



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808145-0 A2



(22) Data do Depósito: 22/02/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 23/03/2021

(54) Título: PRODUTO CONTENDO PROBIÓTICO INATIVADO PARA CRIANÇAS OU LACTENTES.

(51) Int. Cl.: A61K 35/74; A61K 31/202; A61P 29/00.

(30) Prioridade Unionista: 28/02/2007 US 60/904,122.

(71) Depositante(es): MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY.

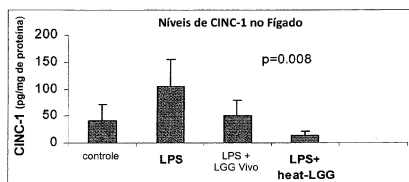
(72) Inventor(es): UDO HERZ; ROBERT J. MCMAHON; WILLIAM MICHAEL RUSSELL; JOSEF NEU.

(86) Pedido PCT: PCT US2008054717 de 22/02/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/106373 de 04/09/2008

(85) Data da Fase Nacional: 27/08/2009

(57) Resumo: PRODUTO CONTENDO PROBIÓTICO INATIVADO PARA CRIANÇAS OU LACTANTES. A presente invenção refere-se a um produto para crianças ou lactantes que compreende pelo menos um probiótico inativado, em que o produto é formulado para liberar entre cerca de 1×10^4 a cerca de 1×10^{10} equivalentes celulares de probiótico inativado por Kg de peso corporal por dia para uma criança ou lactante e em que, com exceção das propriedades reprodutivas, o pelo menos um probiótico inativado retém as propriedades reativas biológicas celular e molecular do probiótico viável.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PRODUTO CONTENDO PROBIÓTICO INATIVADO PARA CRIANÇAS OU LACTENTES"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PATENTES E PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

5

Esse pedido é um Pedido de Patente Não-Provisional e reivindica o benefício da prioridade de Aplicação de Patente Provisória U.S. Nº de Série 60/904.122, depositado em 28 de Fevereiro de 2007, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se, geralmente, a um produto contendo pelo menos um probiótico inativado e a um método para utilizá-lo.

Descrição da Técnica Relacionada

15

A resposta inflamatória é uma tentativa do corpo de restaurar e manter a homeostase após a invasão por um agente infeccioso, estímulo antigênico ou lesão física, química ou traumática. A inflamação localizada está contida em uma região específica e pode exibir sintomas variáveis, incluindo vermelhidão, edema, calor e dor.

20

Apesar da resposta inflamatória ser considerada, geralmente, uma resposta saudável à lesão, o sistema imune pode apresentar uma resposta fisiológica indesejável, se ele não estiver apropriadamente regulado. Nessa situação, o sistema imune, normalmente protetor do corpo, causa dano a seu próprio tecido pelo tratamento do tecido saudável como se ele estivesse infectado ou anormal. Alternativamente, se há uma lesão, a resposta inflamatória pode ser desproporcional à ameaça que causa a lesão. Quando isso ocorre, a resposta inflamatória pode causar mais dano ao corpo do que o próprio agente teria produzido.

25

30

A resposta inflamatória foi encontrada consistir, em parte, em uma expressão aumentada de ambas as citocinas, pró-inflamatória e anti-inflamatória. Citocinas são proteínas de baixo peso molecular, biologicamente ativas envolvidas na coordenação de respostas imunológicas e inflamatórias.

rias e na comunicação entre populações celulares imunes específicas. Vários tipos de célula produzem citocinas durante as reações inflamatórias, incluindo neutrófilos, monócitos e linfócitos.

Existem múltiplos mecanismos pelos quais as citocinas geradas em sítios inflamatórios influenciam a resposta inflamatória. Se uma resposta pró-inflamatória não é bloqueada com sucesso pelas citocinas anti-inflamatórias, entretanto, pode ocorrer uma inflamação sistêmica descontrolada.

Ao contrário da inflamação localizada, a inflamação sistêmica é disseminada através do corpo. Esse tipo de inflamação pode incluir a inflamação localizada em sítios específicos, mas também pode estar associada a sintomas gerais "similares à gripe", incluindo febre, calafrios, fadiga ou perda de energia, dores de cabeça, perda de apetite e fraqueza muscular. A inflamação sistêmica pode levar à degradação de proteína, a catabolismo e hipermetabolismo. Como consequência, a estrutura e função de órgãos essenciais, tais como o músculo, coração, sistema imune e fígado podem ser comprometidas e podem contribuir para a falência de múltiplos órgãos e mortalidade. Jeschke, *et al.*, *Insulin Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Thermal Trauma*, Mol. Med. 8(8):443-450 (2002). Embora um imenso progresso tenha sido alcançado na compreensão dos mecanismos da inflamação sistêmica, a taxa de mortalidade devido a esse distúrbio permanece inaceitavelmente alta.

As infecções respiratórias são extremamente comuns, especialmente entre lactentes. No primeiro ano de vida, os lactentes são propensos a infecções recorrentes do trato respiratório,, geralmente, experimentando entre três e seis infecções durante apenas aquele ano. Cerca de 6% dos lactentes com menos de um ano de idade são hospitalizados por infecções respiratórias baixas a cada ano apenas nos Estados Unidos.

As infecções respiratórias e seus sintomas podem variar de leve a alta de brandos a severos, dependendo do tipo de vírus e da localização da infecção. Infecções do trato respiratório alto frequentemente se manifestam como resfriador comuns, causando inflamação e edema do revestimento

do nariz, garganta e sinuses Influenza, geralmente conhecida como gripe, é uma infecção viral altamente contagiosa do trato respiratório alto. Sintomas de gripe incluem febre, calafrios, cefaleia, dores musculares, vertigem, tosse, faringite, coriza, náusea e diarreia. Outra infecção respiratória alta, a laringite, causa tosse muito acentuada e graus variáveis de dificuldade respiratória, primariamente quando se inspira.

As infecções respiratórias baixas são consideradas, geralmente, mais sérias do que as infecções respiratórias altas. O vírus sincicial respiratório (RSV) é a causa mais frequente de infecções respiratórias baixas em lactentes e crianças mais novas do que quatro anos de idade. Van Woensel, J. et al., *Viral Lower Respiratory Tract Infection in Infants and Young Children*, BMJ 327:36-40 (2003). Esse vírus é tão comum que virtualmente todas as crianças foram infectadas pelo RSV com a idade de três anos. Na maioria dos lactentes e crianças, RSV é uma infecção respiratória leve que é indistinguível do resfriado comum. Ele, geralmente, causa obstrução nasal, coriza e tosse.

A proteção contra RSV envolve ambas as respostas de células T e B, respostas de anticorpos (IgM, IgG e IgA),, assim, como outras respostas do sistema imune que são ativadas por infecções bacterianas e virais. Uma ligação entre infecção por RSV no lactente e o desenvolvimento de dificuldade respiratória, asma e atopia recorrentes na infância foi sugerida. Assim, limitar infecções por RSV poderá prevenir sérias complicações respiratórias que se estendem por toda a infância.

A bronquite é uma infecção respiratória baixa que afeta os brônquios, causando estreitamento e edema devido à inflamação viral. A bronquiolite é similar à bronquite, mas ocorre primariamente nos lactentes. É uma inflamação dos tubos de menor calibre da rede de ramificação dos brônquios. A infecção causa respiração laboriosa, tosse frequente e dramática e dificuldade respiratória, e pode requerer hospitalização.

A infecção respiratória baixa que é, provavelmente, a mais séria para lactentes é a pneumonia. A pneumonia é causada por uma infecção dos alvéolos, induzindo-os a se tornarem cheios de líquido,, geralmente, de

natureza purulenta e espessa, que interfere com a troca apropriada de dióxido de carbono. A severidade da pneumonia dependerá da quantidade de tecido pulmonar envolvida.

