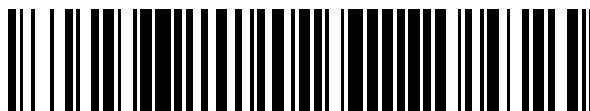


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 918 577**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013** **PCT/EP2013/076643**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15090347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013** **E 13811165 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022** **EP 3082842**

54 Título: **Péptidos recientemente identificados para uso en la inducción de tolerancia oral**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.07.2022

73 Titular/es:
SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:
BLANCHARD, CARINE;
NUTTEN, SOPHIE 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 2 918 577 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 recientemente identificados para uso en la inducción de tolerancia oral

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a péptidos de β -lactoglobulina recientemente identificados que son hipoalergénicos, pero conservan la capacidad para inducir tolerancia a la proteína nativa. Los péptidos pueden administrarse a todos los lactantes, especialmente a los que tienen riesgo de alergia a las proteínas de la leche de vaca, específicamente a la β -lactoglobulina. Los péptidos son capaces de modular la respuesta inmune infantil a los alérgenos. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

15 La alergia a la leche de vaca (APLV) afecta aproximadamente al 2,5% de todos los bebés y se considera la alergia alimentaria más común en este grupo de edad [Sicherer SH et al. (2010), Food allergy, Sampson HA, J. Allergy Clin. Immunol. (125)]. Aproximadamente el 85% de los niños superan su alergia a la leche de vaca antes de los 2 o 3 años. Como tal, la ALV afecta a otros grupos de edad con menor prevalencia.

20 Las alergias a la leche de vaca y a las fórmulas que contienen leche de vaca adaptadas a las necesidades de los lactantes 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.

25 Además de la lactancia materna, la principal recomendación para la prevención de la APLV es el uso de fórmulas hipoalergénicas, que se recomienda prescribir a lactantes asintomáticos "de riesgo", con padres atópicos.

A diferencia de las fórmulas estándar de leche de vaca para lactantes, en las fórmulas hipoalergénicas, las proteínas de la leche de vaca han sido hidrolizadas, para disminuir su potencial alergenidad. Este enfoque ha demostrado ser eficaz para prevenir sensibilización por proteínas nativas (de longitud completa) presentes en las fórmulas (aunque en una cantidad mucho menor que en una fórmula no hidrolizada).

Los hidrolizados se pueden caracterizar como "parciales" o "extensivos" dependiendo del grado en que la reacción de hidrólisis se lleva a cabo. Actualmente, no existe una definición legal/clínica acordada de productos extensamente hidrolizados de acuerdo con las directrices de la WAO (Organización Mundial de la Alergia) para APLV, pero hay acuerdo en que, según la WAO las fórmulas hidrolizadas han demostrado ser una fuente de proteínas útil y ampliamente utilizada para los bebés que sufren de APLV. En la presente invención un hidrolizado parcial es aquel en el que el 60% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular de menos de 1000 Daltons, mientras que un hidrolizado extensivo es aquel en el que al menos el 95% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular inferior a 1000 Daltons. Estas definiciones se utilizan actualmente en la industria.

40 Actualmente hay muchos ejemplos de fórmulas de caseína o hipoalergénicas a base de suero de leche parcial o ampliamente hidrolizadas. (por ejemplo, NAN-HA™, también conocida como BEBA-HA™, Alfare™, Altéra™ de Nestlé y S26-HA™ de Pfizer) en el mercado.

45 Para los bebés que ya muestran síntomas de APLV, las fórmulas de sustitutos de la leche no alérgicas, como el aminoácidos libres (p. ej., Vivonex™ de Nestlé) o fórmulas a base de soja (como S-26 Soy™, NURSOY™ de Pfizer, Nueva York y NESTLÉ® Good Start® ALSOY® de Nestlé) pueden ser alternativas adecuadas a la leche de vaca estándar o fórmulas hipoalergénicas.

50 Por lo tanto, el enfoque principal hasta la fecha en proporcionar nutrición para niños con alergias a la leche de vaca ha sido encontrar preparaciones que no induzcan una respuesta alérgica, es decir, proporcionar formulaciones no alérgicas. Uno de los inconvenientes de administrar fórmulas hipoalergénicas (que contengan aminoácidos libres, leche a base de soja o leche con proteínas de la leche de vaca ampliamente hidrolizadas) a los lactantes es que, si bien dichas formulaciones permiten a los lactantes que son alérgicos a la leche de vaca evitar una respuesta alérgica, no permiten que esos niños desarrollen tolerancia oral a los alérgenos de la proteína de la leche de vaca para que puedan continuar bebiendo productos lácteos inalterados más adelante en la vida.

La tolerancia oral es la supresión específica de la reactividad inmune celular y/o humoral a un antígeno por administración previa del antígeno por vía oral. Es una parte importante del desarrollo del sistema inmunológico en los primeros meses de vida y permite que el lactante consuma alimentos sin reacciones adversas. El fracaso del establecimiento de la tolerancia oral conduce a la alergia. El desarrollo de la tolerancia oral está ligado a la educación normal del sistema inmunológico, resultando en una reacción reducida a los antígenos alimentarios.

65 Se han identificado varios factores que afectan a la inducción y mantenimiento de la tolerancia oral, entre estos, la estructura de la proteína alimentaria, la dosis y frecuencia de administración del antígeno, así como el estado inmunitario del anfitrión.

Se cree que algunos péptidos, que pueden estar específicamente presentes en la fórmula infantil parcialmente hidrolizada, tienen la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario e inducir tolerancia oral.

- 5 Se ha encontrado que las formulaciones de leche parcialmente hidrolizada no solo son de alergenicidad reducida sino que pueden inducir tolerancia inmunológica a las proteínas de la leche (EP 0827 679).

10 Así, la solicitud de patente europea EP 2 332 428 describe una formulación que comprende un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca capaz de inducir tolerancia oral. Los péptidos en cuestión fueron identificados como provenientes de la caseína bovina.

15 El documento WO 00/42863 describe la identificación de varios péptidos tolerogénicos de β -lactoglobulina (uno de los principales alérgenos de la leche de vaca) capaces de inducir tolerancia oral, como lo demuestra la reducción de las respuestas inmunitarias (IgE) a la proteína nativa en ratones previamente expuestos a los péptidos en cuestión, en comparación con ratones que no habían sido expuestos a los péptidos. En esa solicitud de patente, los autores hacen referencia al documento EP 0 629 350, que describe el uso de productos hipoalergénicos hidrolizados de proteína de suero que se dice que son capaces de inducir la tolerancia a la proteína de la leche de vaca. Los autores de WO00/42863 indican que aunque en el documento EP 0 629 350 se indicó que los hidrolizados de proteína de suero están sustancialmente libres de las proteínas alergénicas podrían usarse para inducir la tolerancia a la proteína de la leche de vaca en niños con riesgo de alergia a la leche de vaca, encontraron, al analizar otros hidrolizados de proteína de suero de leche no alergénicos, que la no alergenicidad no se traducía necesariamente en la capacidad de inducir la tolerancia a la proteína de la leche de vaca. Continuaron diciendo que incluso algunas de las formulaciones que exhiben el grado más alto de no alergenicidad se encontró que no era adecuado para inducir la tolerancia a la proteína de la leche de vaca.

