



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0610949-7 A2**

(22) Data de Depósito: 17/03/2006  
(43) Data da Publicação: 03/08/2010  
(RPI 2065)



**(51) Int.Cl.:**  
A23L 1/29  
A23L 1/305  
A23J 3/34

(54) Título: **FÓRMULA INFANTIL PARCIALMENTE  
HIDROLISADA DE BAIXA LACTOSE**

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2005 US 11/142,544

(73) Titular(es): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

(72) Inventor(es): David A. Wynsen, Gabor Puski, Jon Vanderhoof,  
Khaled A. Khatib, Nagendra Rangavajla, Robert A. Burns, Win-Chin  
Chiang

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006010048 de 17/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/130204 de 07/12/2006

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a uma fórmula infantil parcialmente hidrolisada de baixa lactose. O componente de carboidratos da fórmula infantil compreende entre cerca de 0% e 60% de lactose e o componente de proteínas da fórmula infantil compreende proteína do soro do leite e caseína parcialmente hidrolisadas, tendo o componente de proteínas um peso molecular particular.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "FÓRMULA  
INFANTIL PARCIALMENTE HIDROLISADA DE BAIXA LACTOSE".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a fórmulas infantis parcialmente  
5 hidrolisadas de baixa lactose.

Antecedentes

A alergia alimentar é uma síndrome clínica imunologicamente  
mediada que se desenvolve após a ingestão de um produto dietético. A rea-  
ção adversa que acompanha a alergia alimentar é freqüentemente uma rea-  
10 ção imediata mediada pela imunoglobulina (IgE), de outro modo conhecida  
como alergia alimentar à proteína. Host, A., *et al.*, *Dietary Products Used in  
Infants for Treatment and Prevention of Food Allergy*, Arch. Dis. Child 81:80-  
84 (1999). Os sintomas de alergia alimentar à proteína incluem angioedema,  
urticária, eczema, asma, rinite, conjuntivite, vômito ou anafilase.

15 A alergia ao leite de vaca é a alergia alimentar à proteína mais  
comum em crianças jovens e ocorre em cerca de 2% a 3% de todos os lac-  
tentes. Sampson, H.A., *Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and Clini-  
cal Disorders*, J Allergy Clin Immunol. 103:717-728 (1999). Uma possível  
explicação para a prevalência de alergia ao leite de vaca dentre as crianças  
20 é que a proteína de leite de vaca intacta, que é encontrada nas fórmulas in-  
fantis mais convencionais, é o alérgeno mais precoce e mais comum que os  
lactentes estão expostos. Em adição, os lactentes podem ser especialmente  
suscetíveis à alergia ao leite de vaca porque a sua mucosa intestinal tem  
uma maior permeabilidade à macromoléculas incompletamente digeridas do  
25 que os adultos. Moran R., *Effects of Prolonged Exposure to Partially Hy-  
drolyzed Milk Protein*, J. Pediatr. 121:S90-S4 (1992).

Embora não haja tratamento conhecido que possa curar comple-  
tamente a alergia ao leite de vaca, pode ser possível evitar ou diminuir a a-  
lergia ao leite de vaca e a outras alergias em lactentes através do consumo  
30 de fórmulas de proteínas hidrolisadas. Foi mostrado que o consumo de fór-  
mulas infantis tendo proteínas parcial e extensivamente hidrolisadas em lu-  
gar de fórmulas convencionais tendo apenas proteínas intactas pode reduzir

o risco de futuras alergias em lactentes. *Id.* Assim, se um infante tiver uma história familiar de alergias, o consumo de fórmulas de proteínas hidrolisadas pode reduzir o risco daquela criança desenvolver uma alergia no futuro.

Fórmulas de proteínas hidrolisadas podem ser caracterizadas  
 5 como extensivamente hidrolisadas ou parcialmente hidrolisadas. As fórmulas infantis contendo proteínas extensivamente hidrolisadas (EHF) são baseadas em leite de vaca, mas as proteínas foram tratadas com enzimas para decompor a maioria das proteínas que causam os sintomas relacionados à alergia. Um exemplo de uma EHF comercialmente disponível é Enfamil® Nutramigen®. Ela é uma fórmula infantil hipoalergênica para lactentes a termo  
 10 que são sensíveis às proteínas intactas em fórmulas de leite de vaca e de soja. Fórmulas infantis contendo proteínas parcialmente hidrolisáveis (PHF), por outro lado, foram tratadas com enzimas para decomponham apenas algumas das proteínas do leite.

15 Idealmente, qualquer fórmula infantil, incluindo PHF, deveria simular o leite humano tão proximamente quanto possível. No leite humano, há duas proteínas principais, proteína do soro e caseína. A proteína do soro do leite tipicamente compõe cerca de 60% da proteína no leite humano, enquanto que a caseína compõe cerca de 40%. Lonnerdal, B., *Biochemistry and Physiological Functions of Human Milk Proteins*, Am. J. Clin. Nutr.  
 20 42:1299-1317 (1985).

Em adição a simulação da quantidade de proteína no leite humano, um PHF não deveria causar ou exacerbar as dificuldades na absorção de carboidratos. O carboidrato principal na fórmula infantil baseada em  
 25 leite é a lactose. A lactose é um dissacarídeo de glicose e galactose e a enzima lactase é requerida para o corpo digerir a lactose. Se a lactase, que está localizada na membrana superficial das células epiteliais intestinais, não estiver presente em quantidades suficientes, o corpo pode ser incapaz de digerir completamente a lactose. Esta condição, que é comumente conhecida como intolerância à lactose, pode conduzir a sintomas tais como distensão abdominal, gases, cólicas e diarreia.

