

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 831**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A23L 33/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016 PCT/EP2016/063341**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16732518 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3307090**

54 Título: **Combinacion de peptidos tolerogenos con TFG-â para inducir y mantener la tolerancia oral en mamiferos jóvenes**

30 Prioridad:

**12.06.2015 EP 15171942**

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

**24.02.2021**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)  
Entre-deux-Villes  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**NUTTEN, SOPHIE HÉLÈNE;  
DE GROOT, NANDA y  
VERHASSELT, VALÉRIE FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 807 831 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

Combinación de péptidos tolerógenos con TGF- $\beta$  para inducir y mantener la tolerancia oral en mamíferos jóvenes

5 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere a la administración de una combinación de TGF- $\beta$  con uno o más péptidos que contienen secuencias específicas de  $\beta$ -lactoglobulina. Los péptidos son hipoalergénicos pero conservan la capacidad de inducir tolerancia a la proteína natural. La combinación de TGF- $\beta$  con uno o más de estos péptidos tiene el efecto terapéutico de inducir y mantener la tolerancia oral hacia las proteínas recién introducidas, sobre todo en el periodo de destete. La combinación puede modular la respuesta inmunitaria de los bebés y niños pequeños a los alérgenos.

**Antecedentes de la presente invención**

15 La primera alergia alimentaria que suele aparecer en la vida es la alergia a la leche de vaca, provocada en la mayoría de los casos por una reacción a las proteínas de los alimentos. En los primeros años de la vida el sistema inmunitario aún se está desarrollando y puede carecer de tolerancia a los antígenos dietéticos (lo cual también puede describirse como inducción insuficiente de tolerancia oral). El resultado es que el bebé, niño o animal joven tiene una respuesta inmunitaria exagerada a la proteína de la dieta y desarrolla una reacción alérgica a la misma. Las alergias alimentarias pueden afectar no solo a los humanos, sino también a otros mamíferos, como los perros y gatos.

En general la hipersensibilidad alimentaria se desarrolla justo después de que un bebé, niño o animal joven susceptible se encuentre por primera vez con un nuevo alimento que contenga alérgenos potenciales. Además de las existentes en la leche de su madre (que puede contener proteínas alimenticias de la dieta de la madre), las primeras proteínas dietéticas que suele encontrar, al menos los bebés humanos, son las proteínas de la leche de vaca. La alergia a la leche de vaca (ALV) es la alergia alimentaria más frecuente en los bebés humanos y afecta aproximadamente al 2,5% de todos los bebés (Sicherer SH y otros (2010), Food allergy [*Alergia alimentaria*], 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 de edad. Como tal, la ALV afecta con una prevalencia más baja a otros grupos de edad.

En general se admite que los bebés con una alergia arraigada a la leche de vaca tienen mayor riesgo de desarrollar alergias a otras proteínas de la dieta, como las proteínas de huevo y cereales. Estas alergias se pueden manifestar clínicamente en forma de enfermedades atópicas como dermatitis atópica, eccema y asma. Incluso aquellos bebés que han desarrollado exitosamente tolerancia oral a las proteínas de la leche de vaca pueden desarrollar alergias a otras proteínas dietéticas, como las proteínas de huevo y cereales, cuando se introducen en la dieta al destete.

Además de la lactancia materna, la recomendación principal para evitar la ALV es el uso de fórmulas hipoalergénicas parcialmente hidrolizadas, cuya prescripción está indicada para lactantes asintomáticos "en riesgo" por tener padres atópicos. Se ha demostrado que esta actuación es eficaz para prevenir la sensibilización por las proteínas hidrolizadas (péptidos) y los restos de proteínas naturales (de longitud completa) presentes en las fórmulas (aunque en proporción mucho menor que en una fórmula no hidrolizada).

Así, la solicitud de patente europea EP 2 332 428 revela una formulación que contiene un hidrolizado constituido por péptidos de leche de vaca capaces de inducir tolerancia oral. Dichos péptidos se identificaron como procedentes de caseína bovina.

Actualmente hay en el mercado muchos ejemplos de fórmulas hipoalergénicas parcialmente hidrolizadas, a base de caseína o suero de leche (como p.ej. NAN®-HA, BEBA®-HA, de Nestlé, y S26®-HA de Wyeth Infant Nutrition).

50 Para bebés que ya tienen síntomas de ALV, las fórmulas extensamente hidrolizadas (como p.ej. Alfare™, Altera™ de Nestlé) y las fórmulas no alergénicas sustitutivas de la leche, como las basadas en aminoácidos libres (p.ej. Alfamino™ de Nestlé) o en soja (tales como S26®-Soya, NURSOY™ de Wyeth Infant Nutrition, Nueva York y NESTLÉ® Good Start® ALSOY® de Nestlé), pueden ser alternativas adecuadas a las fórmulas estándar o parcialmente hidrolizadas de leche de vaca.

Por lo tanto, el enfoque principal hasta la fecha para proporcionar nutrición a los niños con alergias a la leche de vaca ha consistido en buscar preparaciones que no indujeran una respuesta alérgica, es decir, en preparar formulaciones no alergénicas. Uno de los inconvenientes de la administración de fórmulas no alergénicas (que llevan aminoácidos libres o proteínas de leche de vaca extensamente hidrolizadas) o de leche de soja es que, si bien estas formulaciones pueden evitar que los bebés alérgicos a la leche de vaca tengan una respuesta alérgica, no permiten que esos niños desarrollen una tolerancia oral a los alérgenos proteicos de la leche de vaca, a fin de poder tomar productos lácteos inalterados más adelante en la vida.

La tolerancia oral es la supresión específica de la reactividad inmunitaria 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. La falta de tolerancia oral

conduce a la alergia. El desarrollo de la tolerancia oral está vinculado a la educación normal del sistema inmunitario, que da como resultado una menor reacción a los antígenos alimentarios.

5 Se han identificado varios factores que afectan a la inducción y al mantenimiento de la tolerancia oral, entre ellos, la estructura de la proteína alimenticia, la dosis y la frecuencia de la administración de los antígenos, así como el estado inmunitario del huésped.

10 Hasta cierto punto, la tolerancia oral de los bebés se puede inducir mediante la lactancia materna (Mosconi E, y otros (2010) Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. [Los complejos inmunológicos de la leche materna son potentes inductores de la tolerancia oral en los recién nacidos y evitan el desarrollo del asma]. Mucosal Immunol; 3:461-74 y Verhasselt y otros (2008) Breast milk mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma [La transferencia de un antígeno a través de la leche materna induce tolerancia y protección contra el asma alérgico], Nat Medecine; 14(2): 170-5). Por tanto, los bebés amamantados por madres que han tomado ciertos alimentos alergénicos como huevos, nueces, etc., y han resultado inmunizadas contra ellos, desarrollan tolerancia oral a estos alérgenos.

15 Por lo tanto, existe la necesidad de identificar aún más los factores que pueden influir en la inducción de la tolerancia oral. Es muy conveniente proporcionar composiciones hipoalérgicas o no alérgicas que tengan la capacidad de inducir y mantener la tolerancia oral en el bebé, para ser administradas especialmente durante el periodo de destete, cuando se están introduciendo nuevos alimentos en la dieta de los mamíferos jóvenes.

20 Es necesario proporcionar soluciones nutricionales que puedan evitar o aliviar el desarrollo de alergias, sobre todo en bebés y niños pequeños, especialmente en aquellos que tienen el riesgo de desarrollar alergias. Es necesario inducir la tolerancia a diversos alérgenos tales como leche, huevo, nueces, cacahuetes, mariscos, trigo y soja. Es necesario evitar o aliviar el desarrollo de alergias durante el periodo de destete, cuando se introducen los últimos alérgenos. Es necesario mantener la tolerancia oral a ciertos alérgenos, que ya había sido inducida a través de la leche materna.

