



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

(21) PI 0721827-3 A2



* B R P I 0 7 2 1 8 2 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 05/07/2007

(43) Data da Publicação: 21/05/2013
(RPI 2211)

(51) Int.Cl.:

A23L 1/29

A23L 1/30

A23L 1/305

A23L 1/308

A61K 31/702

A61P 37/08

(54) Título: USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 04/08/2006 US 60/821461

(73) Titular(es): Shs International LTD

(72) Inventor(es): Catherine Teresa Deering, Ian Sullivan, Jane Elizabeth Langford, Sandra Helen Giffen

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007002520 de 05/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/015374de 07/02/2008

(57) Resumo: USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO.

A invenção diz respeito ao uso de composição que compreende aminoácidos livres como uma única fonte de proteína, uma fonte de ácido graxo que compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, uma fonte de carboidrato que compreende carboidratos digeríveis e indigeríveis e Bifidobactérias livres de proteína do leite para tratar uma pessoa que sofre de (a) cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração dificultosa, vômito, diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma; (b) alergia ao leite de vaca e/ou intolerância à proteína dos alimentos; e/ou (c) infecções, em que o carboidrato indigerível é selecionado de uma fonte livre de proteína do leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito à estimulação da saúde em lactentes que recebem uma fórmula com base em aminoácido.

5

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Em uma situação preferida, os lactentes são alimentados no peito pela mãe. Entretanto, frequentemente em lactentes, depois de um período inicial de serem alimentados no peito, a alimentação no peito é interrompida e a dieta do lactente compreende principalmente fórmula do leite para lactente.

10

Entretanto em um pequeno grupo de lactentes a alimentação no peito ou a alimentação de fórmula para lactente convencional resulta em reações adversas, tais como dor e reação alérgica. As pessoas que sofrem de uma alergia podem ter dificuldades em digerir ou metabolizar alguns constituintes alimentícios, que depois levam a reações alérgicas gastrointestinais e sistêmicas. As reações alérgicas são principalmente direcionadas à fração de proteína no alimento. Uma mudança significativa na dieta é frequentemente necessária para reduzir eventos adversos.

15

Para prevenir reações alérgicas à proteína, o alimento para lactente consiste de proteínas do leite hidrolisadas, aminoácidos ou proteína que não do leite por exemplo, proteínas da soja e outros componentes nutricionais que não causem reações alérgicas.

20

Uma nutrição para lactente conhecida que compreende aminoácidos como a fonte de nitrogênio é o Neocate[®] para o uso em pacientes que sofrem de alergia, reclamação gastrointestinais, eczema, má absorção ou má digestão.

25

Na técnica anterior o número de fontes diferentes de nutrientes é frequentemente mantido baixo para prevenir a introdução de alérgenos na fórmula pela adição destes ingredientes. Entretanto, isto tem a desvantagem

de que o lactente também não se beneficia dos efeitos benéficos de tais ingredientes adicionais.

A WO2005039319 divulga o uso de simbióticos na fórmula para lactente incluindo proteína na forma hidrolisada, reduzindo deste modo o
5 risco de alergia (página 11, linha 35-37)

A WO2006091103 divulga uma composição nutricional que compreende simbióticos para o tratamento e prevenção de distúrbios imunes incluindo alergia. O uso de hidrolisado de proteína e/ou aminoácidos livres para reduzir o risco de alergia é divulgado.

10 É o objetivo da presente invenção melhorar as fórmulas dietéticas para este grupo de paciente vulnerável pelo fornecimento de benefícios nutricionais adicionais sem a introdução de alérgenos na composição.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foi reconhecido que em uma fórmula básica contendo uma
15 variedade de aminoácidos livres sem proteína intacta, é altamente imprevisível como a flora intestinal se desenvolve. Ao invés da flora de bifidobactérias e lactobacilos dominante em lactentes normais que recebem leite materno, muitas outras espécies bacterianas, incluindo espécies potencialmente patogênicas, podem prevalecer no intestino de lactentes que
20 recebem alimentos com base em aminoácido.

O desenvolvimento de uma flora intestinal saudável é particularmente importante em todos os lactentes, visto que estes lactentes frequentemente já sofrem de uma função imunológica prejudicada, que resulta em cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração dificultosa, vômito,
25 diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema ou eczema.

Foi reconhecido que o desenvolvimento da flora saudável é de importância muito alta em lactentes que recebem uma dieta contendo principalmente aminoácido livre como uma fonte de proteína. Sem estar ligado pela teoria, foi reconhecido que uma boa flora, isto é, uma flora rica

em Bifidobactérias e Lactobacilos, é especialmente benéfica para a maturação do sistema imune (mucósico). Uma boa flora impede o desenvolvimento de alergias ou pelo menos reduz a severidade das alergias em tais lactentes. Consequentemente os presentes inventores reconheceram a criticalidade do desenvolvimento de uma flora benéfica nestes lactentes.