5 A maioria das infecções respiratórias alta e baixa são causadas por vírus para os quais nenhuma prevenção ou tratamento específicos estão atualmente disponíveis. Algumas infecções respiratórias, incluindo a influenza, podem ser prevenidas com vacinação. Entretanto, mesmo quando as vacinações são desenvolvidas para infecções respiratórias específicas, elas são caras e não-universalmente disponíveis. Similarmente, fármacos para
10 tratar essas infecções têm disponibilidade limitada e são caros. Assim, poderá ser útil fornecer um método não-medicinal para o tratamento e a prevenção de infecções respiratórias em lactentes.

Infecções do trato respiratório frequentes estão, geralmente, associadas à otite média aguda (AOM), também conhecida como infecção do
15 ouvido médio. AOM é caracterizada por um surto agudo e curto de inflamação e líquido no ouvido médio. AOM pode estar acompanhada de rinite, tosse, febre, faringite, dor de ouvido, hipoacusia, inquietação, irritabilidade, perda de apetite, vômitos ou diarreia. A otorreia purulenta através de uma membrana timpânica perfurada também é considerada constituir AOM.

20 Cinquenta por cento das crianças tiveram pelo menos um episódio de AOM até um ano de idade. Oitenta por cento das crianças tiveram pelo menos um episódio até o seu terceiro aniversário. Entre um e três anos, 35% das crianças terão tido episódios de AOM.

AOM pode ser causada por vírus ou bactérias. As cepas bacterianas mais comuns que causam AOM são *Streptococcus pneumoniae* (35% dos casos), *Haemophilus influenzae* (10% dos casos) e *Moraxella catarrhalis* (10% dos casos). Como as cepas bacterianas frequentemente causam a infecção, AOM é frequentemente tratada através da administração de antibióticos. De fato, são feitas mais prescrições de antibióticos para AOM do que
30 para qualquer outra doença na infância.

Geralmente, se a resposta de citocina é pró- ou anti-inflamatória depende do equilíbrio de micro-organismos individuais que colonizam a lú-

men intestinal em qualquer período em particular. É bem conhecido que a superfície mucosas do trato intestinal é colonizada por uma coleção enorme, ampla, complexa e dinâmica de micro-organismos. A composição da microflora intestinal varia ao longo do trato digestivo, assim, como em diferentes micro-habitats, tais como a camada de muco epitelial, a camada mucosa profunda das criptas e a superfície das células mucosais epiteliais. A colonização específica depende de fatores externos e internos que incluem moléculas disponíveis na luz, qualidade do muco e interações hospedeiro-microbiana e microbiana-microbiana. Murch, S.H., *Toll of Allergy Reduced by Probiotics*, Lancet, 357:1057-1059 (2001).

Esses micro-organismos, que formam a microflora intestinal, estão ativamente envolvidos com a resposta imune. Eles interagem com o epitélio em condições de relacionamentos com benefício mútuo para ambos os parceiros (simbiose) ou em condições de benefício para um dos parceiros, sem haver prejuízo para o outro (comensalismo). Hooper, *et al.*, *How Host-Microbial Interactions Shape the Nutrient Environment of the Mammalian Intestine*, Annu. Rev. Nutr. 22:283-307 (2002). De fato, está surgindo uma evidência considerável que mostra uma acentuada interação ou "interferência" entre a microflora intestinal e a população diversa de células na mucosa intestinal. Bourlioux, *et al.*, *The Intestine and its Microflora are Partners for the Protection of the Host: Reporter on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine"*, organizado em Paris, 14 de Junho de 2002, Am. J. Clin. Nutr. 78:675 (2003); Hooper, L.V. & Gordon, J.I., *Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut*, Sci. 292:1115 (2001); Haller *et al.*, *Non-Pathogenic Bacteria Elicit a Differential Cytokine Response by Intestinal Epithelial Cell/Leucocyte Co-Cultures*, GUT 47:79 (2000); Walker, W.A., *Role of Nutrients and Bacterial Colonization in the Development of Intestinal Host Defense*, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30:S2 (2000). Além disso, a microflora intestinal foi mostrada provocar respostas imunes específicas em ambos os níveis, local e sistêmico, em adultos. Isolauri, E. *et al.*, *Probiotics: Effects on Immunity*, Am. J. Clin. Nutr. 73:444S-50S (2001).

A microflora intestinal em lactentes é conhecida ser muito menos

desenvolvida do que a de um adulto. Enquanto a microflora do ser humano adulto consiste em mais do que 10^{13} micro-organismos e aproximadamente 500 espécies, alguns sendo prejudiciais e outros sendo benéficos, a microflora de um lactente contém apenas uma fração daqueles micro-organismos, tanto em números absolutos quanto também por diversidade de espécies. Os lactentes nascem com um intestino estéril, mas adquirem a flora intestinal a partir do canal de parto, seu meio ambiente inicial, e da que eles ingerem. Como a população da microflora intestinal é muito instável na vida neonatal precoce, é, geralmente, difícil para o intestino do lactente manter o delicado equilíbrio entre bactérias prejudiciais e benéficas, reduzindo, assim, a habilidade do sistema imune de funcionar normalmente.

É especialmente difícil para lactentes amamentados com fórmulas manter esse equilíbrio devido a diferenças entre as espécies bacterianas no intestino do lactente amamentado com fórmula e do amamentado ao seio. As fezes de lactentes amamentados ao seio contêm predominantemente *Bifidobacterium*, com *Streptococcus* e *Lactobacillus* como contribuintes menos comuns. Em contraste, a microflora de lactentes amamentados com fórmula é mais diversa, contendo *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, assim, como as espécies mais patogênicas, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Clostridia*. As espécies variadas de *Bifidobacterium* nas fezes de lactentes amamentados ao seio e lactentes amamentados com fórmula também diferem. Uma variedade de fatores tem sido proposta como a causa da diferença da flora fecal de lactentes amamentados ao seio e lactentes amamentados com fórmula, incluindo o conteúdo menor e a composição diferente de proteínas no leite humano, um teor menor de fósforo no leite humano, a grande variedade de oligossacarídeos no leite humano e numerosos mediadores humorais e celulares de função imunológica no leite humano. Agostoni, *et al.*, *Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*, J. Pediatr. Gastro. Nutr. 38:365-374 (Abril de 2004).

Como a microflora de lactentes amamentados com fórmula é muito instável e a microflora intestinal participa amplamente na estimulação

da imunidade intestinal, lactentes alimentados com fórmula são mais propensos a desenvolver doenças inflamatórias. Muitas das principais doenças que afetam lactentes, incluindo doença pulmonar crônica, leucomalácia periventricular, meningite neonatal, hepatite neonatal, sepse e enterocolite necrotizante são de natureza inflamatória. Dependendo da doença em particular, a inflamação que a acompanha pode ocorrer em um órgão específico, tal como o pulmão, cérebro, fígado ou intestino ou a inflamação pode ser de natureza realmente sistêmica.

Por exemplo, a doença pulmonar crônica faz com que os tecidos dentro do pulmão se tornem inflamados enquanto que a meningite neonatal envolve a inflamação dos revestimentos do cérebro e medula espinhal. A leucomalácia periventricular é causada pela lesão inflamatória da área periventricular do cérebro em desenvolvimento. A enterocolite necrotizante causa inflamação do intestino que pode resultar na destruição de parte ou de todo o intestino, e a hepatite neonatal envolve uma inflamação do fígado que ocorre na infância precoce. A sepse, também conhecida síndrome da resposta inflamatória sistêmica, é uma doença severa causada por uma infecção devastadora da corrente sanguínea por bactérias que produzem toxina. Nessa doença, os patógenos na corrente sanguínea fazem surgir uma resposta inflamatória através de todo o corpo.