25 Hay que diseñar y producir intervenciones nutricionales, sobre todo mediante ingredientes sintéticos o combinaciones de ingredientes, que puedan administrarse a los bebés y niños pequeños en las etapas tempranas de la vida y que reduzcan la probabilidad o la magnitud de ser alérgico o desarrollar alergias más tarde en la vida.

30 Esta necesidad existe para la población general de bebés y niños pequeños y también para subpoblaciones de bebés y niños pequeños que tienen predisposición a las alergias o que han desarrollado alergias.

35 Hay una necesidad general de aliviar las alergias o los síntomas de alergia y desarrollar medios para inducir y mantener la tolerancia a alérgenos comunes tales como los lácteos, incluida la leche, los huevos, las nueces, los cacahuetes, los mariscos, el trigo y la soja, especialmente en bebés y niños pequeños.

#### 40 **Resumen de la presente invención**

La presente invención se refiere a una composición nutricional - que contiene al menos un péptido de cinco hasta doce aminoácidos de longitud e incluye una secuencia elegida entre las SEC ID nº 3-4, más TGF- $\beta$ ; de forma que al menos dicho péptido está constituido por ocho péptidos compuestos respectivamente por una secuencia diferente, escogida entre las SEC ID nº 1-8, de cinco hasta doce aminoácidos de longitud - para inducir y mantener la tolerancia oral a la BLG y conservar la tolerancia oral a otras proteínas alimenticias, adquirida mediante el consumo de leche materna, en los mamíferos jóvenes, durante y después del periodo de destete.

50 Los péptidos tolerógenos están descritos en las patentes PCT/EP2013/076643 y WO2000/42863 y se ha demostrado que inducen la tolerancia a las proteínas lácteas, en particular a la  $\beta$ -lactoglobulina.

55 El TGF- $\beta$  es un péptido bioactivo presente tanto en el calostro como, en menor medida, en la leche materna madura. Se ha identificado como un posible regulador de la enfermedad atópica y se ha demostrado que el TGF- $\beta$ -1 se secreta mucho menos en la leche madura de las madres alérgicas, en comparación con las madres no alérgicas (Rigotti E y otros, (2006) "Transforming growth factor-beta and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants [Factor de crecimiento transformante beta e interleucina-10 en la leche materna y desarrollo de enfermedades atópicas en los bebés]". Clin Exp Alergia. 36(5):614-8]. En la solicitud de patente internacional WO2009/040310 se describe la administración de TGF- $\beta$  para la prevención primaria de las reacciones alérgicas a las proteínas recién introducidas en la dieta de los mamíferos jóvenes durante el periodo de destete.

60 El TGF- $\beta$  también está presente en la leche bovina; Se ha detectado su presencia en varias fracciones de la leche de vaca y productos comerciales de fórmulas infantiles no hidrolizadas (p.ej. NAN® de Nestlé). Sin embargo el TGF- $\beta$  se pierde durante el procesamiento de las fórmulas infantiles hidrolizadas.

65 En la composición de la presente invención, la combinación de TGF- $\beta$  con el péptido o péptidos tolerógenos da como resultado una composición que modula la respuesta inmunitaria de los mamíferos a los alérgenos durante y después del periodo de destete, cuando se introducen nuevos alimentos en la dieta del mamífero joven. La composición puede

- 5 inducir la tolerancia oral a las proteínas de la leche, en particular a la  $\beta$ -lactoglobulina (BLG), y también puede prolongar esta tolerancia oral adquirida a la BLG y la tolerancia oral a otras proteínas alimenticias adquirida a través del consumo de leche materna. En concreto, la tolerancia oral puede prolongarse cuando el mamífero joven ha sido alimentado con leche materna de una madre que haya estado expuesta y/o sensibilizada a alérgenos tales como la leche, los huevos, las nueces o los cacahuetes, o a mariscos, trigo o soja, o a cualquier otra proteína alimenticia.
- 10 En los bebés humanos, la administración de la composición de la presente invención durante el periodo de destete (i) inducirá y prolongará la tolerancia oral a la BLG gracias a la presencia de los péptidos y del TGF- $\beta$ , (ii) y en el destete prolongará la tolerancia oral a las proteínas alimenticias adquirida por el bebé o niño pequeño a través de la lactancia materna.
- 15 La composición se puede administrar a mamíferos, especialmente a bebés y niños pequeños que corran el riesgo de sufrir alergia a los alimentos, incluida la alergia a las proteínas lácteas, para inducir y mantener la tolerancia oral a la leche de vaca, así como para conservar la tolerancia oral a una amplia gama de proteínas, inducida por la lactancia materna, una vez que comienza el destete.
- 20 Los péptidos también se pueden emplear para inducir la tolerancia a las proteínas de la leche de cabra y búfala, sobre todo a la  $\beta$ -lactoglobulina.
- 25 La composición puede administrarse en su forma pura, diluida en un líquido adecuado, o en forma de una composición farmacéutica o de una composición o suplemento nutricional.
- Según una forma de ejecución de la presente invención, el o los péptidos que lleva la composición están en forma de (i) fracciones peptídicas aisladas de la hidrólisis del material proteico que contiene la BLG y/o (ii) péptidos preparados sintéticamente.
- 30 Según una forma de ejecución de la presente invención, el TGF- $\beta$  contenido en la composición está en forma de un aislado de proteína de suero de leche o de caseína que contiene TGF- $\beta$  de origen natural o está enriquecido en él.
- 35 Una ventaja importante de esta composición es que induce y mantiene la tolerancia oral a las proteínas de la leche de vaca, oveja, búfala o cabra, sobre todo a la  $\beta$ -lactoglobulina, en los mamíferos. Además, el consumo de la composición de la presente invención puede prolongar en el tiempo la tolerancia oral adquirida por estos mamíferos a través de la leche materna, más allá del periodo crítico de destete.
- 40 Estos mamíferos pueden ser jóvenes, y en particular bebés o niños pequeños “con riesgo” de desarrollar alergias alimentarias, en particular alergia a la leche de vaca, por tener al menos un padre o hermano que tenga alergias, o que no corran este riesgo. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención son beneficiosas para la población general de mamíferos jóvenes.
- 45 La composición puede administrarse a animales de compañía, por ejemplo a perros y gatos.
- En una forma de ejecución preferida, la composición contiene al menos un péptido de cinco hasta doce aminoácidos de longitud e incluye una de las secuencias peptídicas SEQ ID n° 3 a SEQ ID n° 4 en forma de fracciones. La dosis de péptido(s) que se puede administrar al mamífero joven, o al mamífero adulto, puede estar comprendida entre 0,4-50  $\mu$ moles/por kg de masa corporal/día, preferiblemente entre 0,9-40  $\mu$ moles/por kg de masa corporal/día.
- 50 La dosis de TGF- $\beta$  que puede administrarse al mamífero joven puede estar comprendida entre 600-4000 ng/por kg de masa corporal/día, preferiblemente entre 900-1600 ng/por kg de masa corporal/día y con mayor preferencia entre 950-1300 ng/por kg de masa corporal/día.
- 55 La composición se administra preferiblemente durante el periodo de destete, pero también puede darse antes de que comience el periodo de destete. En humanos, la administración puede empezar desde el nacimiento o a partir de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis meses de edad, o justo antes de la introducción de leche no humana por primera vez en la dieta del bebé o del niño pequeño. La composición se administra generalmente todos los días o cada dos días. No obstante la administración también puede ser menos regular, por ejemplo cada tres días. El periodo de administración puede ser de al menos un mes, preferiblemente de al menos tres meses y con mayor preferencia de al menos 6 meses o hasta un año. La administración puede prolongarse por más tiempo, por ejemplo hasta tres años.
- 60 La composición se puede añadir a una composición básica que sea, por ejemplo, un reforzante de la leche humana, una fórmula infantil inicial o de seguimiento o una leche de crecimiento. La composición básica puede ser del tipo “no alérgica” o “hipoalérgica”.
- 65 La composición puede administrarse mediante una formulación que contenga ingredientes adicionales o prebióticos, seleccionados preferiblemente entre 2'-fucosil-lactosa, lacto-difucotetraosa, 3-fucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-neotetraosa, lacto-N-tetraosa, 3'-sialil-lactosa, 6'-sialil-lactose, 3'-sialil-lacto-N-tetraosa, 6'-sialil-lacto-N-tetraosa, inulina, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de

cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), glangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada, goma de acacia, goma de soja o mezclas de los mismos.