25 Además, se sabe que las fórmulas extensamente hidrolizadas pierden su capacidad para inducir tolerancia oral a largo plazo, es decir, la hidrólisis modifica ampliamente la naturaleza de la proteína de tal manera que ya no es reconocida por el sistema inmunitario. Esto conduce a la pérdida de un beneficio crítico.

30 Por tanto, existe la necesidad de identificar adicionalmente los factores que pueden influir en la inducción de la tolerancia oral. Es altamente deseable proporcionar composiciones hipoalergénicas o no alergénicas para ser utilizadas como complemento o sustituto de la leche materna y tener la capacidad de inducir tolerancia oral en el lactante.

35 Existe la necesidad de proporcionar soluciones nutricionales sintéticas que puedan aliviar el desarrollo de alergias, especialmente en infantes. Existe la necesidad de inducir la tolerancia a una variedad de alérgenos, incluidos los alérgenos de la leche y las proteínas de la leche.

40 Existe la necesidad de diseñar y producir intervenciones nutricionales, especialmente a través de ingredientes sintéticos o combinaciones de ingredientes, que puedan administrarse a los bebés a una edad temprana y que reduzcan la probabilidad o la magnitud de ser o volverse alérgico o desarrollar alergias más adelante en la vida.

45 Esta necesidad existe para la población general de bebés y también para las subpoblaciones de bebés que tienen predisposición a alergias o han presentado alergias.

Existe una necesidad general de proporcionar alivio de las alergias o síntomas de alergia y de desarrollar medios para inducir la tolerancia a los alérgenos comunes, como los alérgenos de la leche, especialmente en niños y bebés.

50 Resumen de la invención

Se describen en este documento, péptidos recientemente identificados, Id. de Sec. n° 1 a Id. de Sec. n° 5, de β -lactoglobulina (BLG) para la inducción de tolerancia a las proteínas de la leche en individuos con riesgo de alergia a las proteínas, así como en aquellos que ya padecen alergia. Los péptidos recién identificados Id. de Sec. n° 1-5 son reconocidos y se unen a HLA-DR (Antígeno de Leucocito Humano DR). Así, cada uno de estos péptidos contiene un epítipo HLA, que facilita el reconocimiento por parte de las células inmunitarias y la inducción de tolerancia oral a las proteínas de la leche, especialmente a la β -lactoglobulina (BLG) en mamíferos. La proteína de la leche puede ser de vaca, oveja, cabra o búfala.

60 Por lo tanto, la invención se refiere a una combinación de péptidos, teniendo cada péptido una longitud de aminoácidos de cinco a doce aminoácidos, la combinación que comprende un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. n° 2, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. n° 3, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. n° 4, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. n° 5, y un péptido que comprende la secuencia de a, donde la secuencia a es IDALNENK, para uso en la inducción de tolerancia oral a la β -lactoglobulina de vaca, oveja, búfala o cabra, en un lactante humano.

65 Para un efecto tolerogénico mejorado, uno o más péptidos que tienen una longitud de cinco a doce aminoácidos, y

que comprende una de las secuencias b y c en la Tabla 1, puede administrarse en combinación con la combinación de péptidos descritos en el párrafo anterior. Los péptidos pueden administrarse en su forma pura; diluido en un líquido adecuado, o en forma de una composición farmacéutica, una composición nutricional o suplemento nutricional.

- 5 De acuerdo con una realización de la invención, los péptidos están en forma de (i) fracciones peptídicas aisladas de la hidrólisis de material proteínico que contiene BLG, y/o (ii) péptidos preparados sintéticamente.

10 Una gran ventaja de estos péptidos es inducir tolerancia oral a la β -lactoglobulina de vaca, oveja, búfala o cabra en bebés humanos. Estos bebés humanos pueden estar "en riesgo" de desarrollar alergia a la leche de vaca, teniendo al menos uno de los padres o hermanos que es alérgico a la leche de vaca, o no "en riesgo". Por lo tanto, la combinación de péptidos de la invención es beneficiosa para bebés humanos. Por tanto, la combinación de péptidos se administra al lactante humano para inducir tolerancia oral a BLG.

15 La combinación de péptidos representa una ventaja frente a los péptidos previamente identificados (ver Tabla 1 péptidos a, b, c) de BLG (ver WO 0042863). Tras la exposición a BLG, los péptidos 2-5 regulan negativamente la expresión IgE en mayor medida (ver Figura 1) que los péptidos a, b y c previamente identificados (ver Figura 1).

20 La combinación de péptidos puede administrarse al lactante humano a una dosis de entre 0,4-50 μ mol/por kg de masa corporal/día, preferiblemente de 0,9-40 μ mol/por kg de masa corporal/día. La administración puede ser todos los días, o cada segundo día, o cada tercer día, o una vez a la semana durante un período de al menos dos semanas, preferiblemente al menos un mes, más preferiblemente por lo menos tres meses. La administración puede ser por más tiempo, por ejemplo hasta tres años.

25 Una administración "única" puede ser efectiva para inducir tolerancia oral a BLG en sujetos que aún no han sido expuestos a BLG.

30 Los péptidos se pueden administrar en una composición que comprende entre 25 y 250 μ g de péptido por gramo de composición, preferentemente entre 50-150 μ g de péptido por gramo de composición seca. Los péptidos se pueden añadir a una composición base que es una fórmula infantil de inicio, una fórmula infantil de seguimiento o una leche de crecimiento. La composición básica puede ser una composición "no alérgica" o hipoalérgica.

35 Los péptidos pueden administrarse en una composición que comprende otros ingredientes o prebióticos, seleccionados de inulina, fructooligosacárido (FOS), fructooligosacárido de cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacárido (GOS), xilooligosacárido (XOS), gangliósido, goma guar parcialmente hidrolizada, goma arábica, goma de soja o mezclas de los mismos.

40 Los péptidos se pueden administrar en una composición que comprende otros ingredientes o probióticos, seleccionados de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, y *Bifidobacterium breve*.

Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1: respuestas inmunitarias humores específicas de β -lactoglobulina (BLG) en ratones alimentados con β -lactoglobulina nativa (nBLG) o péptidos sintéticos y luego sensibilizados experimentalmente.

50 Los ratones se alimentaron por sonda con nBLG o péptidos sintéticos y luego se sensibilizaron experimentalmente con nBLG. Los anticuerpos IgE (A) específicos de BLG se cuantificaron en sueros individuales recolectados el día 30. Se indica la significación estadística entre los grupos especificados utilizando Kruskal-Wallis y la prueba posterior de comparación múltiple de Dunn (* $p < 0.05$, ** $0.01 < p < 0.001$, *** $p < 0.001$).

Descripción detallada

55 En la presente invención, el término "tolerancia" debe entenderse como un estado de falta de respuesta inmunológica específica. Tanto las vías humores (anticuerpos) como las mediadas por células (linfocitos, etc.) de la respuesta inmunitaria pueden ser suprimidas por la inducción de tolerancia. Se considera que un fallo en la tolerancia oral es la causa subyacente de la alergia.

60 El término "alérgeno" debe entenderse como una proteína o macropéptido capaz de iniciar reacciones alérgicas en mamíferos, particularmente en mamíferos jóvenes "en riesgo", incluidos bebés o lactantes. Se considera que los bebés pequeños están "en riesgo" de alergia a las proteínas cuando al menos uno de los padres o un hermano es atópico.