A despeito das limitações na formulação da fórmula dietética para tais lactentes vulneráveis, verificou-se que uma seleção específica de oligossacarídeos dietéticos, preferivelmente frutanos e/ou produtos da degradação da pectina pode ser benéficamente adicionada à fórmula básica para estimular o desenvolvimento da flora sem causar nenhum efeito colateral alérgico.

Nenhum produto derivado do leite pode ser usado nesta fórmula básica, visto que isto levaria à adição de alérgenos lácteos ao produto. Portanto as fibras pré-bióticas de acordo com esta invenção são cuidadosamente selecionadas das fibras pré-bióticas conhecidas de modo a prevenir a adição de leite ou outras proteínas alergênicas intactas e potenciais que estão presentes nas fibras para a composição não alérgica.

Surpreendentemente verificou-se um modelo internacionalmente reconhecido para alergia, que quando fibras pré-bióticas são combinadas com bactérias pró-bióticas (preferivelmente Bifidobactérias) um efeito sinérgico foi presente na prevenção de reações alérgicas. Este efeito sinérgico é potencialmente muito benéfico para os lactentes, mas também podem ser benéficos para adultos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Fig 1 mostra a resposta alérgica para várias composições testadas de acordo com um modelo de vacina de camundongo internacionalmente reconhecido.

A Fig 2 demonstra o efeito sinérgico de TD1 (*Bifidobacterium breve*) e fibras dietéticas (OS) em um modelo de alergia à

caseína de camundongo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma forma de realização preferida de acordo com a invenção compreende o uso de uma composição que compreende aminoácidos livres
5 como uma única fonte de proteína, uma fonte de ácido graxo que compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, uma fonte de carboidrato que compreende carboidratos digeríveis e indigeríveis e Bifidobactérias livres de proteína do leite para a fabricação de uma composição para tratar uma pessoa que sofre de

10 a. cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração dificultosa, vômito, diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;

b. alergia ao leite de vaca e/ou intolerância à proteína dos alimentos; e/ou

15 c. infecções,

em que o carboidrato indigerível é selecionado de uma fonte livre de proteína do leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

O termo “fonte única de proteína” como aqui significa que a
20 presente composição (preferivelmente) contém pelo menos 99 % em peso de aminoácidos com base na proteína total, preferivelmente pelo menos 99,5, mais preferivelmente pelo menos 99,9 % em peso.

A invenção fornece ainda composição que compreende um componente de proteína, um componente de gordura, um componente de
25 carboidrato digerível, um carboidrato não digerível e bifidobactérias em que;

a) o componente de proteína contém mais do que 99 % em peso de aminoácidos livres com base na proteína total e que compreende pelo menos os seguintes aminoácidos livres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina,

serina, treonina, triptofano, tirosina, valina e glutamina;

b) o componente de carboidrato digerível contém menos do que 2 % em peso de lactose com base no carboidrato total digerível;

c) o carboidrato não digerível compreende frutano solúvel com um DP médio entre 2 e 200 e um ácido galacturônico solúvel com um DP médio entre 2 e 200; e

d) o componente de gordura compreende entre 0,1 e 5 % em peso de LCPUFA com base no teor de ácido graxo total.

Como é mostrado na figura 1, a combinação de frutanos solúveis de cadeia longa (LFOS) com um oligossacarídeo ácido (AOS), que foi neste caso o hidrolisado, funciona tão bem quanto as bifidobactérias quando testadas no modelo de camundongo. Entretanto, está claro que se os oligossacarídeos são combinados com as Bifidobactérias os efeitos são fortemente melhorados.

Em uma forma de realização preferida a composição nutricional compreende tanto as fibras não digeríveis quanto as Bifidobactérias visto que esta composição dá os melhores resultados no modelo de camundongo alérgico. (ver a figura 1). Preferivelmente *Bifidobacteria breve* são usadas.

Carboidrato não digerível

Frutanos são oligossacarídeos neutros com base em frutose (> 50 % das unidades de monose são frutose), preferivelmente inulina, frutano e/ou frutooligossacarídeo, mais preferivelmente uma mistura de frutooligossacarídeo de cadeia longa (IcFOS) com um DP médio entre 10 a 60 e frutooligossacarídeo de cadeia curta (scFOS) com um DP médio entre 3 e 10. A forma de realização preferida compreende uma mistura de IcFOS e scFOS em uma razão de 1:9 visto que esta proporção torna-se mais próxima à composição de oligossacarídeos no leite materno e foi mostrado estimular eficazmente o crescimento de bifidobactérias em lactentes.

O presente método preferivelmente compreende a administração de uma porção que compreende entre 0,05 e 25 gramas de sacarídeo não digerível, preferivelmente entre 0,1 e 5 gramas. O presente método preferivelmente compreende a administração de uma porção que compreende entre 0,05 e 25 gramas de scFOS, preferivelmente entre 0,1 e 5 gramas de scFOS. O presente método preferivelmente compreende a administração de 0,05 a 25 gramas de sacarídeo não digerível por dia, preferivelmente entre 0,1 e 5 gramas por dia.