30 Uma forma de evitar os efeitos colaterais indesejáveis da intole-

rância à lactose é fornecer uma fórmula infantil de baixa lactose para suplementação nutricional ou substituição do leite humano. Uma fórmula infantil de baixa lactose tipicamente tem uma pequena percentagem de carboidratos contendo lactose. A quantidade de carboidrato restante é derivada de qualquer fonte, tal como sólidos de xarope de milho.

Várias fórmulas infantis foram descritas, mas nenhuma proporcionou os benefícios combinados da presente invenção. Por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.405.637 concedida à Martinez, *et al.* refere-se a um hidrolisado parcial de proteína de leite e fórmula infantil contendo o mesmo. A patente não descreve, no entanto, uma fórmula infantil tendo um teor de lactose entre cerca de 0% e 60%. Adicionalmente, embora a referência descreva um grau de hidrólise entre cerca de 6 e 9%, o hidrolisado de proteína da referência de Martinez não descreve tendo o peso molecular do hidrolisado de proteína empregado na presente invenção.

A Patente U.S. Nº 6.777.931 concedida a Kratky refere-se a uma fórmula infantil tendo um baixo teor de treonina. Embora a referência discuta o uso de proteína do soro do leite e caseína, a proteína do soro do leite usada é modificada de tal modo que o caseíno-glio-macropéptídeo (cGMP) foi removido. Adicionalmente, a referência não descreve uma fórmula infantil tendo um hidrolisado parcial com o perfil de peso molecular particular como na presente invenção.

A patente U.S. Nº 6.162.472 concedida a Griffin, *et al.*, refere-se a uma fórmula infantil compreendida por caseína e proteína do soro do leite e tendo um teor de lactose menor do que 20%, mas não descreve uma fórmula de hidrolisado parcial.

A Patente Nº 6.171.621 concedida a Braun, *et al.*, a Patente U.S. 6.863.918 concedida a Bindels, *et al.*, e a Patente U.S. 6.194.009 concedida a Kamarel todas referem-se a várias fórmulas infantis e produtos nutricionais baseados em hidrolisados de proteína. Adicionalmente, os hidrolisados parciais das várias patentes não descrevem hidrolisados com o peso molecular empregado no presente pedido.

### Sumário da Invenção

Resumidamente, a presente invenção é dirigida a uma nova fórmula infantil compreendendo um componente de carboidratos composto de entre cerca de 0% e 60% de lactose, em que as referidas percentagens  
 5 são baseadas no peso total dos carboidratos presentes na fórmula; e um componente de proteínas de proteína do soro do leite e caseína parcialmente hidrolisadas, em que a relação de proteína do soro do leite para caseína situa-se entre cerca de 50:50 e 70:30 e em que o hidrolisado de proteína tem os peptídeos distribuídos sobre a faixa da distribuição de peso molecular,  
 10 como uma função da sua massa molar, conforme está mostrado na Tabela 1.

Tabela 1

| Massa Molar<br>(em Daltons) | % da Distribuição de<br>Peso Molecular |
|-----------------------------|----------------------------------------|
| < 500                       | 11-20                                  |
| 500-1000                    | 25-38                                  |
| 1000-2000                   | 27-30                                  |
| 2000-3000                   | 8-16                                   |
| 3000-5000                   | 3-10                                   |
| > 5000                      | 2-11                                   |

Dentre as várias vantagens descobertas serem obtidas através da presente invenção, o hidrolisado parcial de proteína do leite tem uma  
 15 composição de proteínas similar àquela do leite humano, e melhor sabor, e melhores propriedades emulsificantes. Adicionalmente, a presente invenção induz um efeito ativador menor para a resposta do anticorpo IgC do que o leite de vaca intacto. Assim, a presente invenção pode ter um reduzido potencial imunogênico.

### 20 Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Referência irá agora ser feita em detalhes às modalidades da invenção, um ou mais exemplos das quais estão apresentados abaixo. Cada exemplo é fornecido a título de explicação da invenção, não de limitação da invenção. Na realidade, será evidente apara aqueles versados na técnica

que várias modificações e variações podem ser feitas na presente invenção sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Por exemplo, as características ilustradas ou descritas como parte de uma modalidade podem ser usadas em outra modalidade para produzir ainda uma modalidade adicional.

5 Assim, pretende-se que a presente invenção cubra tais modificações e variações como estando dentro do escopo das reivindicações anexas e seus equivalentes. Outros objetos, características e aspectos da presente invenção são descritos ou ficam óbvios pela descrição detalhada a seguir. Deve ser entendido por alguém versado na técnica que a presente  
10 discussão é uma descrição de modalidades exemplares, e não se pretende que seja limitadora de aspectos mais amplos da presente invenção.

#### Definições

Conforme usado neste relatório, o termo "baixa lactose" significa um teor de lactose menor do que 100%, incluindo 0% de lactose.

15 O termo "grau de hidrólise" significa a extensão na qual as ligações peptídicas são rompidas por uma reação de hidrólise enzimática. A medição mostra que o número de ligações peptídicas específicas rompidas na hidrólise como uma percentagem do número total de ligações peptídicas específicas presentes na proteína intacta.