65 El término "péptidos tolerogénicos" debe entenderse como fragmentos proteicos, correspondientes a partes de la proteína nativa, con un tamaño de 200 a 6000 Da (3 a 50 aminoácidos), y preferiblemente entre 500 a 3000 Da, y más preferiblemente entre 500 y 1400 Da y siendo capaz de inducir tolerancia oral específica a proteínas nativas.

El término composición base "no alérgica" debe entenderse como una composición que tiene una fuente de

nitrógeno que contiene una composición de aminoácidos bien equilibrada. La "no alergenicidad" se define para las proteínas de la leche como una alergenicidad residual de las proteínas de suero individuales que no supere 1 ppm y como una alergenicidad residual de las caseínas totales que no supere 10ppm. El término "sensibilización" significa inducción/desarrollo de anticuerpos IgG1 y/o IgE específicos de alérgeno.

La presente invención se refiere a una combinación de péptidos, cada péptido tiene una longitud de aminoácidos de cinco a doce aminoácidos, comprendiendo la combinación un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 2, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 3, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 4, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 5, y un péptido que comprende la secuencia de a, donde la secuencia a es IDALNENK, para uso en la inducción de tolerancia oral a la β -lactoglobulina de vaca, oveja, búfala o cabra, en lactantes humanos.

Los péptidos de la presente invención tienen una longitud de aminoácidos de cinco a doce. Los péptidos, por lo tanto, tienen una longitud específica (5-12 aminoácidos).

Los péptidos más cortos que los pentámeros (cinco aminoácidos de longitud) pueden no proporcionar el efecto tolerogénico, mientras que se cree que los péptidos que tienen más de 12 aminoácidos tienen un mayor riesgo de alergenicidad.

Así, la combinación de péptidos comprende un péptido que comprende la secuencia KGLDIQK (Id. de Sec. nº 2), DAQSAPLR (Id. de Sec. nº 3), VEELKPTPE (Id. de Sec. nº 4), IIAEK (Id. de Sec. nº 5) e IDALNENK (Id. de Sec. nº a).

De manera similar, los péptidos que pueden proporcionar un efecto potenciado cuando se administran con la combinación de péptidos descrita anteriormente, son cualquier péptido que sea 5-mero, 6-mero, 7-mero, 8-mero, 9-mero, 10-mero, 11-mero o 12-mero, y comprenden cualquiera de las secuencias seleccionadas de b y c en la Tabla 1.

Así, la combinación de péptidos de la invención induce tolerancia oral a β -lactoglobulina de vaca, oveja, búfala o cabra, en lactantes humanos.

Preparación y caracterización de los péptidos

De acuerdo con una realización de la invención, los péptidos aislados pueden prepararse sintéticamente, de acuerdo con métodos estándar conocidos por el experto en la materia. Alternativamente, según otra forma de realización de la invención, pueden concentrarse, extraerse y/o ensilarse a partir de fuentes naturales como la leche (por ejemplo, leche bovina) o fracciones de leche que han sido preferiblemente modificadas, tratadas para, por ejemplo, producir o concentrar los péptidos. Hidrolizados de leche, en los que las proteínas de la leche han sido hidrolizadas por enzimas u otros medios, pueden generarse por métodos conocidos en la técnica. Los métodos para extraer, separar e identificar las fracciones peptídicas que contienen los péptidos de la invención, a partir de hidrolizados de leche también son conocidos por el experto en la materia. Los péptidos de la invención pueden generarse mediante estos métodos.

Por ejemplo, los péptidos de la invención se pueden producir utilizando un método descrito en el documento US 5039532A. El proceso de hidrólisis enzimática incluye una reacción de hidrólisis de dos pasos con un paso de desnaturalización por calor en el medio para garantizar que el hidrolizado final está sustancialmente libre de proteínas alergénicas intactas. Por ejemplo, la tripsina y la quimotripsina pueden usarse en estos métodos y pueden ser preparaciones producidas por extracción de páncreas porcino, o producidas por tecnología de ADN recombinante en bacterias.

Por ejemplo, la hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de los materiales de partida de suero que contienen proteínas de suero. Este material de partida puede ser un suero procedente de la fabricación de queso, en particular un suero dulce como el que resulta de la coagulación de la caseína por el cuajo, de un suero ácido de la coagulación de la caseína por un ácido, o fermentos acidificantes, o incluso un suero mixto resultante de la coagulación por un ácido y por cuajo. Este material de partida puede ser suero desmineralizado por intercambio iónico y/o por electrodiálisis. Este suero puede ser un concentrado de proteínas de suero más o menos libre de lactosa obtenida, por ejemplo, por ultrafiltración seguida opcionalmente por diálisis. El material de partida puede incluso ser una combinación de los materiales de partida mencionados anteriormente y lactosa. Puede estar en la forma de una solución acuosa verdadera o solución coloidal o en forma de polvo. En este último caso, el polvo se disuelve en agua preferentemente desmineralizada para formar una solución acuosa.

El material de partida se somete a hidrólisis enzimática de manera conocida utilizando enzimas proteolíticas mezcladas o purificadas, activas en los rangos básico y neutro, por ejemplo, tripsina, quimotripsina o pancreatina. La hidrólisis preliminar puede llevarse a cabo durante un tiempo relativamente corto, preferiblemente de 5 a 35 minutos, por ejemplo 10 minutos, utilizando una pequeña cantidad de enzima, por ejemplo 10% de la cantidad total utilizada para la hidrólisis. Esto permite economizar cantidades de enzima. En este caso, la hidrólisis es parcial. Esta hidrólisis puede llevarse a cabo en un reactor o, alternativamente, en un tubo

En los casos en que el sustrato a hidrolizar pueda tender a coagularse durante el tratamiento térmico, se puede añadir

un agente quelante al sustrato, como citrato de calcio o magnesio por ejemplo, como se indica, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 4.748.034. El hidrolizado se somete a un tratamiento térmico entre 80° y 100° C durante 3 a 10 minutos a un pH entre 6 y 8. El tiempo y la temperatura del tratamiento térmico están, por supuesto, interrelacionados, correspondiendo el límite inferior de temperatura al límite superior de tiempo y viceversa. En intercambiadores de calor industriales, una temperatura de aproximadamente 90° C y un tiempo de residencia del orden de 5 minutos se ha mostrado suficiente para desnaturalizar las proteínas minoritarias. Se ha encontrado, en efecto, que la desnaturalización de estas proteínas las hace accesibles a la posterior degradación enzimática. Es recomendable mencionar que el tratamiento térmico inactiva la enzima.

El hidrolizado luego se enfría a una temperatura de 40° a 60°C y preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 55°C, que es la temperatura óptima para la actividad hidrolítica. El valor del pH se ajusta preferentemente a aproximadamente 7.5 por adición de una solución acuosa de una base. Las condiciones de la segunda hidrólisis pueden variar. Por ejemplo, puede llevarse a cabo discontinuamente en lotes en un reactor de tanque controlado termostáticamente. Después de la adición de la enzima proteolítica seleccionada de tripsina, quimotripsina, pancreatina o una mezcla de tripsina y quimotripsina en solución acuosa, la hidrólisis se lleva a cabo durante 60 a 180 minutos.