5 Los péptidos pueden administrarse en una composición que contenga ingredientes adicionales o probióticos, elegidos preferiblemente entre *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium breve*.

### Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1:** Diarrea alérgica alimentaria. Se ensayó la susceptibilidad de seis grupos de ratones a la diarrea alérgica alimentaria a las 12 semanas: los ratones fueron amamantados por madres ingenuas (columnas blancas) o por madres expuestas a OVA e inmunizadas (columnas rayadas) y durante 9 semanas después del destete recibieron por vía oral agua (blanco), NAN@-HA (gris) o NAN@-HA enriquecido con TGF-beta (gris oscuro). El ensayo se realizó dos veces; en el Exp. 1 hay 6 ratones por grupo y en el Exp. 2 hay 10-11 ratones por grupo. Los datos del panel izquierdo, representan la valoración media  $\pm$  ESM de diarrea observada durante las últimas 3 (Exp. 1) y 2 (Exp. 2) exposiciones a la ovoalbúmina; los datos del panel derecho indican el porcentaje de ratones que tuvieron diarrea al estar expuestos a OVA (valoración superior o igual a 3) durante las últimas 3 (Exp. 1) o 2 (Exp. 2) exposiciones.

20 La significación estadística entre los grupos especificados, basada en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, se indica mediante los valores p escritos encima de las columnas comparadas.

### Descripción detallada

25 En la presente invención, el término “tolerancia” debe entenderse como un estado de falta de respuesta inmunológica específica. Las vías de respuesta inmunitaria humoral (anticuerpos) y mediada por células (linfocitos, etc.) pueden ser suprimidas por la inducción de tolerancia. Se considera que una ruptura de la tolerancia oral es la causa subyacente de la alergia alimentaria.

30 El término “alérgeno” debe entenderse como una proteína o un péptido capaz de desencadenar reacciones alérgicas en los mamíferos, particularmente en mamíferos jóvenes “en riesgo”, incluidos los bebés y niños pequeños. Los bebés pequeños y los niños pequeños se consideran “en riesgo” de alergia a las proteínas, si al menos uno de los padres o hermanos es atópico.

35 El término “péptidos tolerógenos” debe entenderse como fragmentos proteicos de partes de la proteína natural, cuyo tamaño varía de 300 a 6000 Da (3 a 50 aminoácidos), preferiblemente entre 500 y 3000 Da y con mayor preferencia entre 500 y 1400 Da, los cuales son capaces de inducir una tolerancia oral específica a las proteínas naturales.

40 El término composición “no alérgica” debe entenderse como aquella que constituye una fuente de nitrógeno, con un contenido bien equilibrado de aminoácidos. En el caso de las proteínas lácteas, la “no alérgenicidad” se define como un contenido residual de proteínas de suero de leche no superior a 1 ppm y como un contenido residual de caseínas totales no superior a 10 ppm.

El término “composición hipoalérgica” debe entenderse como una composición que tiene baja alérgenicidad.

45 El término “sensibilizado a” significa que se han desarrollado anticuerpos IgG1 y/o IgE específicos del alérgeno tras la exposición a un alérgeno.

50 El término “grado de hidrólisis” se refiere al nivel de hidrólisis de la fracción proteica en la composición. El grado de hidrólisis se puede medir usando un reactivo tal como el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), que reacciona con los grupos amino libres de los hidrolizados proteicos. En el caso de los hidrolizados a base de proteína de suero de leche, el nitrógeno reactivo con TNBS (expresado como % de N amínico/NT) de los hidrolizados proteicos “parciales” suele estar comprendido en el intervalo del 8-15%, mientras que en general los hidrolizados proteicos extensos se distinguen por tener un nitrógeno reactivo con TNBS del 30-45%, expresado como % de N amínico/NT.

55 El término “destete” se refiere a la introducción de sustitutos de la leche materna humana (como las fórmulas infantiles) y/o alimentos líquidos o sólidos complementarios.

60 El término “bebé” se refiere a un niño en el periodo más temprano de la vida, desde su nacimiento hasta que puede caminar (generalmente entre uno y 12 meses).

El término “niño pequeño” se refiere generalmente al de edad comprendida entre uno y dos años y medio.

65 El “TGF- $\beta$ ” o “factor de crecimiento transformante beta” se refiere a un grupo de al menos cinco péptidos bioactivos distintos, pero estrechamente relacionados, designados como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 etc., que se encuentran, entre otras, en la leche humana (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2) (Li y otros, Transforming Growth Factor-B Regulation of Immune Responses [Regulación de las respuestas inmunitarias por el factor de crecimiento transformante B], Annu. Rev. Immunol. 2006

24:99-146). El TGF- $\beta$  está altamente conservado entre las especies (más del 98% de homología de la secuencia de aminoácidos).

5 La presente invención se refiere a una composición que contiene una combinación de al menos un péptido de una serie específica de péptidos tolerógenos derivados de la BLG, que tienen una longitud de 5 hasta 12 aminoácidos, y TGF- $\beta$ , para usarla en la prevención primaria de reacciones alérgicas a las proteínas lácteas y a las proteínas recién introducidas en la dieta de un mamífero joven al destetarlo.

10 En la composición de la presente invención hay al menos un péptido que tiene entre cinco y doce aminoácidos de longitud y comprende una de las secuencias SEQ ID n° 3-4 y/o combinaciones con SED ID n° 1, 2, 5-8. Las secuencias peptídicas SEC ID n° 1-8 se indican en la tabla 1. La identificación y caracterización de las secuencias de los péptidos tolerógenos SEC ID n° 1-5 está descrita en la solicitud de patente internacional PCT/EP2013/076643.

SEQ ID n°	Secuencia	Posición en la secuencia de la BLG
1	IVTQTM	18-23
2	KGLDIQK	24-29
3	DAQSAPLR	49-56
4	VEELKPTPE	59-67
5	IIAEK	87-91
6	IDALNENK	100-107
7	VLDTDY	110-115
8	EVDDEALEK	143-151

15 Los péptidos SEQ ID n° 6, IDALNENK, SEQ ID n° 7, VLDTDY y SEQ ID n° 8 EVDDEALEK habían sido identificados anteriormente en la patente WO2000/42863 como inductores de la tolerancia oral. Los péptidos se identificaron como parte de una secuencia peptídica más larga en este último documento.

20 En la patente PCT/EP2013/076643, los presentes inventores, en un ensayo celular con células humanas que expresan el receptor del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II HLA-DR, identificaron las secuencias de péptidos de la tabla 1 existentes en una fórmula infantil parcialmente hidrolizada NAN®-HA (también conocida como BEBA® HA, de Nestlé), como aquellos que se unen al receptor HLA.