20 O termo "probiótico" significa um microorganismo que exerce efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro.

Conforme usado neste relatório, o termo "prebiótico" significa um ingrediente de alimento não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou de um  
25 número limitado de bactérias no cólon que pode melhorar a saúde do hospedeiro.

O termo "paciente" significa qualquer mamífero, preferencialmente um ser humano.

Conforme usado neste relatório, o termo "lactente" significa um  
30 ser humano com menos do que cerca de um ano de idade.

Conforme usado neste relatório, o termo "fórmula infantil" significa uma composição que satisfaz as necessidades de nutrientes de um lac-

tente sendo um substituto do leite humano. Nos Estados Unidos, o conteúdo de uma fórmula infantil é ditado pelos regulamentos federais descritos em C.F.R. 21, Seções 100, 106 e 107. Esses regulamentos definem níveis de macronutrientes, vitaminas, minerais, e de outros ingredientes em um esforço para estimular as propriedades nutricionais e outras propriedades do leite do seio humano.

#### Invenção

De acordo com a presente invenção, foi descoberta uma nova fórmula infantil. A fórmula infantil tem um baixo teor de lactose e compreende uma mistura de proteína do soro do leite e caseína parcialmente hidrolisadas. O hidrolisado parcial de proteína da fórmula infantil tem uma distribuição de peso molecular específica e única que resulta em um produto que é distinto da técnica anterior.

A presente invenção fornece uma relação da proteína do soro do leite:caseína que é similar àquela encontrada no leite do seio humano. Em uma modalidade particular, a relação de proteína do soro do leite:caseína situa-se entre cerca de 50:50 e 70:30. Em uma outra modalidade, a relação de proteína do soro do leite:caseína é de cerca de 60:40.

A proteína do soro do leite usada na presente invenção pode ser obtida de qualquer fonte conhecida na técnica. Em uma modalidade, a proteína do soro do leite pode ser obtida de um soro do leite bruto obtido da fabricação de queijo doce, de concentrado de proteína do soro do leite (WPC) que é obtido através de ultrafiltração (soro do leite UF), através de troca iônica e/ou eletroforese (soro do leite ED) ou de isolado de soro do leite que foi tratado para reduzir o teor de lactose do soro do leite.

A caseína usada na presente invenção pode ser também obtida de qualquer fonte conhecida na técnica. Por exemplo, a caseína pode ser caseína de ácido ou sólidos de leite sem gordura (NFM).

Ambas a proteína do soro do leite e a caseína podem ser diluídas ou reconstituídas a soluções contendo entre cerca de 20% e 25% de sólidos totais, e entre cerca de 40% e 50% de proteína em uma base seca.

Na presente invenção, o componente de carboidratos compre-

ende entre cerca de 0% e 60% de lactose. Em uma outra modalidade da presente invenção, o componente de carboidratos compreende entre cerca de 15% e 55% de lactose. Ainda em uma outra modalidade da presente invenção, o componente carboidratos compreende entre cerca de 20% e 30% de lactose. Em uma modalidade particular da invenção, o componente e carboidrato compreende cerca de 1 e 25% de lactose. Nessas modalidades, a fonte restante de carboidratos pode ser qualquer fonte de carboidratos conhecida na técnica, tais como lactose, glicose, sólidos de xarope de milho, maltodextrinas, sacarose, amido, sólidos de xarope de arroz, e similares. Em uma modalidade particular, o componente de carboidratos compreende cerca de 25% de lactose e cerca de 75% de sólidos de xarope.

A lactose pode ser adicionada à fórmula infantil ou pode estar naturalmente presente nos componentes da fórmula infantil. Em uma modalidade da invenção, está naturalmente presente no hidrolisado seco. Nesta modalidade, entre cerca de 30% e 70% do hidrolisado seco pode ser constituído por carboidratos. Em uma modalidade particular, cerca de 50% do hidrolisado são constituídos por carboidratos.

Em uma modalidade da invenção, o teor de lactose pode ser 0%. Nesta modalidade, o hidrolisado pode ser tratado usando qualquer método conhecido na técnica para remoção do seu conteúdo de lactose. Alternativamente, os ingredientes da proteína do leite que são livres de lactose podem ser usados para preparar a fórmula infantil.

Na presente invenção, as proteínas são hidrolisadas usando uma enzima proteolítica, Protease N. Protease N "Amano" é fornecida comercialmente por Amano Enzyme U.S.A. Co., Ltd., Elgin, IL. Protease N é uma preparação de enzima proteolítica que é obtida da espécie bacteriana *Bacillus subtilis*. O pó de protease é especificado como "não menos do que 150.000 unidades/g" significando que uma unidade de Protease N é a quantidade de enzima que produz um aminoácido equivalente a 100 microgramas de tirosina por 60 minutos em um pH de 7,0. Para produzir a fórmula infantil da presente invenção, a Protease N pode ser usada em níveis de cerca de 0,5% a cerca de 1,0% em peso da proteína total sendo hidrolisada.



A hidrólise da proteína pela Protease N é tipicamente conduzida em uma temperatura de cerca de 50°C a cerca de 60°C. A hidrólise ocorre por um período de tempo de tal modo a obter um grau de hidrólise entre cerca de 4% e 10%. Em uma modalidade particular, a hidrólise ocorre por um período de tempo de tal modo a obter um grau de hidrólise entre cerca de 6% e 9%. Em uma outra modalidade, a hidrólise ocorre por um período de tempo de tal modo a obter um grau de hidrólise de cerca de 7,5%. Este nível de hidrólise pode levar entre cerca de meio hora a cerca de 3 horas.