De lo contrario, la segunda hidrólisis puede tener lugar de forma continua durante 1 a 60 minutos, y preferiblemente durante 2 a 20 minutos en un tubo que constituye el reactor de estado turbulento. En esta variante, el tubo, dependiendo de su longitud, proporciona el tiempo de reacción requerido según el caudal de producto a hidrolizar. En consecuencia, la enzima debe ser bombeada continuamente a la entrada del tubo de permanencia. El estado resultante de alta turbulencia produce contactos rápidos e intensos entre la enzima y el sustrato. Independientemente del modo empleado (por lotes o continuo) seleccionado para la segunda hidrólisis, el producto de hidrólisis se somete a un tratamiento térmico que inactiva la enzima. Este tratamiento de calor comprende precalentar el hidrolizado a una temperatura igual o superior a 75°C y mantenerlo a esa temperatura (preferiblemente entre 75° y 85°C) durante unos 5 minutos para promover la autodigestión de la enzima, este tratamiento ventajosamente se sigue de una esterilización, preferiblemente a temperatura ultra alta, por ejemplo de 125° a 135° C, durante 2 a 3 minutos por inyección de vapor o en un intercambiador de calor. A continuación, el hidrolizado se puede secar, por ejemplo, mediante secado por aspersión o por liofilización para diferentes aplicaciones, o incluso puede ser tratado posteriormente. En este último caso, la enzima puede ser inactivada durante el tratamiento posterior.

Identificación y caracterización de los péptidos

En un conjunto de experimentos detallados en el Ejemplo 1, los presentes inventores identificaron las secuencias peptídicas de BLG responsable de la inducción de tolerancia oral hacia las proteínas de la leche, en particular BLG. En un primer paso, usando un ensayo basado en células, se incubó la fórmula infantil parcialmente hidrolizada NAN HA™ (también conocida como BEBE HA™) de Nestlé, con células humanas que expresan el receptor de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), HLA-DR. Como primer paso en la inducción de tolerancia oral, el receptor HLA presenta secuencias peptídicas a las células T, induciendo así la tolerancia. Por tanto, el desarrollo de la tolerancia depende en gran medida del reconocimiento de la secuencia peptídica por parte del MHC.

Las regiones de unión a péptidos del MHC reconocen secuencias peptídicas o ensamblaje de péptidos compuestos por, en promedio, diez aminoácidos con un número mínimo de cinco. De hecho, estos pentapéptidos pueden incluirse en secuencias peptídicas (o incluso proteínas), ya que serán digeridas en el tracto gastrointestinal para dar lugar a este péptido de tamaño más pequeño de 5-18 aminoácidos. Esto explica, en parte, por qué los productos extensamente hidrolizados, compuestos de aminoácidos libres, los dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos no inducen tolerancia oral.

Por lo tanto, en la presente invención, las células humanas que expresan HLA-DR se cultivaron en presencia de la fórmula NAN-HA™ (que había sido verificada como no tóxica para las células), se aislaron los péptidos que se unían al receptor HLA por inmunoprecipitación, y luego se identificaron por espectrometría de masas y se secuenciaron los aminoácidos.

Los péptidos recién identificados son de BLG y se enumeran en la Tabla 1.

Id. de Sec. n°	Secuencia	Posición en la secuencia BLG
1	IVTQTM	18-23
2	KGLDIQK	24-29
3	DAQSAPR	49-56
4	VEELKPTPE	59-67
5	IIAEK	87-91
a	IDALNENK	100-107
b	VLDTDY	110-115
c	EVDDEALEK	143-151

Los péptidos a, IDALNENK, b, VLDTDY y c EVDDEALEK también se identificaron mediante este método. Estos

péptidos se identificaron previamente en el documento WO 20042863 como inductores de la tolerancia oral. Los péptidos se identificaron como parte de una secuencia peptídica más larga en el último documento. Por lo tanto, estos péptidos conocidos actúan como un control positivo en el experimento actual.

5 La naturaleza tolerogénica de los péptidos evidenciada in vivo

La capacidad de estas secuencias peptídicas para inducir tolerancia oral in vivo se evaluó adicionalmente en un modelo de ratón experimental de sensibilización a BLG (ver Ejemplo 2 y Figura 1).

10 Este modelo animal se ha utilizado previamente para demostrar la eficacia de la BLG nativa en la inducción de tolerancia en sonda [Patient, Ket et al, (2011). Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine β -lactoglobulin. Allergy, 66 (10), 1312-1321]. Curiosamente, en este último artículo se demostró que BLG que había sido sometido a hidrólisis de tripsina no indujo tolerancia oral.

15 El modelo de ratón se usó para medir la inducción de tolerancia oral para BLG nativo de longitud completa y dos péptidos sintéticos de BLG, correspondientes a las secuencias (84-106) y (25-107) de BLG bovina. Los ratones fueron alimentados con BLG nativos o péptido sintético (84-106) o (25-107) por sonda los días 1, 2, 3, 8, 9 y 10. Luego se sensibilizaron por administración ip con BLG nativo el día 14. Los niveles de IgE en suero se midieron entre los días 30 y 33.

20 La figura 1 demuestra que la sonda con BLG nativo induce una tolerancia eficiente, evitando una mayor inducción de la producción de IgE específica de BLG tras la sensibilización con BLG. El péptido (25-107) que contiene las secuencias 2, 3, 4, 5 de la invención, así como el péptido a previamente conocido, conduce a una reducción en los niveles de IgE en suero en comparación con el control (PBS) ($p=0,04$). El péptido (84-106), que comprende las secuencias 5, a, b y c, muestra una tendencia hacia un menor nivel de IgE en comparación con PBS.

25 Los inventores concluyen que los péptidos 1-5, que se derivaron de la secuencia (25-107), son más efectivos en la inducción de tolerancia oral en este modelo de ratón que los (a, b y c) derivados de la secuencia (84-106). Estas secuencias peptídicas mas largas (25-107) y (84-106), una vez alimentadas por sonda en los ratones, son procesadas naturalmente por las enzimas pancreáticas y proteasas que conducen así a la producción de péptidos más pequeños, incluidas las secuencias Id. de Sec. n° 1-5 y secuencias a, b y c.

30 El experimento demuestra que los péptidos 1-5 recién identificados son reconocidos por HLA-DR y se unen a él. Estos péptidos luego pueden presentarse a las células T. Este proceso permite la inducción de tolerancia oral a la proteína alergénica que contiene estas secuencias, es decir, BLG. La combinación de péptidos de acuerdo con la presente invención, ha sido seleccionados por su capacidad para inducir tolerancia oral.

35 Se especula que el efecto tolerogénico producido por los péptidos se intensifica cuando se administran en combinación con uno o más péptidos elegidos de los péptidos conocidos a, b y c en la Tabla 1. Se espera que esta combinación proporcione un efecto mejorado en la inducción de tolerancia oral a BLG, en relación con el efecto inducido por cualquier grupo de péptidos a, b, c o 1-5, tomados solos.

40 Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la descripción, la combinación de péptidos se administra en combinación con los péptidos b y c.