Produto da degradação de Pectina

A pectina é dividida em duas categorias principais: pectina metoxilada alta, que é caracterizada por um grau de metoxilação acima de 50 % e pectina metoxilada baixa tendo um grau de metoxilação abaixo de 50 %. Como aqui usado, “grau de metoxilação” (também aludido como DE ou “grau de esterificação”) é intencionado a significar o grau ao qual os grupos de ácido carboxílico livre contidos na cadeia do ácido poligalacturônico foram esterificados (por exemplo, pela metilação). A pectina presente é preferivelmente preparada a partir da pectina metoxilada alta.

A pectina é preferivelmente caracterizada por um grau de metoxilação acima de 20 %, preferivelmente acima de 30 %, ainda mais preferivelmente acima de 50 %.

A pectina como usada no presente método tem um grau médio de polimerização (DP) entre 2 e 500, preferivelmente entre 10 e 250 e o mais preferivelmente entre 20 e 50. Quando uma mistura de pectinas com graus diferentes de polimerização é usada, o DP médio da mistura de oligossacarídeo ácido está preferivelmente entre 3 e 1000, mais preferivelmente entre 3 e 250, ainda mais preferivelmente entre 3 e 50. Verificou-se que um DP mais baixo dos oligossacarídeos melhora a palatabilidade e resulta em um produto de viscosidade reduzida se o oligossacarídeo ácido é administrado na forma líquida.

A pectina é preferivelmente administrada em uma quantidade entre 0,1 e 100 gramas por dia, preferivelmente entre 0,4 e 50 gramas por dia, ainda mais preferivelmente entre 1 e 20 gramas por dia.

5 Uma forma de realização preferida compreende frutanos e produtos da degradação da pectina em uma razão de 50:50 a 95:5. Preferivelmente a razão é de 85:15 visto que esta é a razão de oligossacarídeos neutros e oligossacarídeos ácidos como presente no leite materno.

Bactérias pró-bióticas

10 As bactérias pró-bióticas que são adequadas para o uso na invenção preferivelmente devem ter pelo menos um efeito positivo no modelo de alergia de camundongo como descrito nos exemplos abaixo. Os pró-bióticos devem ser ainda colhidos na ausência substancial de alérgenos alimentícios. Isto requer procedimentos especiais ou meios de cultura sem
15 proteínas intactas para a preparação das bactérias pró-bióticas.

A forma de realização preferida portanto compreende bactérias pró-bióticas na ausência substancial de proteínas alimentícias intactas ou alérgenos alimentícios, especificamente na ausência substancial de proteína do leite.

20 Em uma forma de realização preferida as bactérias pró-bióticas são bifidobactérias. A bactéria pró-biótica mais preferida é a *Bifidobacterium breve*. As Bifidobactérias têm o efeito indutor de tolerância mais forte nos modelos de camundongo usados e são portanto preferidas. Em particular *Bifidobacterium breve* é altamente eficaz.

25 Em uma outra forma de realização preferida as Bifidobactérias são não viáveis. Isto tem a vantagem de que a vida de prateleira do produto torna-se mais longa e que a atividade modulatória imune das bactérias tornam-se independentes do número de bifidobactérias vivas. Experimentos têm mostrado que os efeitos estimuladores imunes de bactérias não viáveis

são similares e algumas vezes ainda melhores do que a atividade de bifidobactérias vivas.

A presente composição preferivelmente compreende 10^2 a 10^{13} unidades formadoras de colônia (cfu) de bifidobactérias por grama de peso seco da presente composição, preferivelmente de 10^2 a 10^{12} cfu, mais preferivelmente de 10^5 a 10^{10} cfu, o mais preferivelmente de 10^4 a 5×10^9 cfu.

Aminoácidos

Os aminoácidos podem ser usados na fórmula nutricional para bebês e lactentes. Entretanto, a composição dos aminoácidos na fórmula preferivelmente compreende todos os aminoácidos essenciais exceto para os pacientes com fenilcetonúria (PKU) e erros congênitos que não de PKU de metabolismo e é preferivelmente ideal para alimento de bebê ou nutrição de lactente. Verificou-se então que a composição de aminoácido mais ideal deve estar tão próxima quanto possível da composição de aminoácido da fração de proteína do leite materno. Isto resulta em uma composição de aminoácido preferida como representado na tabela 1 (ver abaixo).

Em uma forma de realização preferida a composição compreende menos do que 1 % em peso de peptídeos com base na proteína total e mais do que 99 % em peso de aminoácidos livres com base na proteína total, que compreende pelo menos os seguintes aminoácidos livres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina e glutamina;

Fórmula

As fórmulas de acordo com a invenção compreendem aminoácidos livres como fonte de nitrogênio, gordura incluindo uma mistura de gordura que compreende LCPUFA e carboidratos. Vitaminas e minerais são adicionados de acordo com as exigências da legislação.