Um pH constante deveria ser mantido durante a hidrólise. No método da presente invenção, o pH é ajustado e mantido entre cerca de 6,5 e 8,0. Em uma modalidade particular, o pH é mantido em cerca de 7,0.

A fim de manter o pH ótimo da superfície de proteína do soro do leite, caseína, água e Protease N, uma solução cáustica de hidróxido de sódio e/ou hidróxido de potássio pode ser usada para ajustar o pH durante a hidrólise. Se for usado hidróxido de sódio para ajustar o pH, a quantidade de hidróxido de sódio adicionada à solução deveria ser controlada ao nível de que ela compreenda menos do que cerca de 0,3% do sólido total no hidrolisado de proteína acabado. Uma solução de hidróxido de potássio a 10% pode ser também usada para ajustar o pH da solução ao valor desejado, antes da enzima ser adicionada ou durante o processo de hidrólise a fim de manter o pH ótimo.

A quantidade de solução cáustica adicionada à solução durante a hidrólise da proteína pode ser controlada por um aparelho titulador (pH-stat) ou pela adição de solução cáustica contínua e proporcionalmente. O hidrolisado pode ser produzido através de processos em batelada padrões ou através de processos contínuos.

Para melhor assegurar a consistente qualidade do hidrolisado parcial de proteína, o hidrolisado é submetido à desativação da proteína para terminar o processo de hidrólise. A etapa de desativação da enzima pode consistir em incluir um tratamento térmico em uma temperatura de cerca de 82°C por cerca de 10 minutos. Alternativamente, a enzima pode ser desativada por aquecimento da solução a uma temperatura de cerca de 92°C por

cerca de 5 segundos. Após a desativação da enzima estar completa, o hidrolisado pode ser estocado em um estado líquido em uma temperatura mais baixa do que 10°C.

Em uma modalidade da presente invenção, o hidrolisado parcial de proteína líquido feito de acordo com os métodos descritos neste relatório pode ser usado como está e misturado com outros ingredientes para fazer uma fórmula infantil. Alternativamente, o hidrolisado parcial de proteína pode ser produzido na forma de pó através de secagem por atomização do hidrolisado líquido. O hidrolisado seco por atomização pode então ser incorporado em uma fórmula infantil. Em uma outra modalidade, o hidrolisado parcial líquido pode ser concentrado por evaporação e a seguir seco por atomização. Novamente, o hidrolisado seco por atomização pode ser incorporado em uma fórmula infantil. Uma fórmula infantil tendo as proteínas parcialmente hidrolisadas descritas podem ser formuladas usando qualquer um dos métodos de formulação de fórmula infantil conhecidos na técnica.

A fórmula infantil da presente invenção pode ser nutricionalmente completa e tipicamente contém tipos e quantidades adequadas de lipídeos, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais. A quantidade de lipídeo ou gordura tipicamente pode variar de cerca de 3 a cerca de 7g/10Kcal. Fontes líquidas podem ser conhecidas na técnica, incluindo óleos vegetais tais como azeite de dendê, óleo de soja, palmoleína, óleo de coco, óleo de triglicerídeos de cadeia média, óleo de girassol de alto teor de ácido oléico, óleo de açafroa de alto teor de ácido oléico, e similares. A quantidade de proteína tipicamente pode variar de cerca de 1 a cerca de 5 g/100 kcal. A quantidade de carboidrato tipicamente pode variar de cerca de 8 a cerca de 12 g/100 kcal.

A fórmula infantil pode incluir um probiótico. Qualquer probiótico conhecido na técnica será aceitável nesta modalidade. Em uma modalidade particular, o probiótico é escolhido do grupo consistindo em *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

Em uma outra modalidade da invenção, a fórmula infantil pode conter um ou mais probióticos. Qualquer probiótico conhecido na técnica

será aceitável nesta modalidade. Prebióticos da presente invenção podem incluir lactulose, galacto-oligossacarídeo, fruto-oligossacarídeo, isomalto-oligossacarídeo, oligossacarídeos de soja, lactossacarose, xilo-oligossacarídeo, e gentio-oligossacarídeos.

5                   Em outras modalidades da presente invenção, a fórmula infantil pode conter outros componentes tais como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCAPUFA). LCPUFAs adequados incluem, mas não são limitados a, ácido  $\alpha$ -linoléico, ácido  $\gamma$ -linoléico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA). Em uma modalidade, a fórmula infantil contém DHA. Em  
10                   uma outra modalidade, a fórmula infantil contém ARA. Ainda em uma outra modalidade, a fórmula infantil da invenção contém ambos o DHA e o ARA.

                  Em uma modalidade, ambos o DHA e o ARA são incorporados na fórmula infantil da presente invenção. Nesta modalidade, a relação em  
15                   peso de ARA:DHA é tipicamente de cerca de 1:3 a cerca de 9:1. Alternativamente, esta relação pode ser de cerca de 1:2 a cerca de 4:1. Ainda em outra alternativa, a razão pode ser de cerca de 2:3 a cerca de 2:1. Em uma modalidade particular a relação é de cerca de 2:1.