45 Las secuencias Id. de Sec. n° 1-5 se han identificado como altamente conservadas (100% de identidad de secuencia) en BLG en las siguientes especies: vaca, búfalo, cabra doméstica, oveja y muflón. Por lo tanto, se cree que cualquiera de estas fuentes de leche que contiene estas secuencias puede inducir tolerancia oral a la leche bovina y viceversa. Así, los inventores postulan que los péptidos identificados por los inventores pueden inducir tolerancia oral a BLG de cualquiera de estas fuentes. En muchos países, la leche de cabra y oveja se consume como alternativa o además de la leche de vaca. Hay fórmulas infantiles en el mercado que utilizan suero de leche de cabra como fuente de proteína. Por lo tanto, la aplicación de los presentes hallazgos a la leche de especies que no sea vaca puede ser de interés.

50 De acuerdo con una realización de la invención, la combinación de péptidos se administra en una cantidad suficiente para inducir tolerancia oral, preferiblemente tolerancia oral completa al BLG bovino. El BLG también puede ser de oveja o cabra. Se considera que la tolerancia oral completa significa que no se observa ninguna reacción alérgica después de un DBPCFC (provocación alimentaria controlada doble ciego con placebo) realizada con leche de vaca, en particular BLG bovina.

55 De acuerdo con una realización de la invención, los péptidos pueden estar presentes en una cantidad de 0,01% a 5%, y preferiblemente del 0,1% al 0,5% de la proteína total.

60 La combinación de péptidos se puede administrar por vía oral directamente al bebé humano solo (puro o diluido en agua o leche materna, por ejemplo) o como una composición que es una fórmula láctea infantil o un complemento alimenticio, por ejemplo, un fortificante de la leche humana. También puede administrarse en cualquier soporte lácteo utilizado durante la alimentación trófica, fórmulas infantiles no lácteas, un cereal o yogur para bebés, un pudín de

queso para bebés, una bebida láctea o de frutas, un batido, un bocadillo o una galleta u otro artículo de panadería. La combinación de péptidos puede administrarse a adultos en forma de bebida, alimento o suplemento alimenticio. También se puede administrar en alimentos y bebidas para mascotas, como cualquier alimento seco o croquetas, en forma de alimentos húmedos o enlatados, o suplemento.

Los péptidos sintéticos y/o los péptidos concentrados por medios artificiales pueden ser parte de la fórmula infantil hecha por el hombre, fórmula infantil hidrolizada artificial (parcial o ampliamente), o composiciones nutricionales artificiales en general.

Tales composiciones se pueden usar en la dosis indicada como una solución nutritiva o medicamento para inducir tolerancia, especialmente a las proteínas de la leche. Tales composiciones pueden administrarse a lactantes o subpoblaciones de lactantes que presentan síntomas o son susceptibles de alergias. Tal inducción de tolerancia oral puede inducir el alivio de las alergias a medio plazo (durante el tratamiento o dentro de 1, 6, 12 o 18 meses después del tratamiento). Alternativamente o adicionalmente, la tolerancia oral puede inducirse con un efecto positivo más adelante en la vida (por ejemplo, 24, 36, 48, 72 meses después del tratamiento), especialmente cuando el sistema inmunológico ha madurado.

Dosis

De acuerdo con una realización de la invención, la dosis de péptidos está en el rango de 0,4-50 μmol /por kg de masa corporal/día, preferiblemente de 0,9-40 μmol /por kg de masa corporal/día. Por ejemplo, si los péptidos se administran como parte de una fórmula infantil, los péptidos pueden estar presentes en la fórmula a una concentración de 50-150 $\mu\text{g/g}$ de polvo. Una dosis típica de fórmula infantil para un bebé de cinco meses sería de tres biberones por día de siete cucharadas de polvo cada uno, y para un bebé de seis meses o más, dos biberones por día de siete cucharadas cada uno. Las dosis se basan en el peso medio de un bebé de seis meses que es de unos 8 kg, y de uno de doce meses que es de unos 9,5 kilos.

Período de administración

El periodo de administración de los péptidos de la invención puede ser continuo o discontinuo. La administración continua se prefiere para un efecto más sostenido. Sin embargo, se especula que un patrón discontinuo (por ejemplo, administración diaria durante una semana al mes, o durante semanas alternas) puede inducir efectos positivos en los mamíferos jóvenes o adultos.

De acuerdo con una realización de la invención, en bebés humanos que aún no han estado expuestos a BLG ("sujetos naive") se especula que una "dosis única" de la combinación de péptidos de la invención puede ser suficiente para inducir tolerancia oral a BLG. De manera más general, se recomienda una duración mayor, por ejemplo, la administración diaria durante una a tres semanas.

En bebés humanos que ya han estado expuestos a BLG, se prefiere un período de administración más prolongado. En general, aunque se esperan efectos positivos con una duración de la administración relativamente corta (por ejemplo, la administración diaria durante una a cuatro semanas), se cree que las duraciones más largas proporcionan un efecto mejorado (por ejemplo, una duración de tres a seis meses en humanos, y periodos correspondientes en otros mamíferos).

Preferiblemente, la administración es por toma diaria (a tomar una o dos veces al día), o por toma semanal (a tomar una, dos, tres o cuatro veces por semana).

Administración con otros compuestos

Los péptidos se pueden administrar solos (puros o diluidos en, por ejemplo, agua o leche, incluida la leche materna humana) o en una mezcla con otros compuestos (como suplementos dietéticos, suplementos nutricionales, medicamentos, transportadores, saborizantes, ingredientes digeribles o no digeribles).

Los péptidos se pueden administrar a un bebé pequeño, como parte de una composición que es un fortificante de la leche humana, u otro suplemento nutricional. Los péptidos también pueden administrarse en una composición farmacéutica.

De acuerdo con una realización de la invención, los péptidos pueden agregarse o estar comprendidos en una composición base que es una composición hipoalérgica destinada a mamíferos, particularmente humanos y mascotas. Así, la fórmula base a la que se añaden los péptidos, o en la que pueden estar contenidos los péptidos, puede ser una fórmula hipoalérgica (HA) en la que las proteínas de la leche están parcialmente hidrolizadas, o una fórmula hipoalérgica en la que las proteínas de la leche están extensamente hidrolizadas o son reemplazadas por aminoácidos libres, o un sustituto de la leche de vaca, como a base de soja. Puede que por ejemplo, una fórmula infantil, una fórmula de seguimiento o una composición nutricional para niños con condiciones fisiológicas/patológicas particulares.

En una realización, la fórmula base es una fórmula infantil elemental y la fórmula base no comprende péptidos o proteínas, sino sólo aminoácidos. En una realización, las proteínas de la fórmula base se originan, en parte o en su totalidad, a partir de suero de leche dulce del que se han eliminado las cGMP. Se hace referencia a ese respecto en EP880902 por el cual un proceso permite la eliminación de la práctica totalidad del caseino-glico-macropéptido (fracción rica en treonina y pobre en triptófano) del suero bovino aumentando así la proporción de alfa-lactoalbúmina (fracción muy rica en triptófano). Combinando esta fracción de suero dulce modificado con leche desnatada, y añadiendo algo de L-histidina y L-arginina libres (para alcanzar las cantidades mínimas de estos aminoácidos exigidas por la Directiva CE), la formulación de acuerdo con la invención tiene un perfil de aminoácidos mucho más cercano al de la leche humana, caracterizado en particular por niveles comparables de triptófano y treonina, lo que permite adaptar su contenido proteico al humano.