Lactentes prematuros ou criticamente doentes também representam um sério desafio em termos de desenvolvimento de imunidade intestinal e prevenção de inflamação sistêmica. Lactentes pré-termo ou criticamente doentes são, geralmente, colocados imediatamente em incubadoras estéreis, onde eles permanecem isolados das populações bacterianas às quais o lactente designado saudável, poderia ser exposto normalmente. Isso pode retardar ou prejudicar o processo natural de colonização. Esses lactentes são também, geralmente, tratados com antibióticos de amplo espectro, que matam bactérias comensais que tentam colonizar o trato intestinal do lactente. Além disso, esses lactentes são frequentemente alimentados por meio de uma fórmula para lactente, mais do que com leite materno. Cada um desses fatores pode fazer com que a microflora intestinal se desenvolva

inapropriadamente, causando ou precipitando, assim, a inflamação sistêmica que ameaça a vida.

Nos anos recentes, a suplementação de bactérias probióticas nas dietas de lactentes amamentados com fórmula foi sugerida a fim de estimular a colonização intestinal com micro-organismos benéficos. Bactérias probióticas são micro-organismos vivos que exercem efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro. Fuller, R. *Probiotics in Man and Animals* J. Appl. Bacteriol. 66:365-78 (1989).

Embora bactérias probióticas viáveis possam ser eficazes na normalização da microflora intestinal, existem pouquíssimos estudos publicados que avaliem sua segurança em prematuros e lactentes imunodeprimidos. Essas populações especiais têm uma barreira de defesa intestinal imatura que aumenta o risco de translocação das bactérias luminais, causando um risco potencialmente elevado de infecções. Em muitos casos, probióticos viáveis não são recomendados para pacientes imunodeprimidos, pacientes após cirurgia cardíaca, pacientes com disfunção pancreática ou pacientes com sangue nas fezes. Pelo menos uma morte foi relatada devido à suplementação com probiótico em um indivíduo imunodeprimido. MacGregor G., et al. *Yoghurt biotherapy: contraindicated in immunosuppressed patients?* Postgrade Med. J. 78:366-367 (2002).

Assim, para pacientes imunodeprimidos ou lactentes prematuros, pode ser útil fornecer um suplemento não-ativo que possa tratar ou prevenir a inflamação sistêmica. Uma alternativa não-ativa para probióticos ativos ou viáveis pode ter benefícios adicionais tais como validade mais prolongada. Probióticos ativos ou viáveis são sensíveis ao calor, umidade e luz e, apropriadamente, devem ser refrigerados para manter a viabilidade. Mesmo com essas precauções, a validade de um probiótico inativado típico é relativamente curta. Uma alternativa não-viável para probióticos vivos deverá evitar a necessidade de refrigeração e deverá fornecer um produto que tenha uma validade mais longa. O produto poderá então ser distribuído para regiões do mundo sem refrigeração rapidamente disponível. Uma alternativa não-viável para probiótico deverá fornecer, além disso, menos risco de inte-

ração com outros componentes alimentícios, tais como fermentadores e alterações no gosto, textura e frescor do produto. Consequentemente, poderá ser benéfico fornecer um método para reduzir ou prevenir a inflamação sistêmica em lactentes amamentados com fórmula, que compreende a administração de probióticos inativados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Resumidamente, portanto, a presente invenção é dirigida para um novo produto que compreende pelo menos um probiótico inativado, em que o probiótico é não-viável, mas os componentes celulares do probiótico inativado retêm os atributos reativos biológicos iguais ou similares àqueles das células viáveis ou não-inativadas do probiótico.

Em outras modalidades, a invenção é dirigida a um método de utilizar uma ou mais cepas inativadas de probióticos para os mesmos benefícios reativos biológicos ou similares, como o probiótico viável ou vivo.

Em outras modalidades, a invenção é dirigida para um método de tratar, prevenir ou reduzir a inflamação sistêmica e/ou respiratória em um indivíduo, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um probiótico inativado, em que o probiótico em sua forma viável é útil para tratar, prevenir ou reduzir a inflamação sistêmica e/ou respiratória em um indivíduo.

Em outras modalidades, a invenção é dirigida para um método de tratar, prevenir ou reduzir a inflamação respiratória em um indivíduo, o método compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um probiótico inativado, em que o probiótico em sua forma viável é útil para tratar, prevenir ou reduzir a inflamação respiratória em um indivíduo.

Em outras modalidades, a invenção é dirigida para um método de prevenir ou reduzir a liberação sistêmica de uma ou mais citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias em um indivíduo, o método compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um probiótico inativado.

Em uma modalidade particular, a invenção é dirigida para um

método de tratar, prevenir ou reduzir a inflamação sistêmica em um indivíduo, o método compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um probiótico inativado em combinação com pelo menos um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LC-PUFA) e/ou pelo menos um probiótico inativado viável. Em modalidades particulares, o LCPUFA pode ser o ácido docosa-hexaenoico (DHA) ou ácido araquidônico (ARA).

Entre as várias vantagens encontradas a serem atingidas pela presente invenção, ela pode reduzir ou prevenir inflamações sistêmicas ou respiratórias. A invenção também pode reduzir a inflamação no fígado, plasma, pulmões e intestino. Além disso, a invenção reduz ou previne a liberação de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-1 β (IL-1 β), IL-8, CINC-1 e níveis de oncogene relacionado ao crescimento (GRO/KC). Como a presente invenção pode ser usada para melhorar a condição inflamatória, ela também pode prevenir o aparecimento de infecções ou doenças deletérias.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Para uma compreensão mais completa da presente invenção, é feita agora referência às seguintes descrições tomadas em conjunto com as figuras que as acompanham.

figura 1 ilustra o efeito de probióticos ativos e inativados sobre a produção do peptídeo quimioatraente-1 de neutrófilo (CINC-1) induzido por citocina no fígado usando um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). *Lactobacillus rhamnosus* GG inativados (LGG), um exemplar de probiótico inativado, está assinalado como LGG inativados por calor "heat-LGG".

figura 2 ilustra o efeito de probióticos ativo e inativado sobre a produção do peptídeo CINC-1 no plasma usando ELISA. LGG inativado está assinalado como LGG inativados por calor "heat-LGG".

figura 3 ilustra o efeito de probióticos ativo e inativado sobre a produção do peptídeo CINC-1 no pulmão usando ELISA. LGG inativado está assinalado como LGG inativados por calor "heat-LGG".

figura 4 ilustra o efeito de probióticos ativo e inativado sobre a

produção do oncogene relacionado ao crescimento (GRO/KC) no fígado usando um ensaio multiplex de citocina. LGG inativado está assinalado como LGG inativados por calor "heat-LGG".

5 figura 5 ilustra o efeito de probióticos ativo e inativado sobre a produção de GRO/KC no pulmão usando um ensaio multiplex de citocina. LGG inativado está assinalado como LGG inativados por calor "heat-LGG".

10 figura 6 ilustra o efeito de probióticos ativo e inativado sobre os níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) no fígado usando um ensaio multiplex de citocina. LGG inativado está assinalado como LGG inativados por calor "heat-LGG".

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

15 Agora será feita referência em detalhes das modalidades da invenção, um ou mais exemplos das quais estão descritos abaixo. Cada exemplo é fornecido como meio de explicação da invenção, não como uma limitação da invenção. De fato, ficará claro para aqueles versados na técnica que várias modificações e variações podem ser feitas sem se afastar do escopo ou espírito da invenção. Por exemplo, características ilustradas ou descritas como parte de uma modalidade podem ser usadas em outra modalidade para se obter uma modalidade adicional.

