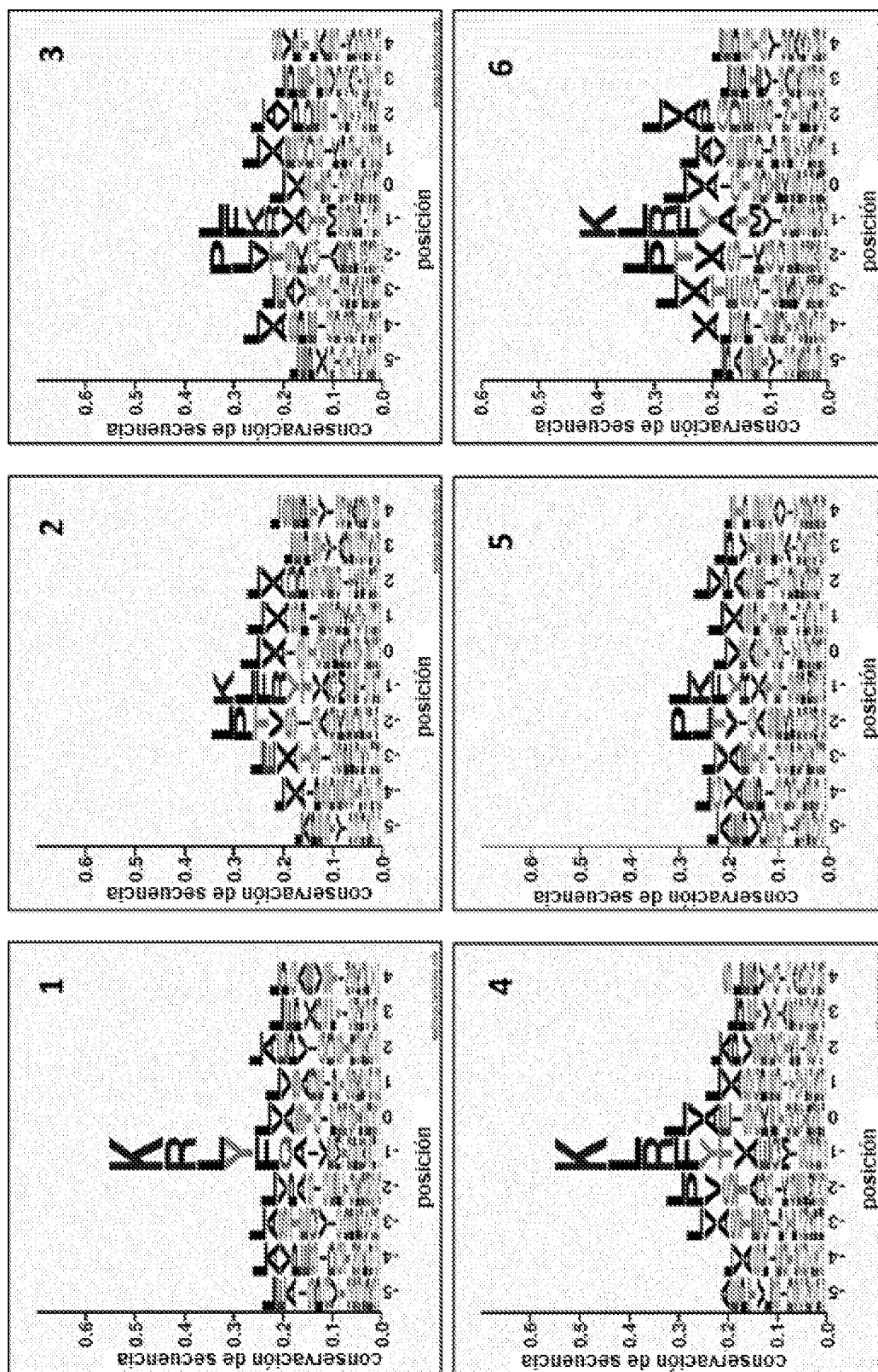


Fig. 2