25 En esta solicitud de patente se explicaba la manera en que, como primer paso en la inducción de la 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 las secuencias peptídicas o el ensamblaje de péptidos formado en promedio por diez aminoácidos, con un número mínimo de cinco. Los pentapéptidos pueden ir incluidos en secuencias peptídicas más largas (o incluso en proteínas), pues serán digeridos en el tracto gastrointestinal hasta este tamaño peptídico más pequeño de 5-18 aminoácidos. Esto explica, en parte, por qué los productos extensamente hidrolizados compuestos por aminoácidos libres, dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos no inducen tolerancia oral.

30 La capacidad de los péptidos de la tabla 1 para inducir tolerancia oral in vivo se confirmó adicionalmente en la patente PCT/EP2013/076643 mediante un modelo murino experimental de sensibilización a la BLG.

35 El péptido o péptidos incluidos en la composición de la presente invención tienen una longitud de cinco hasta doce aminoácidos y cada péptido contiene una secuencia elegida entre las SEC ID n° 1-8 (véase la tabla 1). Por lo tanto el péptido o péptidos tienen una longitud específica (5-12 aminoácidos).

40 Los péptidos más cortos que los pentámeros (cinco aminoácidos de longitud) pueden carecer de efecto tolerógeno y, por otra parte, se cree que los péptidos superiores a los 12-meros tienen mayor riesgo de alergenicidad.

45 Así, el péptido puede ser un 5-mero, 6-mero, 7-mero, 8-mero, 9-mero, 10-mero, 11-mero o un 12-mero que contenga cualquiera de las secuencias escogidas entre las SEQ ID n° 1-8. Por lo tanto puede ser cualquier péptido 5-mero, 6-mero, 7- mero, 8-mero, 9-mero, 10-mero 11-mero o 12-mero que contenga la secuencia IVTQTM (SEQ ID n° 1) o IVTQTM (SEQ ID n° 1), o KGLDIQK (SEQ ID n° 2), o DAQSAPLR (SEQ ID n° 3), VEELKPTPE (SEQ ID n° 4), IIAEK (SEQ ID n° 5) , IDALNENK (SEQ ID n° 6), VLDTDY (SEQ ID n° 7) o EVDDEALEK (SEQ ID n° 8).

50 Los péptidos incluidos en la composición de la presente invención pueden ser cualquier combinación de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o de todos los ocho péptidos que contienen las secuencias SEC ID n° 1-8.

55 Según una forma de ejecución de la presente invención, los péptidos aislados se pueden preparar sintéticamente por métodos estándar conocidos del especialista. Opcionalmente, según otra forma de ejecución de la presente invención, los péptidos se pueden concentrar o extraer de fuentes naturales tales como leche (p.ej. leche bovina) o fracciones de leche preferiblemente modificadas, por ejemplo mediante tratamientos para producir o concentrar los péptidos. Los hidrolizados de leche cuyas proteínas lácteas han sido hidrolizadas por enzimas u otros medios se pueden elaborar por métodos conocidos del estado técnico. Los expertos en la materia también conocen métodos para extraer, separar

e identificar las fracciones peptídicas que contienen los péptidos de la presente invención, partiendo de hidrolizados de leche. Los péptidos de la presente invención se pueden generar por estos métodos.

5 La preparación y caracterización de los péptidos SEC ID nº 1 hasta 5 está descrita detalladamente en la patente PCT/EP2013/076643. Los métodos allí descritos se pueden aplicar a la preparación de los péptidos para incluirlos en la composición de la presente invención. La preparación y caracterización de los péptidos SEC ID nº 6 hasta 8 está descrita detalladamente en la patente WO2000/42863.

10 Según una forma de ejecución de la presente invención, la dosis administrada de péptido(s) está comprendida en el intervalo de 0,4-50  $\mu$ moles/por kg de masa corporal/día, preferiblemente en el intervalo de 0,9-40  $\mu$ moles/por kg de masa corporal/día. Por ejemplo, los péptidos administrados como parte de una fórmula infantil pueden encontrarse en la fórmula a una concentración de 50-150  $\mu$ g/g de polvo. Una dosis típica de fórmula infantil para un bebé de cinco meses sería de tres biberones diarios con siete cucharadas de polvo en cada uno, y para un bebé de seis meses o más, dos biberones diarios con siete cucharadas en cada uno. Las dosis están basadas en el peso medio de un bebé de seis meses que pese aproximadamente 8 kg y de un bebé de doce meses que pese aproximadamente 9,5 kilos.

15 En la patente PCT/EP2013/076643 se describió que las secuencias SEQ ID nº 1-5 estaban muy conservadas (100% de identidad secuencial) en la BLG de vacas, búfalos, cabras domésticas, ovejas y muflones. Por lo tanto se cree que cualquiera de estas fuentes de leche que contienen estas secuencias puede inducir la tolerancia oral a la leche bovina y viceversa. Por lo tanto los presentes inventores reivindican que los péptidos identificados por ellos pueden inducir la tolerancia oral a la BLG de cualquiera de estas fuentes.

20 Según una forma de ejecución de la presente invención, la composición de la presente invención se administra en una cantidad suficiente para inducir la tolerancia oral, preferiblemente una tolerancia oral completa a la BLG bovina. La BLG también puede ser de oveja o cabra. Se entiende por tolerancia oral completa que no se observa ninguna reacción alérgica después de un DBPCFC (ensayo doble ciego de exposición alimentaria contra placebo) realizado con leche de vaca, en particular a la BLG bovina.

25 Según una forma de ejecución de la presente invención, los péptidos pueden encontrarse en una proporción del 0,01% al 5% y preferiblemente del 0,1% al 0,5% de proteína total.

30 La composición de la presente invención también contiene TGF- $\beta$ .

35 El TGF- $\beta$  puede estar en forma de un factor de crecimiento polipeptídico aislado de la leche, tal como se describe, por ejemplo, en las patentes EP 313515 o WO 92/00994. Alternativamente se puede emplear un TGF- $\beta$  recombinante, si se prefiere.

40 Además, el TGF- $\beta$  está presente en las fracciones de suero de leche y caseína de la leche de mamíferos en una forma predominantemente activa. Por lo tanto, el TGF- $\beta$  que debe incluirse en la composición de la presente invención puede estar en forma de una fracción de suero de leche o de caseína procedente de una leche de mamífero, por ejemplo, de leche de vaca, cabra, búfala o camella.

45 Las fracciones de leche que contienen TGF- $\beta$  utilizables según la presente invención son una fracción de proteína de suero de leche que contiene TGF $\beta$  disponible con las marcas TM0301™, Protarmor 865 SB™ o Vitalarmor de Armor Proteines, Francia, o XP-828L™ de Advitech Canadá.

50 Según una forma de ejecución de la presente invención, la composición de la presente invención es un reforzante de la leche humana, una fórmula infantil, preferiblemente una fórmula de continuación, que contiene 12 hasta 300 ng de TGF- $\beta$  por gramo de composición seca, preferiblemente entre 45-100 ng de TGF- $\beta$  por gramo de composición seca, con mayor preferencia 65-85 ng de TGF- $\beta$  por gramo de composición seca.

55 En una forma de ejecución de la presente invención, la dosis de TGF- $\beta$  administrada está comprendida en el intervalo de 600-4000 ng/por kg de masa corporal/día, preferiblemente de 900-1600 ng/por kg de masa corporal/día y con mayor preferencia de 950-1300 ng/por kg de masa corporal/día.

Según una forma de ejecución de la presente invención, la composición contiene preferentemente tanto TGF- $\beta$ 1 como TGF- $\beta$ 2. Preferentemente, el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 están en una relación comprendida entre 2:1 y 1:20, con mayor preferencia en una relación comprendida entre 1:10 y 1:20, como por ejemplo 1:16.