20 Assim, é pretendido que a presente invenção cubra tais modificações e variações como estando dentro do escopo das reivindicações anexas ou seus equivalentes. Outros objetivos, características e aspectos da presente invenção estão descritos ou são óbvios a partir da seguinte descrição detalhada. Deve ficar compreendido por aquele versado na técnica que
25 a presente discussão é uma descrição apenas de modalidades exemplares e não pretende limitar os aspectos mais amplos da presente invenção.

30 As seguintes abreviações são usadas aqui: LGG, *Lactobacillus rhamnosus* GG; LCPUFA, ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa; LPS, lipopolissacarídeo; IL, interleucina; CINC-1, quimioatraente-1 de neutrófilo induzido por citocina; GRO/KC, oncogene relacionado ao crescimento; ELISA, ensaio imunossorvente ligado a enzima; RT-PCR, reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa; ANOVA, análise de variância; SD, des-

vio-padrão; RMS, substituto de leite de rato; TLRs, receptores similares a Toll; NF- κ B, fator kappa B nuclear; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosa-hexaenoico; ARA, ácido araquidônico.

TLRs são uma família de receptores de reconhecimento de vertebrados. Eles se desenvolveram como moléculas-chave na imunidade inata e adaptável. Eles desempenham um papel crucial no reconhecimento de componentes microbianos conservados. Componentes da parede celular do organismo, DNA e RNA de fita dupla, são aparentemente reconhecidos por TLRs diferentes. Esses componentes derivados de bactéria (seja LPC, peptidoglicano ou CpG DNA) são ligantes naturais de TLR que retêm fortes propriedades imunomodulatórias na ausência das consequências patogênicas que resultariam, tipicamente, da proliferação normal das bactérias (diarreia, destruição tecidual, inflamação sistêmica, permeabilidade da barreira). Os componentes bacterianos agem, tipicamente, sobre a resposta imune adaptável, enquanto que as próprias bactérias são percebidas pela resposta imune inata.

A expressão "probiótico" significa um micro-organismo vivo, ativo ou viável que exerce efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro.

A expressão "prebiótico" significa um ingrediente alimentício não-digerível que estimula o crescimento e/ou a atividade de probióticos.

Como usada aqui, a expressão "tratar" significa melhorar, aliviar ou remediar uma doença, um distúrbio ou um sintoma de uma doença ou condição.

A expressão "reduzir" significa diminuir em extensão, quantidade ou grau.

A expressão "prevenir" significa parar ou evitar uma doença, um distúrbio ou um sintoma de uma doença ou condição através de alguma ação.

A expressão "sistêmico", como usada aqui, significa em relação ou que afeta todo o corpo.

As expressões "infecção respiratória" ou "doença respiratória" significam uma doença ou infecção que afeta o grupo de órgãos responsá-

veis por transportar o oxigênio do ar para a corrente sanguínea e por expelir o dióxido de carbono.

As expressões "probiótico inativado" ou "LGG inativado" significam que a atividade metabólica ou a habilidade reprodutora do probiótico ou organismo LGG foi reduzida ou destruída. Acredita-se que o "probiótico inativado" ou "LGG inativado" ainda retenham, a nível celular, pelo menos uma porção de seus ligantes de TLR naturais que, por sua vez, retêm pelo menos uma porção de suas propriedades imunomodulatórias. Como usada aqui, a expressão "inativado" é sinônima de "não-viável".

A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade que resulta em uma melhora ou remediação da doença, um distúrbio ou um sintomas da doença ou condição.

A expressão "pré-termo" significa um lactente nascido antes do final da 37ª semana de gestação.

A expressão "lactente" significa um ser humano após o nascimento que tem menos do que 1 ano de idade.

A expressão "criança" significa um ser humano entre as idades de cerca de 1 a 12 anos de idade. Em certas modalidades, uma criança está entre as idades de cerca de 1 a 6 anos de idade. Em outras modalidades, uma criança está entre as idades de cerca de 7 a 12 anos de idade.

Como usada aqui, a expressão "fórmula para lactente" significa uma composição que satisfaz as necessidades de nutrientes de um lactente sendo um substituto do leite humano.

De acordo com a presente invenção, um novo produto e um método para usar um probiótico inativado foram descobertos. O produto e o método compreendem a utilização de uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um probiótico inativado ou sua administração a um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é um lactente.

Tentativas anteriores para administrar eficazmente probióticos inativados encontraram obstáculos substanciais. Por exemplo, Kirjavainen, P. *et al.*, relataram que em uma comparação de LGG viável e inativado pelo calor, aproximadamente 40% das crianças suplementadas com LGG inativa-

do experimentaram diarreia severa. *Probiotic Bacteria in the Management of Atopic Disease: Underscoring the Importance of Viability*, J. Ped. Gastro. 36:223-227 (2003). Não foram relatadas reações adversas no grupo com placebo ou LGG viável. *Id.* em 225. Como a diarreia está amplamente associada com inflamação, o estudo de Kirjavainen indica que LGG inativado pode causar realmente infecção gastrointestinal. De fato, o estudo observa, "o processo de inativação pelo calor pode causar desnaturação de peptídeos de superfície e a expressão de proteína de choque térmico, modificando, assim, as propriedades imunoestimulatórias de LGG de tal maneira que a forma inativada pelo calor poderia induzir respostas inflamatórias e, consequentemente, aumentar a permeabilidade intestinal". *Id.* em 226. Em contraste, os presentes inventores desenvolveram um novo método para tratar ou prevenir inflamações através da administração de pelo menos um probiótico inativado por meio da ingestão de um produto contendo tais probióticos inativados.

Os presentes inventores descobriram que um probiótico inativado pode ser utilizado para obter efeitos benéficos iguais ou similares sobre um ser humano que o ingere como aqueles que o ser humano obteria pela ingestão do mesmo probiótico vivo ou viável. Diferente das propriedades reprodutoras e outras propriedades ativas estritamente associadas com um organismo vivo, os probióticos inativados da presente invenção retêm as propriedades celular e molecular e induzem respostas reativas biológicas iguais ou similares no corpo do hospedeiro que os ingere. Como tal, o probiótico inativado da invenção pode ser qualquer probiótico ou combinação de qualquer probiótico conhecida na técnica.

Em outras modalidades, o probiótico inativado pode ser um membro do gênero de *Lactobacillus*. Por exemplo, o probiótico inativado pode ser *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. bulgaricus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. gallinarum*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. johnsonii*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *L. reuteri* ou *L. salivarius*. Em certas modalidades, o probiótico inativado pode ser *L. acidophilus* LA-5®, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* AS-1, *L. acidophilus* DDS-1, *L. acidophi-*

lus HP10, *L. acidophilus* HP100, *L. acidophilus* HP101, *L. acidophilus* HP102, *L. acidophilus* HP103, *L. acidophilus* HP104, *L. acidophilus* HP15, *L. acidophilus* PIM703, *L. acidophilus* SBT2062, *L. casei* DN-114 001, *L. casei* LC10, *L. casei* PIM61, *L. casei* 431[®] (CRL 431), *L. casei* F19, *L. casei* Shirota, *L. casei* immunitass, *L. crispatus* BG2FO4, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 2038, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* MR120, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* PIM695, *L. plantarum* 299V, *L. reuteri* 1063-S, *L. reuteri* 11284, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* T-1, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* RC-14[®], *L.rhamnosus* GG (LGG) ATCC 53013, *L.rhamnosus* GR-1[®], *L.rhamnosus* LB21, *L.rhamnosus* R-011, *L.rhamnosus* R-049, *L.rhamnosus* MX1, *L. gasseri* ADH, *L. helveticus* MR220, *L. helveticus* NCK388, *L. johnsonii* 11088 (NCK 088), *L. johnsonii* La-1, *L.salivarius* UCC500, *L.salivarius* UCC118 ou *L. lactis* San.