A presente composição preferivelmente fornece nutrição para o lactente e compreende um componente de lipídeo, um componente de

proteína e um componente de carboidrato. O componente de lipídeo preferivelmente fornece de 5 a 50 % das calorias totais, o componente de proteína preferivelmente fornece de 5 a 50 % das calorias totais e o componente de carboidrato preferivelmente fornece de 15 a 90 % das calorias totais. A presente composição é preferivelmente usada como uma fórmula de lactente, em que o componente lipídico fornece de 35 a 50 % das calorias totais, o componente de proteína fornece 7,5 a 12,5 % das calorias totais e o componente de carboidrato fornece de 40 a 55 % das calorias totais. Para o cálculo da % de calorias totais para o componente de proteína, o total de energia fornecida pelos aminoácidos precisa ser considerado.

LCPUFA

O teor de LC-PUFA com 20 e 22 átomos de carbono na presente composição, preferivelmente não excede 15 % em peso do teor de gordura total, preferivelmente não excede 10 % em peso, ainda mais preferivelmente não excede 5 % em peso do teor de gordura total. Preferivelmente, a presente composição compreende pelo menos 0,1 % em peso, preferivelmente pelo menos 0,25 % em peso, mais preferivelmente pelo menos 0,5 % em peso, ainda mais preferivelmente pelo menos 0,75 % em peso de LC-PUFA com 20 e 22 átomos de carbono do teor de gordura total. O teor de ácido docosahexaenóico (DHA) preferivelmente não excede 5 % em peso, mais preferivelmente não excede 1 % em peso, mas é pelo menos de 0,1 % em peso da gordura total. Visto que o ácido araquidônico (AA) verificou-se ser particularmente eficaz na redução da permeabilidade de junção firme, a presente composição compreende quantidades relativamente altas, preferivelmente pelo menos 0,1 % em peso, ainda mais preferivelmente pelo menos 0,25 % em peso, o mais preferivelmente pelo menos 0,5 % em peso da gordura total. O teor de AA preferivelmente não excede 5 % em peso, mais preferivelmente não excede 1 % em peso da gordura total. Os metabólitos em excesso de AA podem causar inflamação. Por este motivo, a presente

composição preferivelmente compreende AA e DHA, em que a razão em peso de AA/DHA preferivelmente está acima de 0,25, preferivelmente acima de 0,5, ainda mais preferivelmente acima de 1. A razão está preferivelmente abaixo de 25.

5 As LC-PUFAs são preferivelmente óleos de célula única não derivados de peixe, por exemplo, disponíveis da Martek.

As características preferidas para as composições de acordo com a invenção são apresentadas nas Tabelas de 1 a 3.

Tabela 1. Teor de aminoácido da composição de acordo com a invenção

Aminoácido	Unidades	Teor de AA como porcentagem de AA total			
		Faixa (g/100g)			
		Lactente 0 a 1 ano		Lactente 1 a 10 anos	
Ala	g	3,95	4,01	3,12	3,03
Arg	g	6,99	7,02	14,24	13,91
Asp	g	6,54	6,57	5,73	5,59
Cys	g	2,59	2,58	1,85	2,91
Ácido Glu	g		0,00	0,00	0,00
Gly	g	6,15	6,12	5,11	5,01
His	g	4,02	3,99	3,71	3,61
Iso	g	6,15	6,12	5,11	5,01
Leu	g	10,56	10,51	8,54	8,32
Lys	g	7,19	7,19	6,25	6,11
Meth	g	1,68	1,69	4,02	3,90
Phe	g	7,51	7,47	7,10	6,93
Pro	g	4,73	4,72	5,97	5,82
Ser	g	4,60	4,61	3,71	3,61
Thr	g	5,18	5,17	4,29	4,19
Try	g	2,07	2,08	1,72	1,69
Tyr	g	4,73	4,72	1,44	1,40
Val	g	6,74	6,74	5,42	5,30
Car	g	0,06	0,06	0,10	0,12
Tau	g	0,19	0,20	0,17	0,17
Glu	g	8,42	8,43	12,35	13,39
Total	g	100	100	99,97	100

Tabela 2. Fórmula nutricional de lactente para lactentes alérgicos

Perfil nutricional da fórmula para lactentes de acordo com a invenção (pó)			
	Unidades	Nível/100 g	Nível /100 kcal
Equivalente de Proteína	g	13	2,9
Energia	kcal	455	100
Nitrogênio	g	2,1	
Carboidrato	g	49	10,8
Gordura (total)	g	23	5,1
(MCT)	%	33	
(LCT)	%	67	

Tabela 3. Faixas na composição de ácido graxo de Cadeia Longa Poliinsaturado (LCP)

	% de Ácido Graxos		
	Preferido	Faixa +/- 25 %	
Ácido araquidônico	0,35	0,26	0,44
Ácido docosahexanóico	0,20	0,15	0,25
Total LCP	0,55	0,41	0,69

5 As faixas preferidas na composição de oligossacarídeo são de 0,4 a 1,2 g/100 ml em que 85 % em peso é scFOS e IcFOS e 15 % em peso é hidrolisado de pectina. Preferivelmente a razão de scFOS para IcFOS está entre 2 e 20 ainda mais preferivelmente a razão é 9.