Cuando se administra junto con el perfil proteico optimizado descrito anteriormente, se entiende que los péptidos pueden actuar sinérgicamente con la proteína optimizada para proporcionar tanto la inducción de la tolerancia oral como proporcionar el valor nutricional proteico optimizado (que puede potenciar el efecto de los péptidos satisfaciendo las necesidades proteicas de la forma más adecuada de manera cuantitativa).

Cuando se administra con aminoácidos elementales, se entiende que el efecto de los péptidos no se enmascara o inhibe por la presencia de proteínas potencialmente inductoras de alergia.

Los péptidos pueden administrarse, por ejemplo, como parte de una fórmula infantil a una concentración de 50-150 µg/g polvo.

La composición base hipoalérgica a la que se añaden los péptidos puede contener como fuente de nitrógeno, péptidos o aminoácidos libres y, en particular, a partir de proteínas de la leche, de vaca, cabra u oveja, como las proteínas del suero, alfa-lactoalbúmina, β-lactoglobulina, albúmina de suero bovino, ácido de caseína, caseinatos o alfa, beta, kappa-caseína, por ejemplo. La fuente de nitrógeno puede proporcionar al menos del 7 al 25 % de la energía total.

Las vitaminas y los minerales son ejemplos de suplementos dietéticos típicos. En una realización preferida, la composición se administra junto con otros compuestos que potencian el efecto descrito sobre la inmunidad del mamífero joven o adulto alérgico. Dichos compuestos pueden ser otros compuestos activos que influyan sinérgicamente o por separado la respuesta del sistema inmunitario del lactante y/o potenciar el efecto de los péptidos, como probióticos y prebióticos.

Los ejemplos de compuestos probióticos conocidos son *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus thermophilus*, *E. Faecium*, *E. Coli Nissle*. En particular, los probióticos y los probióticos no replicantes, como el género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o una combinación de los mismos, por ejemplo, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* o una combinación de los mismos, y aplicaciones de estas bacterias.

Los ejemplos de compuestos prebióticos conocidos son compuestos de carbohidratos seleccionados del grupo que consiste en inulina, fructooligosacárido (FOS), fructooligosacárido de cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacárido (GOS), xilooligosacárido (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG), goma arábiga, goma de soja o mezclas de los mismos. Pueden estar presentes otros carbohidratos, como un segundo carbohidrato que actúa en sinergia con el primer carbohidrato. y que se selecciona del grupo que consiste en goma de xilooligosacárido (XOS), goma arábiga, almidón, parcialmente hidrolizado goma guar o mezclas de las mismas. El carbohidrato o carbohidratos pueden estar presentes en aproximadamente 1 g a 20 g o 1% a 80% o 20% a 60% en las dosis diarias de la composición. Alternativamente, los carbohidratos están presentes del 10% al 80% de la composición seca.

En una realización, la fórmula base o la composición nutricional final comprende una mezcla de oligosacáridos según WO2007/090894 (enseñanza general y específicamente ejemplo 1). Puede ser utilizado en particular en combinación con GOS. La fórmula base puede proporcionar una mezcla de oligosacáridos que comprende 5-70% en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado del grupo que comprende GalNAcα1,3Galβ1,4Glc y Galβ1,6GalNAcα1,3Galβ1,4Glc, 20-90% en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado del grupo que comprende Galβ1,6Gal, Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Glc, Galβ1,3Galβ1,3Glc, Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc y Galβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Glc y 5-50% en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado del grupo que comprende NeuAcα2,3Galβ1,4Glc y NeuAcα2,6Galβ1,4Glc.

En una realización, la mezcla (de la fórmula base o de la composición nutricional final) comprende 10-70% en peso de los oligosacáridos N-acetilados especificados, 20-80 % en peso de los oligosacáridos neutros especificados y 10-50% en peso de los oligosacáridos sialilados especificados. Más preferiblemente, la mezcla comprende 15-40% en peso de oligosacárido(s) N-acetilado, 40-60% en peso de los otros oligosacáridos neutros y 15-30% en peso de los oligosacáridos sialilados. Una mezcla particularmente preferida es 30 % en peso de los oligosacáridos N-acetilados,

50 % en peso de los oligosacáridos neutros y 20% en peso de los oligosacáridos sialilados.

Alternativamente, la mezcla puede comprender convenientemente 5-20% en peso de los oligosacáridos N-acetilados especificados, 60-90 % en peso de los oligosacáridos neutros especificados y 5-30 % en peso de los oligosacáridos sialilados especificados.

La mezcla de oligosacáridos se puede preparar a partir de una o más leches animales. La leche puede obtenerse de cualquier mamífero, en particular de vacas, cabras, búfalas, yeguas, elefantas, camellas u ovejas.

Alternativamente, la mezcla de oligosacáridos se puede preparar comprando y mezclando los componentes individuales. Por ejemplo, los galacto-oligosacáridos sintetizados como Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y mezclas de los mismos están disponibles comercialmente bajo las marcas registradas Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente, pueden usarse glicosiltransferasas específicas, tales como galactosiltransferasas, para producir oligosacáridos neutros.

Los oligosacáridos N-acetilados pueden prepararse por acción de glucosaminidasa y/o galactosaminidas. sobre N-acetil-glucosa y/o N-acetil galactosa. Igualmente, pueden utilizarse para este fin N-acetil-galactosiltransferasas y/o N-acetil-glicosiltransferasas. Los oligosacáridos N-acetilados también se pueden producir mediante tecnología de fermentación usando las enzimas correspondientes (recombinantes o naturales) y/o fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden modificarse para producir los correspondientes sustratos y enzimas. Se pueden utilizar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos N-acetilados puede ser iniciada por sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (GP) desde GP=1 en adelante. Otra opción es la conversión química de ceto-hexosas (p. ej., fructosa) libres o unidas a un oligosacárido (p. ej., lactulosa) en N-acetilhexosamina o un oligosacárido que contiene N-acetilhexosamina como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A. E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38:827-828.

Los oligosacáridos sialilados 3'sialil-lactosa y 6'sialil-lactosa se pueden aislar por cromatografía o tecnología de filtración de una fuente natural como la leche animal. Alternativamente, también pueden ser producidos por biotecnología usando sialiltransferasas específicas ya sea por tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas recombinantes o naturales) o por tecnología de fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o puede modificarse para producir los sustratos y enzimas correspondientes. Se pueden utilizar los cultivos microbianos individuales o los cultivos mixtos. La formación de sialil-oligosacáridos puede iniciarse mediante sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (GP) desde GP=1 en adelante.

En un aspecto preferido de la invención, las mezclas de oligosacáridos descritas anteriormente se incorporan en un producto alimenticio. En el contexto de la presente invención, el término "producto alimenticio" pretende abarcar cualquier materia consumible. Por tanto, puede tratarse de un producto destinado al consumo humano, en particular preparados para lactantes, fórmulas de continuación, alimentos para bebés tales como cereales infantiles y similares. En particular, las mezclas de oligosacáridos de la invención se pueden incorporar en fórmulas infantiles, leche deshidratada o mezclas de cereales.