60 La composición puede administrarse directamente al mamífero joven por vía oral, sola (pura o diluida en agua o leche materna, por ejemplo) o en forma de una composición tal como una fórmula de leche infantil, fórmula de continuación o leche de crecimiento, o un suplemento alimenticio, por ejemplo, un reforzante de la leche humana. También se puede administrar en cualquier soporte lácteo utilizado durante la alimentación trófica, en fórmulas infantiles no lácteas, en un cereal o yogur para bebés, en un pudín de queso para bebés, en una bebida láctea o de frutas, en un batido de frutas, en un tentempié o galleta u otro producto de panadería. También se puede administrar en alimentos y bebidas para mascotas, como cualquier alimento seco o granulado, comida húmeda o enlatada, o suplemento.

De acuerdo con una forma de ejecución de la presente invención, la composición se administra en una composición hipoalérgica o no alérgica. Se puede administrar, por ejemplo, en un reforzante de leche humana, en una fórmula infantil prematura, en una fórmula infantil inicial, en una fórmula de continuación, en un suplemento alimenticio o leche de crecimiento, como producto hipoalérgico. Se puede administrar, por ejemplo, en un reforzante de leche humana, en una fórmula infantil prematura, en una fórmula infantil inicial, en una fórmula de continuación, en un suplemento alimenticio o leche de crecimiento, como producto no alérgico. Las composiciones hipoalérgicas y no alérgicas contienen en general aislados proteicos hidrolizados parcial o extensamente. En una forma de ejecución preferida, la composición se administra en una composición hipoalérgica que contiene un hidrolizado de leche con un grado de hidrólisis entre 8 y 15%. En el caso de que la fracción proteica de la composición esté contenida en forma de hidrolizado parcial o extenso, el TGF- $\beta$  se puede añadir por separado para asegurar que la composición lleve el TGF- $\beta$  de longitud completa (sin hidrolizar) (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2).

Por otra parte, según una forma de ejecución de la presente invención, cuando la composición contiene una fracción proteica no hidrolizada (por ejemplo, suero de leche) pueden requerirse pocas o ninguna adición extra de TGF- $\beta$  para llevar el contenido de TGF- $\beta$  al nivel exigido. En las formas de ejecución de la presente invención en que el aislado proteico de la composición no está hidrolizado o está extensamente hidrolizado, los péptidos tolerógenos que incluyen las secuencias SEQ ID n° 1-8 se añaden por separado a la composición. Los péptidos tolerógenos que contienen las secuencias SEQ ID n° 1-8 también se pueden añadir por separado a la composición, en el caso de una composición hipoalérgica que contenga un aislado proteico parcialmente hidrolizado.

Las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas en la dosis indicada como una solución nutricional o medicamento para prevenir reacciones alérgicas a las proteínas dietéticas recién introducidas en un mamífero joven durante el destete. Por lo tanto las composiciones se usan en concreto para inducir la tolerancia oral a la BLG (de vaca, búfalo, cabra doméstica, oveja o muflón) y también para mantener la tolerancia oral a la BLG o a otras proteínas alimenticias adquirida por el joven mamífero a través del consumo de leche materna.

El efecto terapéutico indicado se obtiene alimentando el mamífero joven con la composición durante y, opcionalmente, antes del periodo de destete. Dichas composiciones se pueden administrar a los bebés y niños pequeños, o a una subpoblación de bebés y niños pequeños con síntomas o susceptibilidad a alergias.

La tolerancia oral a la BLG inducida por la composición de la presente invención puede aliviar las alergias a medio plazo (durante el tratamiento o a lo largo de 1, 6, 12 o 18 meses después del tratamiento).

Además, la prolongación o el mantenimiento de la tolerancia oral que se ha adquirido mediante el consumo de leche materna previene el desarrollo de síntomas alérgicos a los alimentos recién introducidos durante el periodo de destete. Es sabido que la tolerancia oral adquirida a través del consumo de leche materna se pierde tras un cierto periodo (por ejemplo 12 semanas en los ratones [Mosconi y otros (2010)]). Por lo tanto, prolongar o mantener esta tolerancia oral ya adquirida durante el mayor tiempo posible es una forma muy efectiva de reducir la aparición de alergias alimentarias y enfermedades atópicas.

Este efecto se demuestra en el ensayo del modelo murino de alergia a la ovoalbúmina del ejemplo 1. En este ejemplo se alimentaron grupos de crías de ratón durante el destete con (i) agua, (ii) fórmula NAN®-HA o (iii) fórmula NAN®-HA enriquecida con TGF- $\beta$ . El régimen (iii) es una composición según una forma de ejecución de la presente invención. La fórmula NAN®-HA contiene todos los 5 péptidos de las secuencias SEQ ID 1-5. Las crías de ratón de cada uno de los tres grupos de régimen se dividieron en dos subgrupos, dependiendo de si habían sido amamantadas por madres ingenuas (que no habían estado expuestas a la ovoalbúmina), o por madres que habían sido expuestas e inmunizadas a la ovoalbúmina (OVA).

Las crías de ratón se sometieron después a un protocolo de inducción de alergia alimentaria que consistió brevemente en una inyección intraperitoneal de ovoalbúmina/hidróxido de aluminio (adyuvante), seguida de exposiciones a OVA oral. Luego se midieron sus síntomas de alergia, en particular la diarrea (ensayo 1). Se realizó un segundo conjunto de exposiciones a OVA (ensayo 2) y se midieron de nuevo los síntomas de alergia, en particular la diarrea.

La **figura 1** muestra los resultados de este ensayo y en las dos pruebas realizadas demuestran que la susceptibilidad a la diarrea alérgica a los alimentos disminuye significativamente a las 12 semanas en el único grupo de ratones que fueron amamantados por madres expuestas e inmunizadas a OVA y que recibió la fórmula NAN®-HA enriquecida con TGF- $\beta$  tras el destete, en comparación con los ratones amamantados por madres ingenuas, que solo recibieron agua después del destete (grupo de control).

Al analizar conjuntamente el ensayo 1 y el ensayo 2 se ve que solo el 22% de los ratones experimentaron diarrea tras la exposición a la OVA en el grupo de ratones amamantados por madres expuesta a OVA y que además recibieron NAN®-HA enriquecido con TGF- $\beta$ , frente al 60% de ratones amamantados por madres ingenuas, que solo recibieron agua. El 43% de los ratones que habían sido amamantados por madres expuestas a OVA y habían recibido agua tras el destete sufrieron diarrea.

En el segundo ensayo, donde la alergia alimentaria fue más severa que en el primer ensayo, la protección fue mejor que en el ensayo 1. De hecho, el 80% de los ratones tuvieron diarrea alérgica en las últimas 2 exposiciones del grupo de control, mientras que solo el 25% sufrió diarrea en el grupo de ratones amamantados por madres inmunizadas y expuestas a OVA y que recibieron NAN®-HA enriquecido con TGF-β después del destete.

Al agrupar los resultados obtenidos en los 2 ensayos también se observó una protección estadísticamente significativa en el grupo de ratones amamantados por madres inmunizadas y expuestas a OVA, que recibieron fórmula NAN®-HA durante el destete; sin embargo en este caso la protección fue menos reproducible y menos profunda que la observada en los ratones amamantados por madres inmunizadas y expuestas a OVA, que recibieron fórmula TGF-β NAN®-HA enriquecida con enriquecida durante el destete.