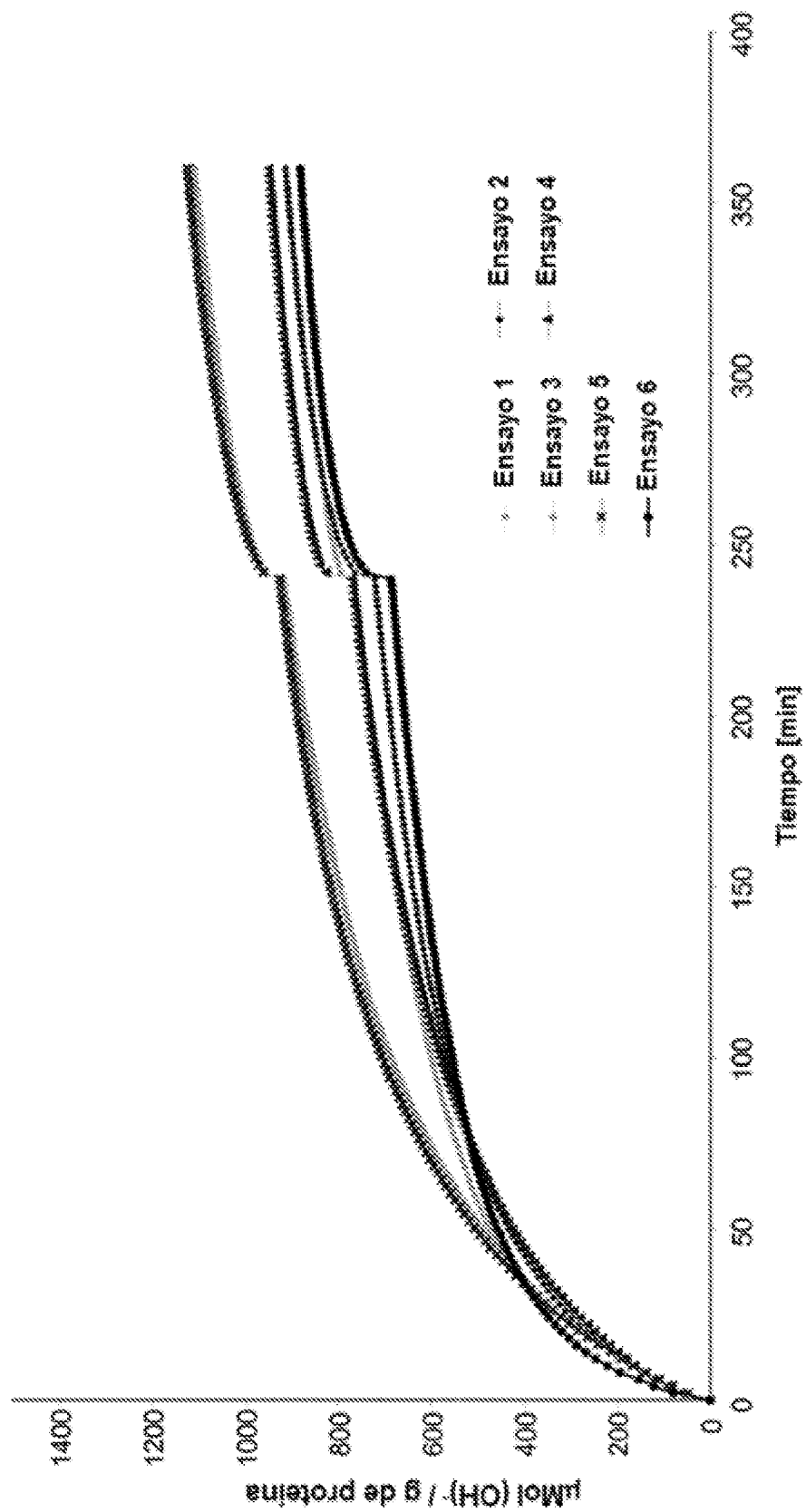


Fig. 3