Los oligosacáridos descritos anteriormente presentan el efecto ventajoso de potenciar las condiciones inmunitarias (regulación al alza o a la baja) del sujeto de manera que lo hace más receptivo a la inducción de tolerancia oral inducida por péptidos. Ese impulso puede dirigirse sobre el sistema inmunitario o las vías de inflamación o puede ser mediado por probióticos intestinales que son promovidos selectivamente por los oligosacáridos.

Se pueden incluir en la composición uno o más ácidos grasos esenciales de cadena larga (LC-PUFA). Ejemplos de los LC-PUFA que se pueden agregar son ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA). Los LC-PUFA pueden añadirse en concentraciones tales que constituyan más del 0,01% de los ácidos grasos presentes en la composición. Si se desea, se pueden incluir uno o más emulsionantes de calidad alimentaria en la composición nutricional; por ejemplo ésteres de ácido diacetiltartárico de mono y diglicéridos, lecitina y mono o diglicéridos o una mezcla de los mismos. Similarmente se pueden incluir sales y/o estabilizadores adecuados. Se pueden añadir aromatizantes a la composición.

Los péptidos pueden incorporarse o estar presentes en una composición que es una "fórmula para bebés prematuros" para lactantes nacidos antes de término o con bajo peso al nacer, una "fórmula de inicio" o una "fórmula de continuación". Un ejemplo de tal fórmula de inicio se da en el ejemplo 3.

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de péptidos capaces de inducir tolerancia oral a BLG

Cultivo de células

Para evaluar la expresión del receptor MHC en dos células monocíticas humanas diferentes (U937 y Thp1), las células

se tiñeron con APC conjugado anti HLA-DR (Santa Cruz Biotechnologies, clon L243) durante 30 min en hielo, lavado dos veces con PBS 1X frío (Sigma) complementado con 0,5% de FCS (Amimed, Bioconcept), luego analizado en un analizador de flujo BD Fortessa (BD).

Para evaluar la toxicidad de la fórmula infantil BEBA-HA en líneas celulares U937 y Thp1, las células se incubaron con varias concentraciones de producto BEBA-HA que oscilan entre 10 mg y 1 ng reconstituido en medio RPMI1640 completo. Las células se incubaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en placas de 24 pocillos durante 24 h a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂. Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS 1X suplementado con 0,5% de FCS, luego se tiñeron con Kit de detección Apoptosis I PE Anexina V (BD Pharmingen). Finalmente, las células se analizaron por citometría de flujo en un BD Fortessa (BD). Los resultados demostraron que BEBA-HA no era tóxico para las células a las dosis utilizadas en los experimentos.

Las células Thp1 y U937 se incubaron en 20 ml de medio RPMI-1640 con L-glutamina (Sigma) suplementado con 10% de FCS inactivado por calor (Amimed, Bioconcept) y penicilina/estreptomicina (Sigma) a una concentración de 1×10^6 células/mL en un T175 cm² (Falcon) con 1µg/mL y 100µg/mL respectivamente de BEBA-HA (Nestle, Lot# L02680742AP) para un período de 24 horas a 37°C en presencia de 5 % de CO₂. Las células se centrifugaron y se recolectaron para realizar la inmunoprecipitación de complejos MHC-péptido.

Lisado de proteínas e inmunoprecipitación

Brevemente, para cada condición probada (control sin BEBA-HA, muestra con BEBA-HA para ambas líneas celulares), 2×10^7 células se resuspendieron en TBS enfriado con hielo y se lavaron tres veces. Luego, el sedimento celular se resuspendió en tampón de lisis que contiene 1% de CHAPS e inhibidores de proteinasa. Después de la lisis, el sobrenadante se recogió y se mezcló con perlas de anticuerpo PAS que se prepararon previamente incubando 60 µl de perlas de PAS con 50 µg de anticuerpo monoclonal MHC II específico para moléculas HLA-DR (Clon L243). El lisado y las perlas Ab se incubaron durante la noche a 4 °C con rotación suave. Después de la captura por afinidad, las perlas se centrifugaron y el sobrenadante se descartó. Se realizaron varios lavados con respectivamente: 1 x 1 ml de tampón CHAPS al 1 %, 1 x 1 ml de Tris 20 mM/NaCl 150 mM, 1 x 1 ml de Tris 20 mM pH 8,0. Después del lavado, se añadieron 200 µl de solución de ácido acético al 10 % a las perlas, se agitaron suavemente y se incubaron durante 15 min a 70 °C. Las cuentas se centrifugaron 5 min a 14000 g. Este paso se repitió una vez. Ambos sobrenadantes se agruparon y filtraron usando un corte de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore). Tanto el retenido (que contiene principalmente anticuerpos HLA-DR y moléculas HLA-DR) y el filtrado (que contenía los péptidos presentados por HLA-DR) se mantuvieron a 20 °C para análisis mediante CL-EM/EM adicionales.

Análisis de EM

Antes del análisis de EM, los péptidos HLA-DR se desalinizaron utilizando C18 de fase inversa (grupo The Nest, EE. UU.) o columnas de desalinización OASIS (Waters, EE. UU.) de modo mixto, como se describe en el manual del fabricante. Después de la desalación, los péptidos se analizaron mediante nano-CL-EMEM utilizando una columna Magic C18 casera (150 3 0,075 mm) para la separación de péptidos (2-35 % de acetronitrilo/0,1 % de ácido formico en 30 minutos) acoplada a un instrumento Orbitrap XL. Se seleccionaron péptidos para la fragmentación utilizando la adquisición dependiente de datos de los cinco iones principales por cada escaneo completo. Se activó la exclusión dinámica con una duración de exclusión de 30 segundos. La fragmentación se realizó utilizando disociación inducida por colisión (CID) a un 35% de energía de colisión. Los péptidos fueron finalmente identificados por búsqueda en la base de datos Sequest contra una base de datos de leche bovina y validados manualmente en función de la calidad del espectro y la puntuación.

Ejemplo 2: respuestas inmunitarias humorales específicas de BLG en ratones alimentados con nBLG o péptidos sintéticos y luego sensibilizados experimentalmente

Ratones

Se alojaron ratones BALB/cJ libres de patógenos específicos (SPF) (hembras de 3 a 4 semanas de edad, Centre d'Elevage René Janvier, LeGenest Saint-Isle, Francia) en jaulas filtradas en condiciones normales de cría SPF (lecho esterilizado en autoclave y agua estéril) y se aclimataron durante dos semanas antes de los experimentos. Se mantuvieron con una dieta privada de proteína animal, y en los que no se detectó BLG mediante inmunoensayos sándwich específicos. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las normas de la Comunidad Europea de cuidado de los animales, y con la autorización 91-368 de los Servicios Veterinarios Franceses. Todos los experimentos estuvieron amparados por el acuerdo No. 2009-DDSV-074 (29 de octubre de 2009) del Departamento de Inspección Veterinaria de Essonne (Francia).