10 Uma forma de realização preferida da formulação em pó livre de proteína do leite e alérgeno, nutricionalmente completa de acordo com a invenção que é adequada para a diluição com água para formar um alimento enteral compreende:

	<u>Componente</u>	<u>Por 100 g de Pó</u>
	Equivalente de Proteína (g)	13
15	Aminoácidos Totais (g)	15,5
	Gordura Total (g)	23
	Óleo de Girassol (g)	4
	Óleo de Coco Fracionado (g)	7
	Óleo de Canola (g)	4
20	Óleo de girassol de oléico alto (g)	6,6
	Óleo ARASCO® (g)	0,21

	Óleo DHASCO® (g)	0,11
	Carboidrato: Maltodextrina (g)	49
	Pré-biótico (g)	5,33
	ScFOS (g)	4,1
5	IcFOS (g)	0,43
	AOS (g)	0,8
	Pró-biótico: <i>B Breve</i> (unidades formadoras de colônia; CFU)	1×10^{10}
	Outras vitaminas/minerais/elementos traço	Equilíbrio

10 A formulação acima fornece aproximadamente 455 kcal de energia por 100 g de pó.

A formulação pode ser diluída com água esfriada, fervida para fornecer uma concentração recomendada de 15 % p/v.

Usos

15 Preferivelmente a composição é usada para tratar um lactente (particularmente com uma constituição atópica) que sofre de

a. cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração dificultosa, vômito, diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;

20 b. alergia ao leite de vaca e/ou intolerância à proteína dos alimentos; e/ou

c. infecções

A composição também pode ser preferivelmente usada para melhorar as características das fezes de lactentes que sofrem dos sintomas mencionados acima. A composição é especificamente planejada para lactentes
25 entre 0 e 3 anos. Com algumas adaptações no perfil de aminoácido (ver a tabela 1) a composição também é adequada para lactentes entre 3 e 10 anos de idade. Os lactentes alérgicas frequentemente sofrem de diarreia mas a constipação também ocorre. Uma composição preferida que pode ser usada

para prevenir e tratar estes sintomas compreende fibras de acordo com a composição do leite materno, em que a razão scFOS/IcFOS é 9:1 e adicionalmente hidrolisado de pectina está presente.

EXEMPLOS

5 De modo a determinar os efeitos estimuladores imunes de oligossacarídeos e *Bifidobacterium breve* (TD1) pró-biótico testes foram realizados em um modelo de vacina de camundongo internacionalmente reconhecido (fig 1) e em um modelo de alergia (fig 2).

Materiais e método do modelo de vacina

10 Camundongos

Camundongos C57B1/6J01aHsd fêmeas de 6 e 8 semanas de idade foram obtidos da Harlan (Horst, Países Baixos) e mantidos sob condições normais com um ciclo de 12 h de escuro e luz e livre acesso a alimento e água. Todos os experimentos foram aprovados por um comitê de
15 experimentos com animal independente (DEC Consult, Bilthoven, Países Baixos).

Dietas e preparações de oligossacarídeo

Todos os animais receberam dietas com base em AIN-93G semi-purificadas (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Baixos).
20 Todos os produtos de oligossacarídeo suplementados foram trocados pela mesma quantidade de carboidratos totais, para manter este parâmetro igual. Além disso, este método resultou em uma composição de carboidrato global comparável em dietas diferentes, para garantir que a flora intestinal fosse minimamente influenciada pelas diferenças entre as dietas de controle e de
25 teste em parâmetros tais como tempo de passagem pelo intestino e retenção de fluido. Os oligossacarídeos foram misturados na dieta AIN-93G e prensados em pelotas.

Protocolo de Vacinação e Resposta de DTH

Os experimentos de vacinação foram realizados usando

Influvac (Solvay Pharmaceuticals, Weesp, Países Baixos) da estação de 2002/2003. Esta é uma vacina do vírus da influenza inativada com base em antígenos da hemaglutinina (HA) e neuraminidase isolados de três cepas de mixovírus da influenza, em uma dose equivalente a 30 µg/ml de HA por cepa (90 µg/ml de HA no total). Um adjuvante oleoso foi usado em todas as vacinações (Stimune, anteriormente conhecido como Specol; Cedi-diagnostics, Lelystad, Países Baixos). Os camundongos receberam uma vacinação primária e uma vacinação de reforço, consistindo de uma injeção subcutânea (sc) de uma mistura 1:1 de vacina e adjuvante em um volume total de 100 µl. A vacinação de reforço foi dada 21 dias depois da vacinação primária. Os experimentos terminaram 10 dias depois da vacinação de reforço. As amostras de sangue (tiradas pela punção retro-orbital) foram tiradas antes das vacinações primárias e secundárias e no final do experimento. Os grupos de controle negativo que foram incluídos em todos os experimentos (indicaram com ‘grupo simulado’) recebeu injeções com uma mistura 1:1 de PBS e adjuvante em um volume total de 100 µl. Os grupos simulados nunca foram usados para comparações estatísticas com os grupos suplementados, mas serviram unicamente para demonstrar a especificidade das respostas induzidas pelas vacinas. As reações de DTH foram induzidas 9 dias depois da vacinação de reforço pela injeção sc de 25 µl de Influvac na aurícula de ambas as orelhas. A espessura da orelha foi medida em duplicata antes da inoculação da vacina e 24 h depois, usando um micrômetro digital (Mitutoyo Digimatic 293561, Veenendaal, Países Baixos). A resposta de DTH foi calculada subtraindo-se a espessura da orelha basal do valor em 24 h depois da inoculação.