Como descrito acima, em uma modalidade particular da invenção, o probiótico inativado pode ser LGG. LGG é uma cepa de probiótico isolada da flora intestinal saudável humana. Ele foi descrito na Patente U.S. Nº 5.032.399 por Gorbach *et al.*, que está incorporada aqui em sua totalidade, por referência. LGG é resistente a maioria dos antibióticos, estável na presença de ácido e bile e se liga avidamente a células da mucosa do trato

20 gastorintestinal humano. Ele sobrevive por 1 a 3 dias na maioria dos indivíduos e até por 7 dias em 30% dos indivíduos. Além da sua habilidade de colonização, LGG também afeta benéficamente respostas imunes da mucosa. LGG está depositado com a autoridade de depósito American Type Culture Collection, sob o número de acesso ATCC 53103.

25 Em outras modalidades ainda, o probiótico inativado pode ser um membro do gênero *Bifidobacterium*. Por exemplo, o probiótico inativado pode ser *B. animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. suis* ou *B. longum*. Em certas modalidades, o probiótico inativado pode ser *Bifidobacterium animalis ssp. animalis*, *B. animalis* DN-173 010, *B. animalis ssp. lactis* (BB-12[®]), *B. breve* Yakult, *B. breve* R-070, *B. infantis* BBI, *B. infantis* 35624, *B. lactis* HN019 (DR10), *B. longum* BB46, *B. longum* BBL ou *B. longum* BB536.

Como observado, o probiótico inativado pode ser *B. animalis*

ssp. *lactis* (BB-12[®]), disponibilizado por Chr. Hansen Biosystems, localizada em Milwaukee, WI. BB-12[®] é uma bactéria anaeróbica Gram-positivo em forma de haste, que pode ser encontrada no intestino grosso da maioria dos mamíferos, incluindo seres humanos.

5 Em outras modalidades ainda, o probiótico inativado pode ser *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus coagulans*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus sanguis* ou *Streptococcus thermophilus*. Em uma modalidade particular, o probiótico inativado pode ser *E. coli* Nissle 1917.

10 Em outra modalidade, o probiótico inativado pode ser *Sacharomyces cerevisiae* (boulardii) Iyo. Em outra modalidade ainda, o probiótico inativado pode ser *Lactococcus lactis* L1A. Em uma modalidade adicional, o probiótico inativado pode ser *S. thermophilus* TH-4[®].

Em uma modalidade da invenção, pode ser usado mais do que
15 um probiótico inativado. Qualquer combinação de probióticos inativados é contemplada nessa modalidade, desde que a combinação atinja o resultado pretendido. Em uma modalidade particular, a combinação pode compreender um ou mais membros do gênero *Bifidobacterium* e um ou mais membros do gênero *Lactobacillus*, tais como BB-12[®] e LGG que podem ser utilizados.
20 Em uma modalidade separada, pode ser utilizada uma combinação de BB-12[®] e LA-5[®].

No método da invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz de probiótico inativado é uma quantidade suficiente para reduzir ou prevenir a inflamação sistêmica em um indivíduo. Essa quantidade pode corresponder entre cerca de 1×10^4 e 1×10^{12} equivalentes celulares por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a presente invenção compreende a administração de cerca de 1×10^6 e 1×10^9 equivalentes celulares por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade ainda, a presente invenção compreende a administração de cerca de 1×10^9 equivalentes celulares
25 por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a presente invenção compreende a administração de cerca de 1×10^{10} equivalentes celulares por kg de peso corporal por dia.
30

Na presente invenção, é utilizado pelo menos um probiótico inativado que tenha sido inativado. A inativação pode ocorrer através de qualquer método atualmente conhecido na técnica ou ainda por ser desenvolvido. A inativação pode ser obtida, por exemplo, através de tratamento térmico, liofilização, luz ultravioleta, radiação gama, pressão, ruptura química ou ruptura mecânica. Por exemplo, o probiótico pode ser inativado pelo tratamento térmico através do armazenamento entre 80°C e 100°C por 10 minutos. O probiótico também pode ser inativado com luz ultravioleta através da irradiação por 5 minutos a uma distância de 5 cm de uma lâmpada de UVC de 30 Watts. Alternativamente, o probiótico pode ser inativado com radiação gama através da irradiação com 2kg-Gray (kGy) usando uma fonte de Cobalto 60 a uma distância de 20 cm.

A forma de administração do probiótico inativado no método da invenção não é crítica, desde que uma quantidade terapeuticamente eficaz seja administrada. Em algumas modalidades, pelo menos um probiótico inativado é administrado ao indivíduo através de comprimidos, pílulas, encapsulados, cápsulas, cápsulas gelatinosas, cápsulas, pastilhas oleosas ou sachês. Em outra modalidade, o probiótico inativado é encapsulado em um açúcar, gordura ou polissacarídeo. Em outra modalidade, o probiótico inativado é adicionado a um produto alimentício ou bebida e consumido. O produto alimentício ou bebida pode ser um produto nutricional para crianças, tais como uma fórmula de seguimento, leite para o crescimento, bebida, leite, iogurte, suco de frutas, bebida à base de fruta, comprimido mastigável, biscoito, bolacha ou leite em pó. Em outras modalidades, o produto pode ser um produto nutricional para lactentes, tais como uma fórmula para lactente ou um fortificante para o leite humano.

Se, pelo menos, um probiótico inativado é administrado através de uma fórmula para lactente, a fórmula para lactente deve ser nutricionalmente completa e conter tipos e quantidades adequadas de lipídeo, carboidrato, proteína, vitamina e minerais. A quantidade de lipídeo ou gordura pode variar, tipicamente, entre cerca de 3 a cerca de 7 g/100 kcal. As fontes de lipídeo podem ser qualquer uma conhecida ou usada na técnica, por exem-

plo, óleos vegetais tais como óleo de palma, óleo de soja, palmoleína, óleo de coco, óleo de triglicerídeo de cadeia média, óleo de girassol com alto teor de ácido oleico, óleo de açafrão com alto teor de ácido oleico e similares. A quantidade de proteína pode variar, tipicamente, entre cerca de 1 a cerca de 5 g/100 kcal. As fontes de proteína podem ser qualquer uma conhecida ou usada na técnica, por exemplo, leite desnatado, proteína de soro de leite, caseína, proteína de soja, proteína hidrolisada, aminoácidos e similares. A quantidade de carboidrato pode variar, tipicamente, entre cerca de 8 a cerca de 12 g/100 kcal. As fontes de carboidrato podem ser qualquer uma conhecida ou usada na técnica, por exemplo, lactose, glicose, sólidos de xaropes de milho, maltodextrinas, sucrose, amido, sólido de xarope de arroz e similares.

Convenientemente, fórmulas para lactente comercialmente disponíveis podem ser usadas. Por exemplo, Enfamil[®], Enfamil[®] Premature Formula, Enfamil[®] com Ferro, Lactofree[®], Nutramigen[®], Pregestimil[®] e Pro-Sobee[®] (disponibilizado por Mead Johnson & Company, Evansville, IN, U.S.A) podem ser suplementados com níveis adequados de probióticos inativados e usados na prática do método da invenção.