                  A quantidade efetiva de DHA em uma modalidade da presente  
20                   invenção é tipicamente de cerca de 3 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 150 mg por kg de peso corporal por dia. Em uma modalidade da invenção, a quantidade de DHA é de cerca de 6 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 100 mg por kg de peso corporal por dia. Em uma outra modalidade, a quantidade é de cerca de 10 mg por kg de peso corporal por  
25                   dia a cerca de 60 mg de peso corporal por dia. Ainda em uma outra modalidade, a quantidade é de cerca de 15 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 30 mg por kg de peso corporal por dia.

                  A quantidade de DHA em fórmulas infantis para uso com a presente invenção tipicamente varia de cerca de 5 mg/100 kcal a cerca de 80  
30                   mg/100 kcal. Em uma modalidade da presente invenção a quantidade de DHA varia de cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 50 mg/100 kcal; e em uma outra modalidade ela varia de cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 20

mg/100 kcal. Em uma modalidade particular da presente invenção, a quantidade de DHA é de cerca de 17 mg/100 kcal.

A quantidade efetiva de ARA em uma modalidade da presente invenção é tipicamente de cerca de 5 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 150 mg por kg de peso corporal por dia. Em uma modalidade da presente invenção, a quantidade de ARA varia de cerca de 10 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 120 mg por kg de peso corporal por dia. Em uma outra modalidade, a quantidade varia de cerca de 15 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 90 mg por kg de peso corporal por dia. Ainda em uma outra modalidade, a quantidade varia de cerca de 20 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 60 mg por kg de peso corporal por dia.

A quantidade de ARA em fórmulas infantis para uso com a presente invenção tipicamente varia de cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 100 mg/100 kcal. Em uma modalidade da presente invenção, a quantidade de ARA varia de cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 70 mg/100 kcal. Em uma outra modalidade a quantidade de ARA varia de cerca de 20 mg/100 kcal a cerca de 40 mg/100 kcal. Em uma modalidade particular da presente invenção, a quantidade de ARA é de cerca de 34 mg/100 kcal.

DHA e ARA podem ser suplementados na presente invenção usando técnicas padrões conhecidas na técnica. Por exemplo, DHA e ARA podem ser adicionados ao suplemento ou fórmula pela substituição de uma quantidade equivalente de um óleo, tal como óleo de girassol de alto teor de ácido oléico, normalmente presente na fórmula. Como um outro exemplo, os óleos contendo DHA e ARA podem ser adicionados ao suplemento ou fórmula pela substituição de uma quantidade equivalente do resto da mistura total de gorduras normalmente presente na fórmula sem DHA e ARA.

A fonte de DHA e ARA pode ser qualquer fonte conhecida na técnica. Em uma modalidade da presente invenção, fontes de DHA e ARA são óleos de célula única conforme ensinados nas Patentes U.S. Nºs 5.374.567; 5.550.156 e 5.397.591 cujas descrições são incorporadas neste relatório na sua totalidade por referencia. Entretanto, a presente invenção não é limitada a tais óleos apenas. DHA e ARA podem estar na forma natu-

ral ou refinada.

Em uma modalidade, a fonte de DHA e ARA é substancialmente livre de ácido eicopentaenóico (EPA). Por exemplo, em uma modalidade da presente invenção a fórmula infantil contém menos do que cerca de 16 mg de EPA/100 kcal; em uma outra modalidade menos do que cerca de 10 mg de EPA/100 kcal; e ainda em uma outra modalidade menos do que cerca de 5 mg de EPA/100 kcal. Uma modalidade particular não contém substancialmente EPA. Uma outra modalidade é livre de EPA pelo fato de mesmo traços de EPA estarem ausentes da fórmula.

A fórmula infantil da presente invenção tem uma distribuição de peso molecular particular. Esta distribuição de peso molecular demonstrou qualidades aceitáveis de emulsificação e sabor quando comparada com as de outros hidrolisados parciais encontrados na técnica anterior. Em adição, a distribuição de peso molecular particular demonstrou induzir a menor efeito de anticorpo IgC no soro do que a proteína de leite intacta.

Em uma modalidade da presente invenção, o hidrolisado parcial feito de acordo com os métodos descritos neste relatório pode ser incorporado em um suplemento nutricional. O hidrolisado parcial de proteína pode ser usado na forma líquida e misturado com outros ingredientes para fazer um suplemento nutricional líquido. Alternativamente, o hidrolisado parcial de proteína pode ser seco por atomização e incorporado em um suplemento nutricional em pó. Um suplemento nutricional tendo as proteínas parcialmente hidrolisadas pode ser formulado usando qualquer um dos métodos de formulação de suplemento nutricional conhecido na técnica.

Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi usada para determinar a distribuição de peso molecular dos peptídeos do hidrolisado criados pelo processo de hidrólise presentemente descrito. Especificamente, uma quantidade suficiente da fórmula infantil em pó foi pesada para fornecer 0,5 grama de proteína em um tubo centrífugo cônico de 50 ml. Água foi adicionada para completar o volume do tubo a 45 ml. A mistura foi colocada em um Misturador Sarsted D-5223 e misturada por uma hora. Após a mistura, foi criada uma solução de proteína a 1% pela adição de outros 5 ml de água ao

tubo. Um padrão estoque foi preparado e misturado também por uma hora.

Separadamente, foram adicionadas 14,91 gramas de cloreto de potássio (KCl) a um béquer de 1000 ml. O KCl foi dissolvido pela adição de 700 ml de água ao béquer. 250 ml de acetonitrila e 1,0 ml de ácido trifluoracético foram então adicionados à solução de KCl (eluente). O pH foi ajustado para 3,0 usando uma solução 0,2M de  $K_2HPO_4$ .