Material e métodos do modelo de alergia à proteína do leite de vaca

Produtos Químicos

A caseína e soro do leite são obtidos da DMV international,

Veghel, Países Baixos. A toxina do cólera é adquirida da Quadratech Diagnostics, Epsom, UK. PBS é adquirido da Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica. O tampão de revestimento do Elisa é obtido da Sigma, Alphen aan den Rijn, Países Baixos. A IgE anti camundongo de rato rotulada com Biotina é adquirida da BD Biosciences, Alphen aan den Rijn, Países Baixos. Todos os outros produtos químicos são obtidos da Sigma-Aldrich-Chemie, Zwijndrecht, Países Baixos.

Sensibilização oral e inoculação de camundongos

Camundongos C3H/HeOuJ fêmeas de três a 5 semanas de idade livres de patógeno específico (n = 4 a 6 por grupo) foram adquiridos da Charles River Laboratories (Maastricht, Países Baixos), mantidos em ração de camundongo livre de proteína do leite de vaca (Special Diets Services, Witham, Essex, UK) e alojados na instalação de animal na Utrecht University. O cuidado com o animal e uso foram realizados de acordo com as diretrizes do Dutch Committee of Animal Experiments. Os camundongos foram sensibilizados intragastricamente (i.g.) com 0,5 ml de caseína homogeneizada (40 mg/ml de PBS) com a toxina do cólera (CT, 20 µl/ml de PBS) como um adjuvante usando uma agulha rombuda. Os camundongos de controle receberam apenas CT ou PBS. Os camundongos foram reforçados semanalmente por um período de 6 semanas, uma semana depois da última sensibilização os camundongos foram inoculados i.g. com 100 mg de caseína.

As amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas em seguida (15 min. a 13500 rpm.). Os soros foram armazenados a – 70° C. Os camundongos foram sacrificados pelo deslocamento cervical meia hora depois da inoculação i.g.

Resposta de pele específica ao alérgeno

A resposta de pele específica de alérgeno aguda foi medida depois da injeção da proteína específica nas aurículas. Antes da inoculação i.g. (t = 0), os camundongos de controle, sensibilizados à caseína foram

injetados intradermicamente (i.d.) na orelha esquerda com 20 µl de caseína homogeneizada (0,5 mg/ml em PBS) respectivamente. Na orelha esquerda 20 µl de PBS foram injetados com um controle de veículo. Também os camundongos CT e PBS receberam uma inoculação na orelha de caseína usando injeções de PBS como controle. A espessura da orelha foi medida em duplicata usando um micrômetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Países Baixos), em 0, 1, 4 e 24 horas depois da inoculação. O inchaço de orelha específico de alérgeno foi calculado subtraindo-se a espessura basal (0 h) e a de controle (orelha direita) do valor medido nos três pontos de tempo diferentes (1, 4 e 24 h).

Medições de imunoglobulina sérica e níveis de protease-1 em mastóides de camundongo

As concentrações de IgE total e os níveis de caseína ou IgE, IgG1 e IgG2a específicas de soro do leite foram determinados no soro de camundongos sacrificados por meio de ELISA. Placas Microlon (Greiner, Alphen aan den Rijn, Países Baixos) foram revestidas com caseína em tampão de revestimento ou IgE anti-camundongo de rato (1 µg/ml) em PBS por 18 horas a 4° C. As placas foram lavadas e bloqueadas por 1 hora com 5 % de BSA. As amostras de soro foram aplicadas em diversas diluições e incubadas por 2 horas na temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes e incubados com 1 µg de IgE anti camundongo de rato rotulado com biotina por uma hora e meia na temperatura ambiente. Depois da lavagem as placas foram incubadas com peroxidase de rábano (HRP) por uma hora, lavadas e desenvolvidas com o-fenilenodiamina (OPD). A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4 M e a absorbância foi medida a 490 nm em uma leitora de microplaca Benchmark (Biorad, Califórnia, USA). As concentrações séricas de protease-1 de mastóide de camundongo (mMCP-1) foram determinadas como anteriormente descrito usando um kit de ELISA comercialmente disponível (Moredun Scientific Ltd., Midlothian, UK).