Em uma modalidade da invenção, pelo menos um probiótico inativado pode ser combinado com um ou mais probióticos viáveis para tratar ou prevenir a inflamação sistêmica em fórmulas alimentícias para lactentes. Qualquer probiótico viável conhecido na técnica pode ser aceitável nessa modalidade, desde que ele atinja o resultado pretendido. Em uma modalidade particular, o probiótico viável pode ser selecionado a partir de qualquer um dos gêneros ou espécies de probióticos aqui discutidos.

Se um probiótico inativado viável é administrado em combinação com o probiótico inativado, a quantidade de probiótico viável pode corresponder entre cerca de 1×10^4 e 1×10^{12} unidades formadoras de colônia (cfu) por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, os probióticos viáveis podem compreender entre cerca de 1×10^6 e 1×10^9 cfu por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade ainda, os probióticos viáveis podem compreender cerca de 1×10^9 cfu por kg de peso corporal por dia. Em outra mo-

dalidade ainda, os probióticos viáveis podem compreender cerca de 1×10^{10} cfu por kg de peso corporal por dia.

Em outra modalidade da invenção, pelo menos um probiótico inativado pode ser combinado com um ou mais prebióticos para tratar ou
5 prevenir a inflamação sistêmica ou respiratória em fórmulas alimentícias para lactentes. Qualquer prebiótico conhecido na técnica pode ser aceitável nessa modalidade, desde que ele atinja o resultado pretendido. Prebióticos úteis na presente invenção incluem lactulose, glico-oligossacarídeo, inulina, polidextrose, galacto-oligossacarídeo, fruto-oligossacarídeo, isomalto-
10 oligossacarídeo, oligossacarídeos de soja, lactossucrose, xilo-oligossacarídeo e gentio-oligossacarídeos.

Em outra modalidade da presente invenção ainda, a fórmula para lactente pode conter outros agentes ativos, tais como LCPUFAs. LCPUFAs adequados incluem, mas não são limitados a, ácido α -linoleico, ácido γ -
15 linoleico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido eicosapentanoico (EPA), ARA e/ou DHA. Em uma modalidade, um probiótico inativado é administrado em combinação com DHA. Em outra modalidade, um probiótico inativado é administrado em combinação com ARA. Em outra modalidade ainda, um probiótico inativado é administrado em combinação com ambos, DHA e A-
20 RA. Fórmulas para lactentes comercialmente disponíveis que contêm DHA, ARA ou uma combinação desses podem ser suplementadas com pelo menos um probiótico inativado e usadas na presente invenção. Por exemplo, Enfamil® LIPIL®, que contém níveis eficazes de DHA e ARA, está disponível comercialmente e pode ser suplementado com pelo menos um probiótico
25 inativado e utilizado na presente invenção.

Em uma modalidade, ambos DHA e ARA são usados em combinação com pelo menos um probiótico inativado para tratar inflamação sistêmica em lactentes. Nessa modalidade, a proporção em peso de ARA:DHA está tipicamente entre cerca de 1:3 a cerca de 9:1. Em uma modalidade da
30 presente invenção, a proporção está entre cerca de 1:2 a cerca de 4:1. Em outra modalidade, a proporção está entre cerca de 2:3 a cerca de 2:1. Em uma modalidade particular da invenção, a proporção é de cerca de 2:1. Em

uma outra modalidade particular da invenção, a proporção é de cerca de 1:1,5. Em outras modalidades, a proporção é de cerca de 1:1,3. Em outras modalidades ainda, a proporção é de cerca de 1:1,9. Em uma modalidade particular, a proporção é de cerca de 1,5:1. Em uma modalidade adicional, a
5 proporção é de cerca de 1,47:1.

Em certas modalidades da invenção, o nível de DHA está entre cerca de 0,0% e 1,00% de ácidos graxos em peso.

O nível de DHA pode ser cerca de 0,32% em peso. Em algumas modalidades, o nível de DHA pode ser cerca de 0,33% em peso. Em outra
10 modalidade, o nível de DHA pode ser cerca de 0,64% em peso. Em outra modalidade, o nível de DHA pode ser cerca de 0,67% em peso. Em outra modalidade, o nível de DHA pode ser cerca de 0,96% em peso. Em uma modalidade adicional, o nível de DHA pode ser cerca de 1,00% em peso.

Em modalidades da invenção, o nível de ARA está entre 0,0% e
15 0,67% de ácidos graxos em peso. Em outra modalidade, o nível de ARA pode ser cerca de 0,67% em peso. Em outra modalidade, o nível de ARA pode ser cerca de 0,5% em peso. Em outra modalidade, o nível de ARA pode estar entre cerca de 0,47% e 0,48% em peso.

Se incluído, a quantidade eficaz de DHA em uma modalidade da
20 presente invenção está tipicamente entre 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 está entre cerca de 6 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 100 mg por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a quantidade está entre cerca de 10 mg por kg de peso
25 corporal por dia a cerca de 60 mg por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a quantidade está entre cerca de 15 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 30 mg por kg de peso corporal por dia.

Se incluído, a quantidade eficaz de ARA em uma modalidade da presente invenção está tipicamente entre 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
30 modalidade dessa invenção, a quantidade varia entre cerca de 10 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 120 mg por kg de peso corporal por dia.

Em outra modalidade, a quantidade varia entre cerca de 15 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 90 mg por kg de peso corporal por dia. Em outra modalidade, a quantidade varia entre cerca de 20 mg por kg de peso corporal por dia a cerca de 60 mg por kg de peso corporal por dia.

5 Se for utilizada uma fórmula para lactente, a quantidade de DHA na fórmula para lactente pode variar entre cerca de 5 mg/100 kcal a cerca de 80 mg/100 kcal. Em uma modalidade da presente invenção, DHA varia entre cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 50 mg/100 kcal; e em outra modalidade, entre cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 20 mg/100 kcal. Em uma modalidade particular, a quantidade de DHA é de cerca de 17 mg/100 kcal.

10 Se for utilizada uma fórmula para lactente, a quantidade de ARA na fórmula para lactente pode variar entre cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 100 mg/100 kcal. Em uma modalidade da presente invenção, a quantidade de ARA varia entre cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 70 mg/100 kcal.

15 Em outra modalidade, a quantidade de ARA varia entre cerca de 20 mg/100 kcal a cerca de 40 mg/100 kcal. Em uma modalidade particular, a quantidade de ARA é de cerca de 34 mg/100 kcal.

 Se for usada uma fórmula para lactente, a fórmula para lactente pode ser suplementada com óleos que contêm DHA e ARA usando técnicas-

20 padrão conhecidas. Por exemplo, DHA e ARA podem ser adicionados à fórmula pela substituição de uma quantidade equivalente de um óleo, tal como óleo de girassol rico em ácido oleico, normalmente presente na fórmula. Como outro exemplo, os óleos que contêm DHA e ARA podem ser adicionados à fórmula pela substituição de uma quantidade equivalente do restante

25 de toda mistura de gordura normalmente presente na fórmula sem DHA e ARA.

 Se utilizados, a fonte de DHA e ARA pode ser qualquer fonte conhecida na técnica tal como óleo marinho, óleo de peixe, óleo de organismos unicelulares, lipídeo de gema de ovo, lipídeo cerebral, e similares. Em

30 algumas modalidades, DHA e ARA são originados de óleo de organismo unicelular Martek, DHASCO® ou suas variações. DHA e ARA podem estar em forma natural, desde que o remanescente da fonte de LCPUFA não re-

sulte em qualquer efeito deletério substancial para o lactente. Alternativamente, DHA e ARA pode ser usado na forma refinada.

Em uma modalidade da presente invenção, as fontes de DHA e ARA são óleos de organismos unicelulares como falado nas Patentes U.S. N° 5.374.567; 5.550.156; e 5.397.591, cujas descrições estão incorporadas aqui por referência em suas totalidades. Entretanto, a presente invenção não está limitada apenas a tais óleos.