Uma garrafa de reagente HPCL foi enchida e a garrafa foi lavada com eluente, reservando cerca de 50 ml para diluição de amostras e padrões. As linhas do Hitachi L-6200 A Intelligent Pump foram purgadas com eluente e as colunas foram equilibradas com eluente por uma hora.

Após as amostras terem sido misturadas por uma hora, 5,0 ml de cada amostra foram pipetados para tubos de vidro com tampa rosqueada. 5,0 ml de diclorometano foram também pipetados para cada tubo. Os tubos foram tampados e misturados por inversão quatro vezes. As amostras foram então centrifugadas por cinco minutos a 200 x g.

Enquanto as amostras estavam na centrífuga, os padrões estoque 1-5 foram diluídos com eluente (800  $\mu$ l + 3200  $\mu$ l). Aproximadamente 1 ml de cada padrão foi pipetado para cada um de dois frascos auto-amostradores e tampados.

A camada superior (aquosa) das amostras centrifugadas 1-10 foram diluídas com eluente (100  $\mu$ l + 900  $\mu$ l). Os frascos foram carregados na bandeja do auto-amostrador como a seguir: branco, padrão, amostras e segundo padrão. A esteira foi colocada no auto-amostrador Hitachi. O número total de frascos a serem entrados no programa do auto-amostrador usando as teclas na frente do auto-amostrador e as amostras foram testadas. Os resultados indicaram o perfil de peso molecular da proteína.

Em uma modalidade, o hidrolisado parcial da invenção tem um peso molecular médio de 2.000 com a faixa de distribuição de peso molecular mostrado na Tabela 1, acima.

Em uma outra modalidade, o hidrolisado parcial da invenção tem a distribuição de peso molecular mostrado na Tabela 2.

Tabela 2

| Massa Molar<br>(em Daltons) | % da Distribuição de<br>Peso Molecular |
|-----------------------------|----------------------------------------|
| < 500                       | 17                                     |
| 500-1000                    | 35,1                                   |
| 1000-2000                   | 30,9                                   |
| 2000-3000                   | 9,6                                    |
| 3000-5000                   | 4,2                                    |
| > 5000                      | 2,8                                    |

Os exemplos a seguir descrevem várias modalidades da presente invenção. Outras modalidades dentro do escopo das reivindicações neste relatório serão evidentes para alguém versado na técnica pela consideração do relatório ou prática da invenção conforme descrito neste relatório. É pretendido que o relatório, juntamente com os exemplos, sejam considerados exemplares apenas, com o escopo e espírito da invenção sendo indicado pelas reivindicações a seguir aos exemplos. Nos exemplos, todas as porcentagens são dadas em uma base em peso a menos que indicado em contrário.

#### Exemplo 1

Este exemplo ilustra um método de produção de um hidrolisado parcial de proteína. Inicialmente, 60,3 kg de sólidos não leite (leite em pó) e 37,4 kg de concentrado de soro do leite (60%) foram intermisturados em um tanque contendo água a 54°C. A suspensão tinha um teor de sólidos entre 20% e 23%. O pH da suspensão foi então medido. Hidróxidos de sódio e potássio foram adicionados à suspensão para ajustar o pH da suspensão a 7,0. Após ajustar o pH, 0,5 kg de enzima Amano N foi adicionado à suspensão. A seguir à adição de Amano N à suspensão, o pH foi continuamente ajustado a um pH de 7,0 usando hidróxido de sódio e hidróxido de potássio. A quantidade total de hidróxido de sódio adicionado à amostra foi de 0,3 kg. A quantidade total de hidróxido de potássio adicionado à suspensão foi de 1,5 kg.

A hidrólise foi permitida ocorrer por 90 minutos, o tempo iniciando com a adição de enzima Amano N à suspensão. Após o fim dos 90

minutos, a suspensão foi tratada termicamente para inativar a enzima. O tratamento térmico consistiu em elevar a temperatura da suspensão a 82°C por 10 minutos. O grau de hidrólise obtido neste exemplo foi entre 6% e 9%. A suspensão foi então resfriada e seca por atomização para obter um hidrolisado em pó.

### Exemplo 2

Este exemplo ilustra uma modalidade de ingredientes que podem ser usados para preparar a fórmula infantil da presente invenção.

Tabela 3: Receita de uma Modalidade do Hidrolisado

| Ingrediente                              | Kg por 100 kg de hidrolisado seco |
|------------------------------------------|-----------------------------------|
| Sólidos de leite sem gordura             | 60,3                              |
| Concentrado de proteína de soro do leite | 37,4                              |
| Hidróxido de potássio                    | 1,5                               |
| Enzima (Amano N)                         | 0,5                               |
| Hidróxido de sódio                       | 0,3                               |

Vitaminas podem ser adicionadas aos ingredientes da Tabela 3. Exemplos de vitaminas que podem ser adicionadas à fórmula incluem vitamina A, vitamina D<sub>3</sub>, vitamina K<sub>1</sub>, tiamina, riboflavina, cloridrato de vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, niacinamida, ácido fólico pantotenato de cálcio, biotina e ácido ascórbico.