Os resultados do modelo de vacina de camundongo são mostrados na Fig 1 a partir dos quais está claro que a combinação de TD1 (= *Bifidobacterium breve*) fornece o efeito mais forte sobre a resposta de DTH e é significativamente melhor do que TD1 sozinho ou qualquer outra
5 combinação testada.

Os resultados do modelo de alergia à caseína de camundongo são mostrados na Fig 2 e demonstram que a combinação de fibra dietética e TD1 sinergisticamente inibe a resposta de DTH “alergênica” à caseína.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição que compreende aminoácidos livres como uma única fonte de proteína, uma fonte de ácido graxo que compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, uma fonte de carboidrato que compreende carboidratos digeríveis e indigeríveis e Bifidobactérias livres de proteína do leite, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma composição para tratar uma pessoa que sofre de:

a. cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração dificultosa, vômito, diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;

b. alergia ao leite de vaca e/ou intolerância à proteína dos alimentos; e/ou

c. infecções,

em que o carboidrato indigerível é selecionado de uma fonte livre de proteína do leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a pessoa é um lactente na idade entre 0 e 36 meses.

3. Uso de uma composição que compreende aminoácidos livres como uma única fonte de aminoácidos, uma fonte de ácido graxo que compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, uma fonte de carboidrato que compreende carboidratos digeríveis e indigeríveis e Bifidobactérias livres de proteína do leite, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma composição para estimular a maturação do sistema imune em um lactente com uma constituição atópica, em que o carboidrato indigerível é selecionado de uma fonte livre de proteína do leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos livres com base na proteína

total, que compreende pelo menos os seguintes aminoácidos livres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina e glutamina.

5 5. Uso de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos compreendem entre 5 e 16 % em da composição total, entre 30 e 60 % em de gordura, dos quais entre 0,1 e 5 % em de LCPUFA e entre 25 e 75 % em de carboidratos digeríveis.

10 6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a LCPUFA compreende entre 0,2 e 1 % em da composição total.

15 7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o carboidrato indigerível compreende (i) frutano solúvel com um grau médio de polimerização entre 3 e 200 e (ii) um ácido galacturônico solúvel com um grau médio de polimerização entre 3 e 200.

8. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um componente de proteína, um componente de gordura, um componente de carboidrato digerível, um carboidrato não digerível e bifidobactérias livres de proteína do leite, em que;

20 (a) o componente de proteína que compreende aminoácidos livres como a única fonte de proteína e compreende pelo menos os seguintes aminoácidos livres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina e glutamina;

25 (b) o componente de carboidrato digerível contém menos do que 2 % em peso de lactose com base no carboidrato total digerível;

(c) o carboidrato não digerível compreende frutano solúvel com um DP médio entre 2 e 200 e um ácido galacturônico solúvel com um DP médio entre 2 e 200; e

(d) o componente de gordura compreende entre 0,1 e 5 % em peso de LCPUFA com base no teor de ácido graxo total.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que:

5 o componente de gordura compreende entre 0,2 e 1 % em peso de LCPUFA com base no teor de ácido graxo total.

10 10. Composição de acordo com as reivindicações 8 ou 9, caracterizada pelo fato de que compreende frutano não digerível, solúvel com um DP médio entre 2 e 200 e um ácido galacturônico não digerível solúvel com um DP médio entre 2 e 200.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 10, caracterizada pelo fato de que compreende *Bifidobacterium breve*.

15 12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 11, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenóico.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 12, caracterizada pelo fato de que o carboidrato indigerível consiste de FOS de cadeia longa e FOS de cadeia curta.

20 14. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o FOS de cadeia longa tem um DP médio entre 10 e 60 e o FOS de cadeia curta tem um DP médio entre 3 e 10.

25 15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 14, caracterizada pelo fato de que o produto é um pó ou um líquido.

16. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende aminoácidos livres como uma única fonte de proteína, uma fonte de ácido graxo que compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, uma fonte de carboidrato que compreende carboidratos digeríveis e indigeríveis, e

Bifidobactérias livres de proteína do leite, em que o carboidrato indigerível é selecionado de uma fonte livre de proteína do leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas para uso no tratamento de uma pessoa que sofre de

- 5 (a) cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração dificultosa, vômito, diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;
- (b) alergia ao leite de vaca e/ou intolerância à proteína dos alimentos;
- 10 (c) e/ou infecções.