Em uma modalidade, uma fonte de LCPUFA que contém EPA é usada em combinação com pelo menos um probiótico inativado. Em outra modalidade, uma fonte de LCPUFA, que é substancialmente livre de EPA, é usada em combinação com pelo menos um probiótico inativado. Por exemplo, em uma modalidade da presente invenção, uma fórmula para lactente que contém menos do que cerca de 16 mg de EPA/100 kcal, é suplementada com pelo menos um probiótico inativado e usada no método da presente invenção. Em outra modalidade, uma fórmula para lactente que contém menos do que cerca de 10 mg de EPA/100 kcal, é suplementada com pelo menos um probiótico inativado e usada no método da presente invenção. Em outra modalidade ainda, uma fórmula para lactente que contém menos do que cerca de 5 mg de EPA/100 kcal, é suplementada com pelo menos um probiótico inativado e usada no método da presente invenção. Outra modalidade da invenção inclui uma fórmula para lactente suplementada com pelo menos um probiótico inativado que é livre de quantidades residuais de EPA.

Acredita-se que o fornecimento de uma combinação de pelo menos um probiótico inativado com DHA e/ou ARA fornece efeitos complementares ou sinérgicos com relação às propriedades anti-inflamatórias das formulações que contêm esses agentes. Apesar de não desejar estar restrito a essa ou qualquer outra teoria, acredita-se que probióticos inativados fornecem efeitos anti-inflamatórios, em parte, pela prevenção da ubiquitinação de κB inibitória. ($I\kappa B$). Em células normais, $I\kappa B$ se liga ao fator nuclear κB ($NF\kappa B$) dentro do citoplasma. Quando ocorre a ubiquitinação de $I\kappa B$, $NF\kappa B$ é liberado, entra no núcleo da célula e ativa genes que são responsáveis pela resposta inflamatória. É essa interação específica e a alteração resultante da

expressão de gene que é pensada estar envolvida na modulação da inflamação. Acredita-se que probióticos inativados previnam a ubiquitinação de I κ B, prevenindo, dessa maneira a liberação de NF κ B e reduzindo ou prevenindo a inflamação.

5 Em contraste, ácidos graxos ω -3 tais como DHA são pensados fornecer ação anti-inflamatória através da alteração da produção de mediadores pró-inflamatórios, derivados de ácido graxo, amplamente conhecidos como eicosanoides. Ácidos graxos ω -6, tais como ARA, que estão localiza-

10 a resposta inflamatória e liberam um pool de ARA livre. Esse pool de ARA livre é então influenciado por duas classes de enzimas, conhecidas como lipoxigenases e ciclo-oxigenases, que produzem um espectro específico de eicosanoides incluindo a série de 2-prostanoides, tais como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

15 Esses eicosanoides são conhecidos por ter uma abundancia de ações pró-inflamatórias em vários tipos de células e órgãos. É sabido que dietas ricas em ácidos graxos ω -3, tais como EPA e DHA, são competidoras com ácidos graxos ω -6 em várias etapas desse processo e, portanto, moderam os efeitos pró-inflamatórios de ARA. Por exemplo, ácidos graxos ω -3

20 modulam o alongamento de ácidos graxos ω -6 em ARA, a incorporação de ARA no pool de fosfolípídeo da membrana celular e a produção de eicosanoides pró-inflamatórios a partir de ARA. A combinação de DHA e ARA, portanto, fornece ações distintas, mas complementares, para moderar a resposta inflamatória em múltiplos tecidos.

25 Além disso, em algumas modalidades da invenção, probióticos viáveis e inativados são administrados em combinação um com outro. A combinação de probióticos viáveis e inativados é acreditada fornecer efeitos complementares e sinérgicos com relação às propriedades anti-inflamatórias de formulações que contêm esses agentes. Embora não desejando ficar res-

30 trito a essa ou qualquer outra teoria, probióticos viáveis são considerados conferir efeitos anti-inflamatórios em parte através da interação com receptores específicos, conhecidos como receptores similares à Tool (TLRs) sobre a

superfície de células imunes específicas. A interação direta ou indireta entre probióticos viáveis e esses receptores inicia uma cascata de transdução de sinal que resulta na alteração da expressão de gene nessas células-alvo. É essa específica interação e alteração do resultado na expressão de gene e outros efeitos celulares que são acreditados estarem envolvidos na modulação da inflamação. Assim, como probióticos viáveis e inativados são considerados operar através de mecanismos diferentes, acredita-se que a combinação desses componentes fornece efeitos anti-inflamatórios complementares ou sinérgicos.

Além disso, em algumas modalidades da invenção, pelo menos um probiótico inativado viável, pelo menos um probiótico inativado e pelo menos um LCPUFA são administrados em combinação. Como probióticos viáveis, probióticos inativados e LCPUFAs são considerados operar através de mecanismos diferentes, acredita-se que a combinação desses componentes forneça efeitos complementares ou sinérgicos com relação às propriedades anti-inflamatórias das formulações que contêm esses agentes.

Em algumas modalidades da presente invenção, o indivíduo tem necessidade de tratar, reduzir ou prevenir a inflamação sistêmica. O indivíduo pode estar em risco de inflamação sistêmica devido à predisposição genética, à dieta, ao modo de vida, a doenças, a distúrbios e similares. Por exemplo, um lactente pré-termo ou imunodeprimido pode estar em risco de inflamação sistêmica e pode, portanto, necessitar de tal tratamento, redução ou prevenção.

Em certas modalidades, o probiótico inativado pode ser administrado a um lactente ou a uma criança para prevenir, tratar ou reduzir a inflamação sistêmica. Em uma modalidade, o lactente pode ter menos do que um ano de idade. Em outra modalidade, a criança pode estar entre as idades de um e seis anos. Em outra modalidade ainda, a criança pode estar entre as idades de sete e doze anos.

Em uma modalidade da presente invenção, o indivíduo é um lactente amamentado com uma fórmula. Em uma modalidade, o lactente é amamentado com uma fórmula desde o nascimento. Em outra modalidade, o

lactente é amamentado ao seio desde o nascimento até a idade que é menor do que um ano e a partir daí é amamentado com uma fórmula, em cujo momento inicia-se a suplementação com probiótico inativado.

Em uma modalidade particular da presente invenção, o método
5 compreende tratar ou prevenir a inflamação sistêmica em um lactente pré-termo alimentado com uma fórmula. Nesse método, o probiótico inativado pode ser administrado ao lactente pré-termo na forma de uma fórmula infantil, fortificador de leite humano ou qualquer outra forma adequada. Além disso, se desejado, o probiótico inativado pode ser administrado ao lactente
10 pré-termo em combinação com DHA, ARA e/ou um ou mais probióticos viáveis para criar um efeito anti-inflamatório potencialmente sinérgico.

Em uma modalidade da presente invenção, o probiótico inativado reduz ou previne a liberação sistêmica de uma ou mais citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. Como usado aqui, citocinas ou quimiocinas "pró-inflamatórias" incluem aquelas conhecidas na técnica por estarem envolvidas na regulação positiva de reações inflamatórias. Exemplos incluem, mas
15 não se limitam a TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e GRO/KC.