En datos aquí no mostrados también se ha observado que la tolerancia oral es inducida y prolongada en las crías alimentadas por madres que estuvieron expuestas al alérgeno mientras alimentaban a sus crías (es decir, durante el periodo de alimentación), pero que no estaban sensibilizadas al alérgeno. El efecto fue menos marcado respecto al observado en las crías que habían sido alimentadas por madres expuestas y sensibilizadas al alérgeno. Por lo tanto la composición de la presente invención induce en general la tolerancia oral a la BLG y prolonga la tolerancia oral a los alérgenos alimentarios inducida por el consumo de leche materna de madres expuestas, pero no necesariamente sensibilizadas a estos alérgenos alimentarios. La exposición de la madre al alérgeno alimentario tiene lugar en general durante el periodo de alimentación. En general la administración al mamífero joven de la composición de la presente invención durante el destete prolonga la tolerancia oral a los alérgenos alimentarios de los mamíferos jóvenes que han sido alimentados con leche de una madre que ha estado expuesta y, opcionalmente, sensibilizada a dichos alérgenos alimentarios, generalmente, durante el periodo de alimentación. Los alérgenos alimentarios pueden ser, por ejemplo, leche, huevos, nueces, cacahuètes, mariscos, trigo o soja, o cualquier otra proteína alimenticia. La prolongación de la tolerancia oral es superior en los mamíferos jóvenes alimentados por madres que ya están sensibilizadas al alérgeno alimentario.

El NAN®-HA enriquecido con TGF-β es un ejemplo adecuado de una forma de ejecución de la composición según la presente invención para la administración a bebés.

Así, los solicitantes han demostrado que la composición de la presente invención prolonga/mantiene la tolerancia oral a los alérgenos que ha sido inducida por el consumo de leche materna y evita el desarrollo de síntomas alérgicos en el mamífero joven tras la exposición a estos alérgenos durante el periodo de destete.

La composición de la presente invención también es capaz de inducir la tolerancia oral a la BLG, independientemente de si el mamífero joven a quien se administra la composición ha consumido leche de una madre que ha sido expuesta y sensibilizada a la BLG.

La composición también es capaz de mantener la tolerancia oral que el mamífero joven ha adquirido al consumir leche materna de una madre que ya ha sido expuesta y opcionalmente sensibilizada a alérgenos, en particular leche, huevos, nueces, cacahuètes, mariscos, trigo o soja, o cualquier otra proteína alimenticia.

Según una forma de ejecución de la presente invención, la composición se puede administrar para la prevención primaria de las reacciones alérgicas a las proteínas de la leche y a las proteínas dietéticas recién introducidas en un mamífero joven durante y después del destete. Según una forma de ejecución de la presente invención, la composición se puede administrar para la prevención primaria de enfermedades atópicas en un mamífero joven durante y después del destete. Según una forma de ejecución se trata de un mamífero joven que corre el riesgo de desarrollar alergias.

La composición se administra preferiblemente durante el periodo de destete, cuando se introducen nuevos alimentos para el mamífero joven. No obstante, la administración puede tener lugar antes de que el periodo de destete haya empezado a "cebar" el sistema inmunitario. En los humanos, cuando la madre amamanta exclusivamente desde el nacimiento, el periodo de destete suele venir aproximadamente a los cuatro, cinco o seis meses de edad. En cambio, si la madre no amamanta exclusivamente desde el nacimiento, el periodo de destete (cuando se introducen alimentos distintos de la leche materna) puede tener lugar antes, uno, dos o tres meses o incluso una, dos o tres semanas, o incluso desde el nacimiento.

Para que la composición de la presente invención ejerza un beneficio terapéutico máximo, su administración debe ser regular y frecuente, por ejemplo cada día o cada dos días. Sin embargo, la administración también puede ser menos frecuente, por ejemplo cada tres días. Se puede administrar al menos una vez al día, coincidiendo con cada hora de comida o con menos frecuencia, por ejemplo una, dos, tres, cuatro o cinco o más veces al día. El número de veces al día en que se administra la composición depende asimismo de la edad del bebé o del niño pequeño, de la frecuencia de su alimentación y de los deseos del cuidador.

El periodo de administración puede ser de al menos un mes, preferiblemente de al menos tres meses y con mayor preferencia de al menos seis meses o hasta un año. La administración se puede prolongar por más tiempo, por ejemplo hasta tres años.

El periodo de administración de los péptidos de la presente invención puede ser continuo o discontinuo. Para un efecto más sostenido se prefiere la administración continua. No obstante se cree que una pauta discontinua (por ejemplo de cada dos días, o la administración diaria durante una semana al mes o en semanas alternas) puede inducir efectos positivos en el mamífero joven o en el adulto.

5 Es preferible la administración por ingesta diaria (una o varias tomas veces al día) o por ingesta semanal (cuatro, tres, dos veces o una vez a la semana).

10 La combinación del péptido o péptidos tolerógenos que tienen cualquiera de las secuencias SEQ ID nº 1-8 y TGF- $\beta$  se puede administrar sola, sin otros compuestos, pura o diluida en agua o leche, incluida la leche materna humana, por ejemplo, o mezclada con otras composiciones (como suplementos dietéticos, suplementos nutricionales, fármacos, vehículos, sabores e ingredientes digeribles o no digeribles).

15 La combinación se puede administrar, por ejemplo, a un bebé o niño pequeño, como parte de una composición que es un reforzante de la leche humana u otro suplemento nutricional. La composición que contiene la combinación de péptido(s) y TGF- $\beta$  también se puede administrar en una composición farmacéutica.

20 Según una forma de ejecución de la presente invención, la combinación de péptido(s) y péptidos de TGF- $\beta$  se puede añadir a una composición básica, que es una composición destinada a mamíferos, sobre todo a humanos y mascotas, o estar contenido en ella. La composición básica puede contener proteínas intactas (no hidrolizadas). La composición básica puede ser una fórmula infantil, una fórmula de seguimiento o una composición nutricional para bebés o niños pequeños.

25 Según una forma de ejecución de la presente invención, la combinación de péptido(s) y péptidos de TGF- $\beta$  se puede agregar a una composición básica, que es una composición hipoalérgica destinada a mamíferos, particularmente a humanos y mascotas. Por tanto la fórmula básica a la cual se agregan los péptidos o que puede contener los péptidos puede ser, por ejemplo, una fórmula hipoalérgica (HA) en que las proteínas lácteas están parcialmente hidrolizadas. También puede ser una fórmula no alérgica con las proteínas lácteas extensamente hidrolizadas o reemplazadas por aminoácidos libres, o un sucedáneo de leche de vaca a base de soja. Puede ser, por ejemplo, una fórmula infantil, una fórmula de seguimiento o una composición nutricional para bebés o niños pequeños con problemas fisiológicos/patológicos particulares.

35 En una forma de ejecución la formulación es una fórmula infantil elemental y la fórmula básica no contiene ni péptidos ni proteínas, sino tan solo aminoácidos.

40 En una forma de ejecución las proteínas o péptidos de la fórmula básica se originan, en parte o en su totalidad, a partir de suero dulce de leche intacto o hidrolizado del que se han eliminado los GMPc. A este respecto se remite a la patente EP880902 en la cual hay un proceso que permite eliminar prácticamente todo el glucomacropéptido de caseína (una fracción rica en treonina y pobre en triptófano) del suero bovino, aumentando así la proporción de alfa-lactoalbúmina (una fracción muy rica en triptófano). Al combinar esta fracción de suero dulce modificada con leche descremada y la adición de un poco de L-histidina y L-arginina libres (para llegar a las proporciones mínimas de estos aminoácidos que requiere la Directiva CE), la formulación adquiere un perfil de aminoácidos mucho más parecido al de la leche humana, caracterizado en particular por niveles comparables de triptófano y treonina, lo cual permite adaptar su contenido proteico al de los humanos.