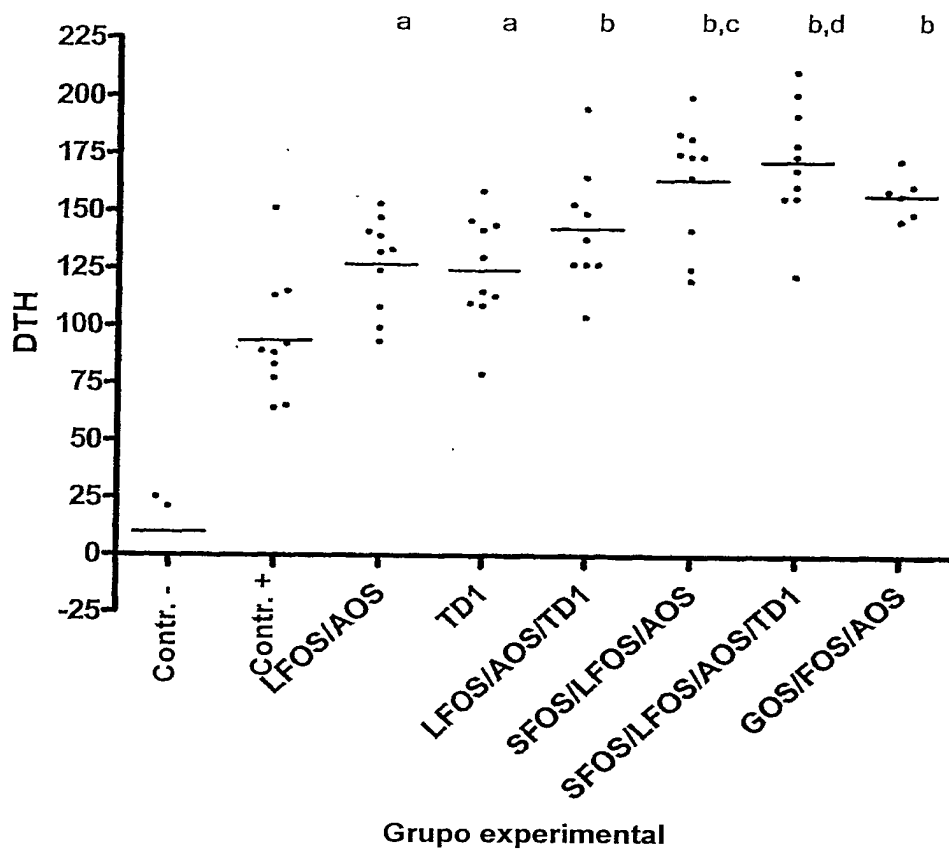
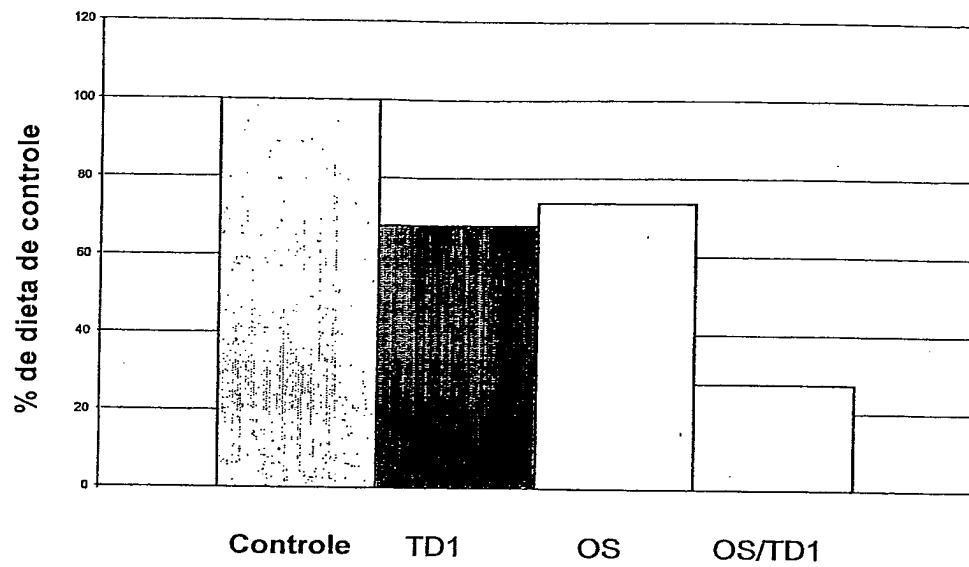


Figura 1- Modelo de Vacina de Camundongo

a = $p < 0,05$ comparado ao controle+, b = $p < 0,01$ comparado ao controle+, c = $p < 0,05$ comparado ao LFOS/AOS, d = $p < 0,001$ comparado ao TD1 (= *Bifidobacterium breve*).

Porcentagem de inchaço de orelha**Fig. 2- Modelo de Alergia à Caseína de Camundongo**

RESUMO“USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO”

A invenção diz respeito ao uso de composição que compreende aminoácidos livres como uma única fonte de proteína, uma fonte
5 de ácido graxo que compreende ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, uma fonte de carboidrato que compreende carboidratos digeríveis e indigeríveis e Bifidobactérias livres de proteína do leite para tratar uma pessoa que sofre de (a) cólica, congestão, escorrimento nasal, respiração
10 dificultosa, vômito, diarreia, fezes sanguinolentas, muco nas fezes, exantema, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma; (b) alergia ao leite de vaca e/ou intolerância à proteína dos alimentos; e/ou (c) infecções, em que o carboidrato indigerível é selecionado de uma fonte livre de proteína do leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.