Efecto de la administración de BLG y péptidos sintéticos

A grupos de 6 o 7 ratones se les administró 4 mg de BLG bovina nativa o una cantidad equivalente (es decir, 0,22 µmol) de péptidos BLG sintéticos aislados. Se administraron 0,6 mg de péptido sintético (84-106), correspondiente a

los números de secuencia bovinos BLG 84-106 (PM 2731 Da), o bien 2 mg de péptido sintético (25-107) correspondiente a los números de secuencia bovinos 25-107 (PM 9440 Da) (n=7/grupo). Nueve ratones de control recibieron PBS. Los péptidos sintéticos (25-107) y (84-106) se diluyeron en PBS. Las administraciones se realizaron los días 1, 2, 3, 8, 9 y 10 mediante sonda intragástrica utilizando una aguja de alimentación animal (Popper & sons, NY). Los ratones de control recibieron PBS (ratones control negativo, n=16). A continuación, todos los ratones se sensibilizaron el día 14 mediante administración i.p. de 5 µg de BLG bovina nativa adsorbida sobre alumbre (Alhydrogel 3%, Superfos, Dinamarca, 1 mg/ratón).

La eficacia de la sensibilización de ratones se evaluó mediante mediciones cuantitativas de anticuerpos IgE específicos de BLG en muestras de suero individuales recolectadas del plexo venoso retroorbitario de ratones bajo anestesia ligera (Isoflurano, Baxter) entre los días 30-33. La unión no específica se determinó utilizando sueros individuales de 10 ratones naïve y se dedujo de los valores de absorbancia medidos con sueros inmunes.

El análisis estadístico utilizando un test t no pareado con corrección de Welch reveló una diferencia significativa para las concentraciones de anticuerpos IgE específicos de BLG entre los ratones que recibieron el péptido (25-107) y el grupo PBS (p = 0,04) (ver Figura 1).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). La distribución de normalidad se examinó por primera vez utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk antes del análisis de la significación estadística con ANOVA unidireccional y post-test de comparación múltiple de Tukey. Cuando los datos no estaban distribuidos normalmente, se realizó una prueba no paramétrica, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de comparación múltiple de Dunn (DMCT). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. La comparación de dos grupos específicos se realizó utilizando el test t no pareado con la corrección de Welch en datos transformados logarítmicamente que permite obtener una varianza comparable.

Ejemplo 3:

A continuación, se proporciona un ejemplo de la composición de una fórmula infantil para su uso de acuerdo con la presente invención. Esta composición se proporciona únicamente a modo de ilustración.

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía	100	670
Proteína parcialmente hidrolizada, incluidos los péptidos 1-5	1,83	12,3
Grasa	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Prebiótico (100% GOS) (g)	0,64	4,3
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Manganeso (µg)	8	50
Se (µg)	2	13
Vitamina A (µg RE)	105	700
Vitamina D (µg)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (µg)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (µg)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15

(continuación)

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Colina (µg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
Lactobacillus GG	2 x 10 ⁷ ufc/g de polvo	

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de péptidos, teniendo cada péptido una longitud de aminoácidos de cinco a doce aminoácidos, comprendiendo la combinación un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 2, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 3, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 4, un péptido que comprende la secuencia de Id. de Sec. nº 5, y un péptido que comprende la secuencia de a, donde la secuencia a es IDALNENK, para usar en la inducción de tolerancia oral a β -lactoglobulina de vaca, oveja, búfala o cabra, en un bebé humano.
2. La combinación de péptidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la combinación comprende además un péptido que comprende la secuencia b y/o un péptido que comprende la secuencia c, donde la secuencia b es VLDTDY y la secuencia c es EVDDALEK.
3. La combinación de péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde los péptidos son de origen lácteo, y en particular, de β -lactoglobulina.
4. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que está presente como (i) fracciones peptídicas aisladas de la hidrólisis de material proteico que contiene la proteína alergénica, en particular β -lactoglobulina, y/o (ii) péptidos preparados sintéticamente.
5. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha combinación de péptidos regula a la baja la expresión de IgE en el mamífero tras una sensibilización previa, concomitante o posterior de β -lactoglobulina.
6. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha combinación de péptidos se administra a una dosis de entre 0,4-50 $\mu\text{mol/kg}$ de masa corporal/día, preferiblemente de 0,9-40 $\mu\text{mol/kg}$ de masa corporal/día.
7. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde se administra a lactantes o niños con riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca.
8. La combinación de dichos péptidos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se administra, en su forma pura o diluida en agua o leche materna humana, o añadida o contenida en una composición que sea un suplemento, un fortificante de leche humana o una fórmula infantil.
9. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la composición es una composición hipoalergénica.
10. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en la que la combinación de péptidos se administra en una composición que comprende entre 25-250 μg de péptido por gramo de composición seca, preferiblemente entre 50-150 μg de péptido por gramo de composición seca.
11. La combinación de péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dicha composición comprende otros ingredientes o prebióticos seleccionados de inulina, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galacto-oligosacárido (GOS), xilooligosacárido (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada, goma arábica, goma de soja o mezclas de las mismas.
12. La combinación de dichos péptidos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que dicha composición comprende otros ingredientes o probióticos seleccionados de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium breve*.

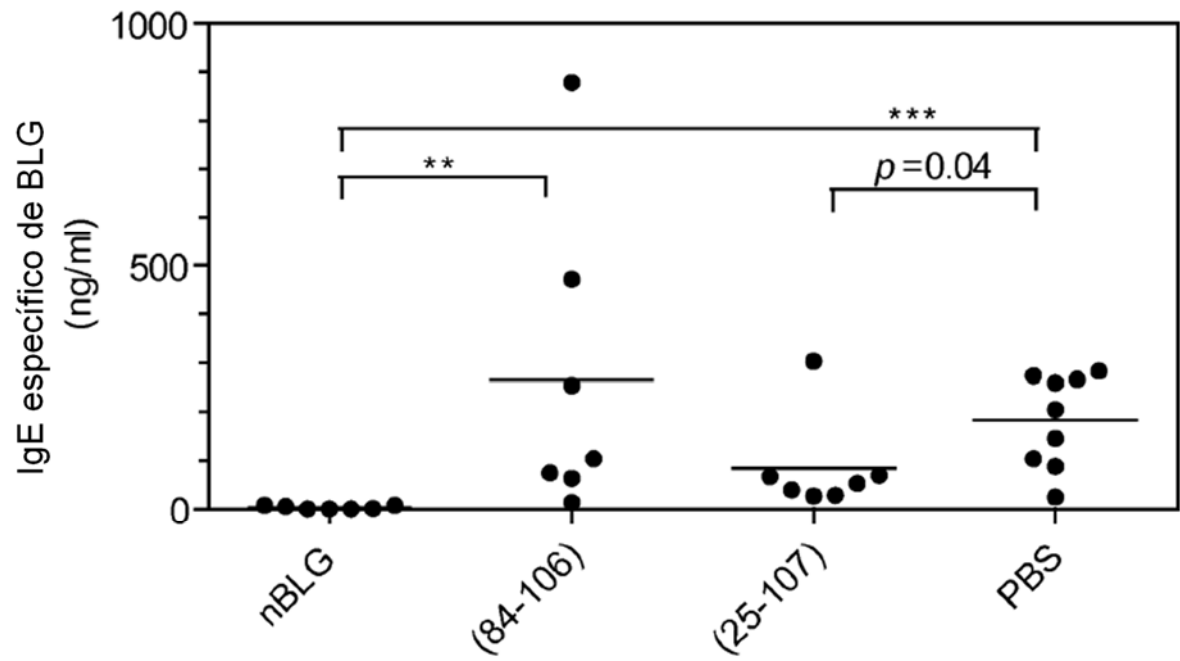


Fig. 1