45 Cuando se administra junto con el perfil peptídico optimizado anteriormente descrito, se entiende que la combinación de péptido(s) y TGF- $\beta$  puede actuar sinérgicamente con el perfil de aminoácidos optimizado para inducir y mantener la tolerancia oral y proporcionar al mismo tiempo el valor nutricional proteico optimizado (capaz de potenciar el efecto de los péptidos y del TGF- $\beta$  al satisfacer las necesidades de proteína del modo cuantitativamente más adecuado).

50 Los péptidos de la composición de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, formando parte de una fórmula infantil a una concentración de 50-150  $\mu\text{g/g}$  de polvo.

55 En una forma de ejecución la composición hipoalérgica básica a la cual se agrega la combinación de péptido(s) y TGF- $\beta$  puede contener como fuente de nitrógeno péptidos o aminoácidos libres y en particular proteínas de leche de vaca, de cabra o de oveja, tales como proteínas de suero de leche, alfa-lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina de suero bovino, ácido caseínico, caseinatos o alfa, beta, kappa-caseína, por ejemplo. La fuente de nitrógeno puede proporcionar al menos el 7 hasta el 25% de la energía total.

60 Las vitaminas y minerales son ejemplos típicos de suplementos dietéticos. En una forma de ejecución preferida la composición se administra junto con otros compuestos potenciadores del efecto descrito en la inmunidad del mamífero joven. Dichos compuestos pueden ser otras sustancias activas que influyan sinérgica o separadamente en la respuesta inmunitaria del bebé y/o potencien el efecto de los péptidos, como los probióticos y prebióticos.

65 Como ejemplos de compuestos probióticos conocidos hay que mencionar *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Saccharomyce*, *Streptococcus thermophilus*, *E. Faecium*, *E. Coli Nissle*, en particular los probióticos y probióticos no

replicantes como los del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o una combinación de los mismos, como por ejemplo *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* o sus combinaciones, y aplicaciones de estas bacterias.

5 Los prebióticos y otros ingredientes se eligen preferiblemente entre 2'-fucosil-lactosa, Lacto-difucotetraosa, 3-fucosil-lactosa, Lacto-N-fucopentaosa I, Lacto-N-fucopentaosa II, Lacto-N-fucopentaosa III, Lacto-N-neotetraosa, Lacto-N-tetraosa, 3'-sialil-lactosa, 6'-sialil-lactosa, 3'-sialil-lacto-N-tetraosa, 6'-sialil-Lacto-N-neotetraosa, inulina, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), glangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada, goma de acacia, goma de soja o mezclas de los mismos.

10 Puede haber otros hidratos de carbono, tales como un segundo carbohidrato que actúe sinérgicamente con el primer carbohidrato y que esté seleccionado del grupo integrado por goma de xilooligosacárido (XOS), goma de acacia, almidón, goma guar parcialmente hidrolizada o mezclas de los mismos. La proporción del carbohidrato o carbohidratos puede ser aproximadamente de 1 hasta 20 g o del 1% al 80% o del 20% al 60% en las dosis diarias de la composición. Alternativamente la proporción de carbohidratos puede ser del 10% al 80% de la composición seca.

15 En una forma de ejecución la composición nutricional lleva una mezcla de oligosacáridos según la patente WO2007/090894 (disposición general y específicamente el ejemplo 1). En particular se puede utilizar combinada con GOS. La fórmula básica puede aportar una mezcla de oligosacáridos que contenga 5-70% en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado del grupo integrado por GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc y Gal $\beta$ 1,6GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; 20-90% en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado del grupo integrado por Gal $\beta$ 1,6Gal, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Glc Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc y Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; y 5-50% en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado del grupo integrado por NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc y NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc.

20 Se puede incluir uno o más ácidos grasos esenciales de cadena larga (AGPI-CL) en la composición. Como ejemplos de AGPI-CL que pueden agregarse cabe mencionar el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA). Los AGPI-CL se pueden agregar a concentraciones que constituyan más del 0,01% de los ácidos grasos contenidos en la composición.

25 Si se desea, en la composición nutricional puede incluirse uno o más emulsionantes de calidad alimentaria; por ejemplo ésteres del ácido diacetil tartárico de mono- y diglicéridos, lecitina y mono- o diglicéridos o una mezcla de los mismos. Análogamente se pueden incluir sales y/o estabilizantes adecuados. Se pueden añadir saborizantes a la composición.

30 La combinación de péptido(s) y TGF- $\beta$  puede incorporarse o estar contenida en una composición que sea una "fórmula prematura" para bebés nacidos antes de término o que tengan un bajo peso al nacer, una "fórmula inicial" o una "fórmula de continuación". En el **ejemplo 2** se indica un ejemplo de dicha fórmula inicial.

#### 40 **Ejemplo 1:**

Se realizaron ensayos in vivo para investigar el efecto de la administración de una composición que contenía péptidos con las secuencias SEQ nº ID 1-8 y TGF- $\beta$  a crías de rata durante el destete. Se midió concretamente la protección de las crías de ratón contra la alergia alimentaria tras la administración de la composición.

45 El ensayo fue diseñado para aprovechar el hecho de que la prevención transitoria de la alergia alimentaria puede ser inducida por la transferencia de ovoalbúmina (OVA) a través de la leche materna por parte de madres expuestas e inmunizadas con OVA. A las 12 semanas se evaluó el efecto de la administración de una fórmula infantil parcialmente hidrolizada NAN®-HA o de una fórmula NAN®-HA enriquecida con TGF- $\beta$  en el mantenimiento de la protección contra alergias alimentarias tras el destete.

50 Se realizaron dos ensayos independientes (con la misma configuración), probando los 6 grupos siguientes:  
 - Crías amamantadas por madres ingenuas que recibieron el siguiente régimen por vía oral después del destete: agua o fórmula NAN®-HA o fórmula NAN®-HA enriquecida con TGF- $\beta$   
 55 - Crías amamantadas por una madre inmunizada y expuesta a OVA que recibieron el siguiente régimen por vía oral después del destete: agua o fórmula NAN®-HA o fórmula NAN®-HA enriquecida con TGF- $\beta$

En el ensayo 1 hubo 6 ratones por grupo y en el ensayo 2, 10-11 ratones por grupo.

60 Resumiendo, los ratones se inmunizaron o no con OVA adsorbido en alumbre, con dos inyecciones intraperitoneales antes del apareamiento. En el momento del parto, las crías ingenuas fueron alimentadas por madres ingenuas o inmunizadas que recibieron 2 mg de OVA por vía oral tres veces por semana, durante tres semanas (período de lactancia). Los ratones se destetaron a las tres semanas y cuando tuvieron 12 semanas de edad se sometieron a un protocolo de inducción de alergia alimentaria (modificado de Brandt y otros 2003), que consistía resumidamente en una inyección intraperitoneal de OVA (50  $\mu$ g)/alumbre (1mg) en las semanas 13 y 15, seguida de exposiciones intragástricas de OVA (50  $\mu$ g) a partir de la semana 17 y tres veces por semana.

Los ratones se sacrificaron cuando más del 50% de los ratones del grupo control tuvieron diarrea (madre ingenua, agua después del destete).

- 5 La alergia alimentaria se determinó una hora después de la exposición, según la siguiente valoración de la diarrea:
- 0: heces normales / duras
  - 1: heces blandas / pegajosas / bien formadas
  - 2: heces no formadas
  - 3: un episodio de diarrea líquida
- 10 - 4: 2 o más episodios de diarrea líquida

Los resultados se compararon mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y se muestran en la **figura 1**.

**Ejemplo 2:**

- 15 A continuación se indica un ejemplo de la composición de una fórmula infantil para usar según la presente invención. Esta composición se ofrece solo a modo de ilustración.