Minerais podem ser também adicionados aos ingredientes da Tabela 3. Exemplos de minerais que podem ser adicionados à fórmula incluem fosfato de cálcio, glicerofosfato de cálcio, gluconato de cálcio, citrato de sódio, cloreto de potássio, citrato de potássio, fosfato de potássio, fosfato de magnésio, sulfato ferroso, sulfato de zinco e sulfato cúprico.

### Exemplo 3

Este exemplo ilustra o efeito ativador para a resposta do anticorpo IgG do hidrolisado parcial de proteína obtido no Exemplo 1. Trezentos e vinte e três lactentes foram estudados em sete práticas pediátricas localizadas por todo os Estados Unidos. Os pacientes eram lactentes a termo saudáveis envolvidos logo após o nascimento.



Os lactentes cujas mães indicaram a sua intenção de alimentar pelo seio foram designados para o grupo A. Aqueles lactentes cujas mães elegeram não alimentar pelo seio foram aleatoriamente designados de um modo duplo-cego ao grupo B ou C. Os lactentes do grupo B receberam uma fórmula infantil compreendendo o hidrolisado parcial de proteína obtido no Exemplo 1. Os lactentes do grupo C receberam uma fórmula baseada em leite dominante em proteína do soro comercialmente disponível (Enfamil, fornecida por Mead Johnson Co., Evansville, IN). Ambas as fórmulas continham as mesmas quantidades de proteína, carboidrato e gordura.

Os lactentes foram avaliados em intervalos mensais de até 4 meses de idade em todos os locais, e em 6 e 8 meses de idade para detecção em três dos sete locais. Sangue foi colhido na admissão e em 3, 6 e 8 meses de idade para detecção de anticorpos no soro ao leite. Anticorpos de proteína antileite IgE foram quantificados por um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima de biotina-avidina; anticorpos de proteína antileite IgG foram determinados pelo uso de um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima descrito em Burks, *et al*, Burks, A,W,. *et al*,. *Antibody Response to Milk Protein in Patients with Milk Protein Intolerance Documented by Challenge*, J, Allergy Clin, Immunol, 85:921-927 (1990). Sangue adicional foi colhido para determinar os níveis séricos de ferritina e hemoglobina e determinar hematócrito nos lactentes que foram examinados aos 8 meses de idade.

A concentração média de anticorpos IgG ao leite no soro foi comparável em todos os grupos na hora de admissão ao estudo. Entretanto, os aumentos de anticorpos IgG ao leite no soro foram significativamente maiores no grupo de lactentes alimentados com a fórmula C do que aqueles alimentados com leite do seio (grupo A) ou fórmula B. Esta concentração mais baixa de anticorpos IgG ao leite no grupo B indica um maior efeito ativador da proteína do leite de vaca intacta para as respostas do anticorpo IgG (grupo C). Assim, pode haver um potencial imunogênico reduzido das proteínas parcialmente hidrolisadas do leite do grupo B.

Na hora do alistamento, não foram encontradas diferenças significativas dentre os três grupos nas concentrações médias de anticorpos IgE

ao leite no soro. Além disso, não houveram diferenças significativas nos níveis de IgE dentre os regimes de alimentação por todo o estudo. Os valores médios de ferritina, hematócrito e hemoglobina estavam dentro da faixa normal de 8 meses de idade, e não foram encontradas diferenças significativas dentre os três grupos.

5

#### Exemplo 4

Este exemplo ilustra uma modalidade particular de uma fórmula infantil suplementada com o hidrolisado parcial de proteína preparado de acordo com o processo da presente invenção. Neste exemplo, a lactose compreende cerca de 23,5% do componente de carboidratos.

10

Tabela 4: Informação de Nutrientes para a Fórmula Infantil

| Ingrediente                                    | Por 100 kg |
|------------------------------------------------|------------|
| Sólidos de xarope de milho                     | 44,256 kg  |
| Sólidos de NFM e WPC parcialmente hidrolisadas | 26,865 kg  |
| Mistura de gorduras                            | 26,628 kg  |
| Mistura de óleos de ARA e DHA de células única | 0,709 kg   |
| Carbonato de cálcio                            | 0,400 kg   |
| Fosfato de Cálcio, tribásico                   | 0,200 kg   |
| Cloreto de Potássio                            | 0,200 kg   |
| Cloreto de Colina                              | 0,134 kg   |
| Fosfato de magnésio                            | 0,100 kg   |
| L-Carnitina                                    | 0,010 kg   |
| Ácido Ascórbico                                | 162,900 g  |
| Inositol                                       | 39,887 g   |
| Taurina                                        | 33,875 g   |
| Acetate de tocoferol                           | 25,278 g   |
| Vitamina A                                     | 7,871 g    |
| Niacinamida                                    | 6,475 g    |
| Vitamina K <sub>1</sub>                        | 5,454 g    |

| Ingrediente                    | Por 100 kg |
|--------------------------------|------------|
| Pantotenato de cálcio          | 3,299 g    |
| Vitamina B <sub>12</sub>       | 2,122 g    |
| Trituração de Biotina          | 1,608 g    |
| Vitamina D3                    | 0,969 g    |
| Riboflavina                    | 0,755 g    |
| Tiamina HCl                    | 0,601 g    |
| Piridoxina HCl                 | 0,518 g    |
| Ácido fólico                   | 0,122 g    |
| Heptaidrato de Sulfato ferroso | 49,600 g   |
| Lactose                        | 138,017 g  |
| Sulfato de Zinco               | 16,422 g   |
| Selenito de Sódio              | 0,018 g    |
| Sulfato Cúprico                | 1,688 g    |
| Sulfato de Manganês            | 0,239 g    |

Neste exemplo, a lactose encontra-se naturalmente presente nos sólidos de NFM e WPC parcialmente hidrolisadas. Mais especificamente, cerca de 50% dos sólidos de NFM e WPC parcialmente hidrolisadas são constituídos por lactose. Assim, a quantidade presente nesses sólidos de NFM e WPC é de aproximadamente 13,433 kg. Existe um adicional de 138,017 g de lactose presente na composição, Isto totaliza aproximadamente 13,571 g de lactose na fórmula infantil.