Nutriente	Por 100 kcal	Por litro
Energía	100	670
Proteína parcialmente hidrolizada, incluidos los péptidos 1-8 (g)	1,9	12,7
Grasa (g)	5,3	35,7
Aislado proteico de suero lácteo (enriquecido en TGF-β) (mg)	5,1	34,1
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α-linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Prebiótico (100% de 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
Mn (µg)	8	50
Se (µg)	2	13
Vitamina A (µg de RE)	105	700
Vitamina D (µg)	1,5	10
Vitamina E (mg de 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
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>B. lactis</i>	1 x 10 <sup>7</sup> ufc/g de polvo	

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NESTEC SA
  - <120> 13508
  - <130> 13508
  - <160> 8
  - <170> BiSSAP 1.2
  - <210> 1
- 25

ES 2 807 831 T3

	<211> 6 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 1	Ile Val Thr Gln Thr Met 1 5
5	<210> 2 <211> 7 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 2	Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys 1 5
10	<210> 3 <211> 8 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 3	Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg 1 5
15	<210> 4 <211> 9 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 4	Val Glu Glu Leu Lys Pro Thr Pro Glu 1 5
20	<210> 5 <211> 5 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 5	Ile Ile Ala Glu Lys 1 5
25	<210> 6 <211> 8 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 6	Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys 1 5
30	<210> 7 <211> 6 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 7	Val Leu Asp Thr Asp Tyr 1 5
35	<210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> Bóvidos <400> 8	Glu Val Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys 1 5
40		
45		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición nutricional - que contiene al menos un péptido de cinco hasta doce aminoácidos de longitud e incluye una secuencia elegida entre las SEC ID nº 3-4, más TGF- $\beta$ ; de forma que al menos dicho péptido está constituido por ocho péptidos compuestos respectivamente por una secuencia diferente, escogida entre las SEC ID nº 1-8, de cinco hasta doce aminoácidos de longitud - para inducir y mantener la tolerancia oral a la BLG y conservar la tolerancia oral a otras proteínas alimenticias, adquirida mediante el consumo de leche materna, en los mamíferos jóvenes, durante y después del periodo de destete.
- 10 2. La composición nutricional según la reivindicación 1, que contiene un hidrolizado de leche con un grado de hidrólisis comprendido entre el 8 y el 15%.
- 15 3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la cual los péptidos son de origen lácteo y en particular de  $\beta$ -lactoglobulina.
- 20 4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la cual el péptido o péptidos están contenidos como (i) fracciones peptídicas aisladas de la hidrólisis de material proteico que contiene  $\beta$ -lactoglobulina y/o (ii) péptido o péptidos preparados sintéticamente.
- 25 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la cual el TGF- $\beta$  se halla en forma de una fracción de suero de leche o caseína procedente de leche de vaca, de cabra, de búfala o de camella, o está en forma de TGF- $\beta$  recombinante.
- 30 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la cual es un reforzante de leche humana, una fórmula inicial o una fórmula de continuación.
- 35 7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la cual el TGF- $\beta$  es preferiblemente una mezcla de TGF $\beta$ -1 y TGF $\beta$ -2, con una relación de TGF $\beta$ -1 a TGF $\beta$ -2 comprendida en el intervalo entre 2:1 y 1:20, con mayor preferencia con una relación comprendida entre 1:10 y 1:20.
- 40 8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, de modo que el mamífero joven es un bebé o un niño pequeño humano.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, de manera que el mamífero joven ha sido alimentado con leche materna de una madre que ha estado expuesta a leche, huevos, nueces, cacahuets, mariscos, trigo o soja, o a cualquier otra proteína alimenticia durante el período de lactancia.
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además contiene al menos un péptido de cinco a doce aminoácidos de longitud constituido por una secuencia elegida entre las SEC ID nº 1,2 y 5-8.
11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se administra a animales de compañía.

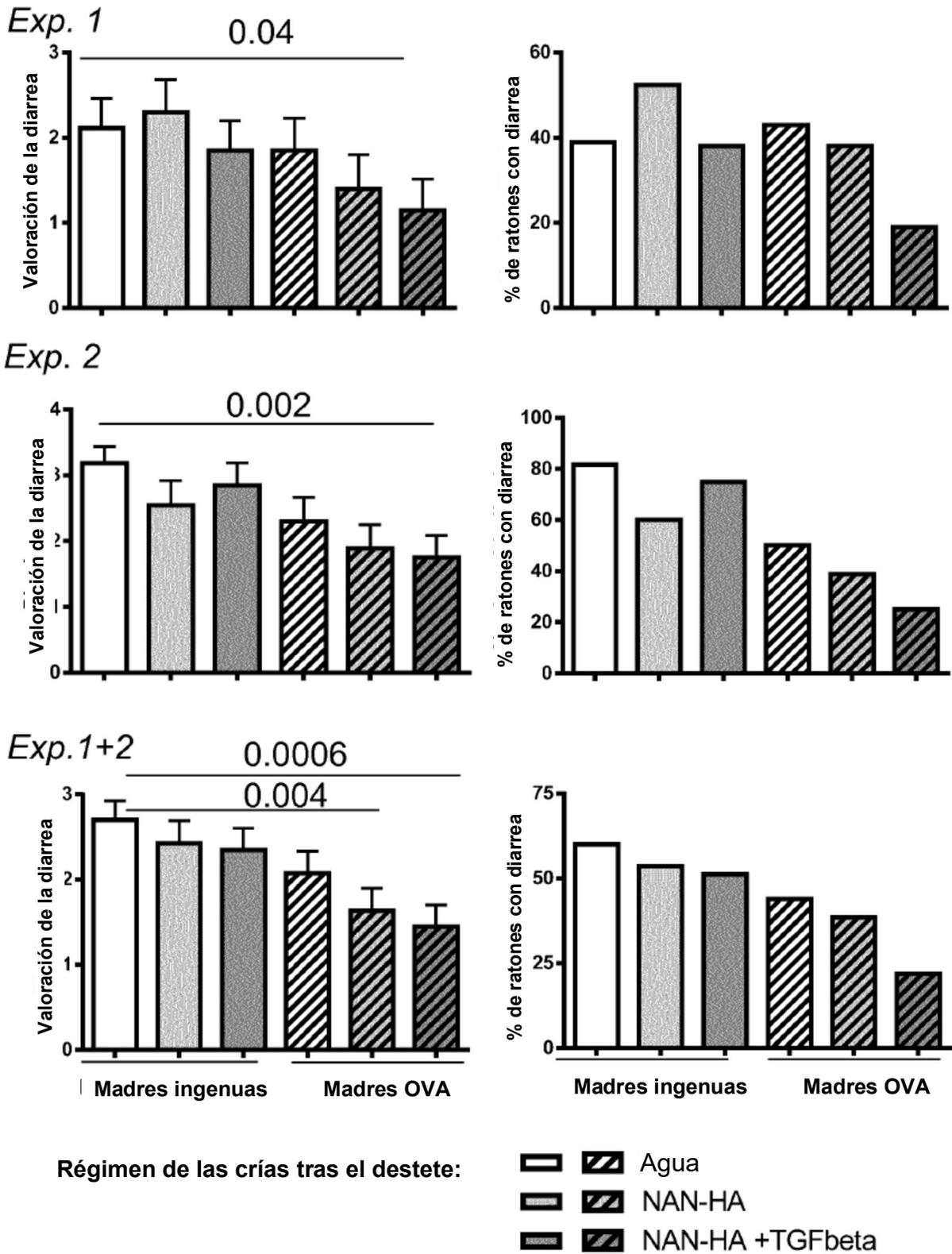


Fig. 1