Existem 44,256 kg de sólidos de xarope presentes na fórmula infantil. O teor total de carboidratos total é de 57,827 kg, a lactose compreendendo apenas 13,571 kg daquele total. Portanto, a lactose compreende aproximadamente 23,5% do teor total de carboidratos.

Todas as referências citadas neste relatório, incluindo sem limitação, todos os ensaios, publicações, patentes, pedidos de patente, apresentações, textos, relatórios, manuscritos, brochuras, livros, postagens na internet, artigos em periódicos, e similares, são por meio deste incorporados por referência neste relatório nas suas totalidades. A discussão das referên-

cias neste relatório é pretendida meramente sumarizar as afirmações feitas pelos seus autores e não é feita admissão de que qualquer referência constitua a técnica anterior. Os depositantes reservam o direito de desafiar a precisão e a pertinência das referências citadas.

- 5                   Embora as modalidades preferidas da invenção tenham sido descritas usando termos, dispositivos e métodos específicos, tal descrição é para propósitos ilustrados apenas. As palavras usadas são palavras de descrição em vez de limitação. Deve ser entendido que mudanças e variações podem ser feitas por aqueles versados na técnica sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção, que está descrito nas reivindicações a seguir. Em adição, deve ser entendido que aspectos das várias modalidades podem ser intercambiados tanto no todo como em parte. Por exemplo, embora métodos para a produção de um a fórmula infantil líquida estéril feita de acordo com os métodos tenham sido exemplificados, outros usos são
- 10
- 15 contemplados. Portanto, o espírito e escopo das reivindicações anexas não deveriam ser limitados à descrição das versões preferidas lá contidas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Fórmula infantil, caracterizada pelo fato de que compreende:  
um componente de carboidratos que é constituído por entre cerca de 0% e 60% de lactose, baseado no peso total dos carboidratos presentes na fórmula infantil; e  
um componente de proteínas que é constituído por proteína do soro do leite e caseína parcialmente hidrolisadas, no qual a relação de proteína do soro do leite para caseína situa-se entre 50:50 e 70:30 e no qual o hidrolisado de proteína tem os peptídeos distribuídos sobre a seguinte faixa de distribuição de peso molecular como uma função da sua massa molar:

| Massa Molar (em Daltons) | % da Distribuição de Peso Molecular |
|--------------------------|-------------------------------------|
| < 500                    | 11-20                               |
| 500-1000                 | 25-38                               |
| 1000-2000                | 27-30                               |
| 2000-3000                | 8-16                                |
| 3000-5000                | 3-10                                |
| > 5000                   | 2-11                                |

2. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o hidrolisado de proteína tem os peptídeos distribuídos sobre a seguinte faixa de distribuição de peso molecular como uma função da sua massa molar:

| Massa Molar (em Daltons) | % da Distribuição de Peso Molecular |
|--------------------------|-------------------------------------|
| < 500                    | 17                                  |
| 500-1000                 | 35,1                                |
| 1000-2000                | 30,9                                |
| 2000-3000                | 9,6                                 |
| 3000-5000                | 4,2                                 |
| > 5000                   | 2,8                                 |

3. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a relação de proteína do soro do leite:caseína é de cerca de 60:40.
4. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracteriza-

da pelo fato de que o componente de carboidratos compreende entre cerca de 15% e 55% de lactose.

5 5. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente de carboidratos compreende entre cerca de 20% e 30% de lactose.

6. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente de carboidratos compreende cerca de 25% em peso de lactose e cerca de 75% em peso de sólidos de xarope de milho.

10 7. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o grau de hidrólise do componente de proteínas situa-se entre cerca de 4% e 10%.

15 8. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o grau de hidrólise do componente de proteínas situa-se entre cerca de 6% e 9%.

9. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fórmula infantil compreende adicionalmente pelo menos um probiótico.

20 10. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fórmula infantil compreende adicionalmente pelo menos um prebiótico.

11. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fórmula infantil compreende adicionalmente um LC-PUFA.

25 12. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o LCPUFA compreende DHA ou ARA.

13. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o LCPUFA compreende DHA e ARA.

30 14. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fórmula infantil está na forma de pó.

15. Fórmula infantil de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fórmula infantil está na forma líquida.

P10610949-7

## RESUMO

Patente de Invenção: **"FÓRMULA INFANTIL PARCIALMENTE HIDROLISADA DE BAIXA LACTOSE"**.

- 5 A presente invenção refere-se a uma fórmula infantil parcialmente hidrolisada de baixa lactose. O componente de carboidratos da fórmula infantil compreende entre cerca de 0% e 60% de lactose e o componente de proteínas da fórmula infantil compreende proteína do soro do leite e caseína parcialmente hidrolisadas, tendo o componente de proteínas um peso molecular particular.