Quimiocinas são um grupo de citocinas que possibilitam a migração de leucócitos do sangue para os tecidos no local da inflamação.
20 Quando produzidas em quantidades excessivas, as quimiocinas podem levar à lesão do tecido saudável. O oncogene relacionado ao crescimento (GRO/KC) é uma quimiocina que recruta células imunes para o local da inflamação. É o equivalente humano para o quimioatraente de neutrófilo induzido por citocina (CINC-1) de rato e está funcionalmente relacionado à família da interleucina-8.
25

Em uma modalidade posterior da invenção, probióticos inativados mostraram inibir a translocação do fator κ B nuclear (NF κ B). NF κ B é um fator de transcrição primário encontrado em todos os tipos celulares, que é acreditado desempenhar um papel importante no início da inflamação. NF κ B
30 está presente como um complexo inibitório κ B (I κ B) ligado, latente e inativo no citoplasma. Quando uma célula recebe qualquer um de uma multiplicidade de sinais extracelulares, tais como de citocinas, antígenos bacterianos ou

radicais livres, NF κ B rapidamente entra no núcleo e ativa genes que são responsáveis pela resposta inflamatória. Foi mostrado que a inibição de NF κ B no início da inflamação resulta em uma resposta inflamatória diminuída. Lawrence *et al.*, *Possible New Role for NF κ B in the Resolution of Inflammation*, Nature Med. 7:1291 (2001). Assim, a inibição de NF κ B através de uma suplementação com probiótico inativado da presente invenção auxilia na redução ou na prevenção de inflamação sistêmica.

Como será visto nos exemplos, probióticos inativados têm mostrado reduzir a inflamação sistêmica em lactentes amamentados com uma fórmula. Os níveis de CINC-1 e de várias citocinas em ratos lactentes alimentados com uma fórmula foram reduzidos a níveis similares àqueles de ratos lactentes alimentados com leite materno quando suplementados com probióticos inativados.

Como será mostrado nos exemplos, probióticos inativados também mostraram reduzir significativamente a produção de IL-8, diminuir a translocação de NF- κ B e aumentar a produção de I κ B no epitélio intestinal. Os inventores descobriram, surpreendentemente, que probióticos inativados previnem adicionalmente a ubiquitinação de I κ B, enquanto que probióticos viáveis não previnem.

Os exemplos seguintes descrevem várias modalidades da presente invenção. Outras modalidades dentro do escopo das reivindicações ficarão claras para aquele versado na técnica, a partir da consideração do pedido ou da prática da invenção como aqui descrita.

Pretende-se que o pedido, junto com os exemplos, sejam considerados apenas como exemplares, com o escopo e espírito da invenção sendo indicados pelas reivindicações que acompanham os exemplos. Nos exemplos, todas as porcentagens são dadas com base no peso, a não ser que seja indicado de outra maneira.

Exemplo 1

Esse exemplo ilustra o efeito da suplementação com probiótico inativado sobre a inflamação sistêmica de filhotes de rato recém-nascidos alimentados com uma fórmula. LGG foi usado como o probiótico nesse e-

xemplo.

Materiais e Métodos

Em dois experimentos separados, ratos lactentes Sprague-Dawley (Taconic, Germantown, NY) foram designados aleatoriamente para quatro grupos de alimentação por gastrostomia com cinco ratos por grupo: um grupo de controle (sem LPS ou LGG), um grupo com LPS, um grupo com LPS mais LGG viável e um grupo com LPS mais LGG inativado. Ratos da mesma idade criados pela mãe foram usados como controles de referência. A alimentação por gastrostomia, usando o modelo "pup-in-the-cup" para rato lactente, começou no dia 7 da vida dos filhotes de rato. Os tubos para alimentação por gastrostomia foram construídos a partir de seções de 24 cm de tubo de polietileno que foram inseridos no estômago dos filhotes. A colocação da gastrostomia foi feita sob anestesia com isofluorano. Bombas com seringa controladas com timer foram conectadas aos tubos de alimentação e foram ajustadas para alimentar os ratos nos primeiros 20 minutos de cada hora em uma taxa de fluxo dependente do peso.

Durante um período de aclimação de dois dias, os filhotes de rato alimentados por gastrostomia foram alimentados com um substituto de leite de rata (RMS). Após o período de aclimação, a um dos grupos alimentados com RMS foi dado um suplemento de 1×10^8 equivalentes celulares por kg de peso corporal por dia de LGG inativado. O LGG foi inativado através de tratamento térmico letal. A um segundo grupo foi dado um suplemento de 1×10^8 cfu/L por kg de peso corporal por dia de LGG viável. O terceiro grupo foi alimentado com RMS sem suplementação de LGG de qualquer tipo. Essas alimentações continuaram por 6 dias. Todos os grupos alimentados por gastrostomia receberam a mesma quantidade de gordura e carboidratos e o componente proteico foi similar à quantidade requerida para o crescimento normal. Ratos alimentados pela mãe da mesma idade foram usados como controles de referência.

Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 0127:B8 (LPS; Sigma, St. Louis, MO) foi dissolvido em água por rotação em uma concentração de 2 mg/ml. Aos ratos alimentados por gastrostomia foram dados en-

tre 0,25 e 0,5 mg/kg/dia de LPS através do tubo de gastrostomia começando 2 dias após o início da alimentação artificial. Os filhotes foram suplementados com LPS por 6 dias. Essa dose foi determinada em estudos pilotos para resultar em tremores, ereção de pelos e pouco ganho de peso, mas não estava associada com um aumento significativo da mortalidade durante o período de 6 dias.

No final do período de 6 dias de tratamento, os filhotes de rato foram sacrificados com uma dose excessiva de pentobarbital sódico. O intestino delgado foi removido e separado em três partes: o íleo, o jejuno e o duodeno, armazenados a -80°C para ensaios com enzima e ELISA, ou fixados em formalina tamponada neutra 10% para morfologia intestinal. Os pulmões, fígado e plasma foram armazenados a -80°C para ensaios com enzima e ELISA.

O programa estatístico Sigmastat (SPSS, Chicago, IL) foi usado para analisar o peso corporal, ELISA para CINC-1 e resultados de ensaio multiplex de citocina/quimiocina. Todos os dados foram relatados como a média $\pm$ desvio-padrão (SD). Uma análise de via única de variância entre os grupos (ANOVA) foi usada para determinar se havia uma diferença significativa presente entre todos os grupos de tratamento. O método de Holm-Sidak foi realizado para comparações em pares quando a ANOVA era significativa com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Crescimento

Esse exemplo ilustra o efeito da administração de probiótico sobre o crescimento de filhotes após alimentação por gastrostomia. Os filhotes de rato foram pesados diariamente após a alimentação por gastrostomia e comparados com animais de referência alimentados pela mãe. Os animais alimentados pela mãe cresceram mais rapidamente do que os filhotes alimentados por gastrostomia tratados com LPS. O fornecimento de probióticos viáveis ou inativados para os filhotes alimentados por gastrostomia tratados com LPS não melhorou o ganho de peso.

CINC-1

Probióticos viáveis ou inativados reduziram os níveis de CINC-1 na presente invenção. Os níveis de CINC-1 foram determinados com kits TiterZyme Enzyme Immunometric Assay para o oncogene relacionado ao crescimento/CINC-1 de rato (Assay Designs, Ann Arbor, MI). As amostras de tecido foram isoladas dos extratos celulares de tecidos completos no fígado, intestino, plasma e pulmão. A absorbância foi determinada em 450 nm e a concentração foi calculada usando a equação derivada de uma curva linear padrão.

Como mostrado nas figuras 1 a 3, os resultados de ELISA mostraram que LPS aumentou os níveis de CINC-1 no fígado, pulmões e plasma. Ambos os probióticos viável e inativado diminuíram a produção de CINC-1 induzida por LPS no fígado (figura 1) e plasma (figura 2) ($p < 0,05$) e também mostraram uma tendência ($p = 0,09$) no pulmão (figura 3).

A figura 1 ilustra que a suplementação com probiótico viável reduziu os níveis de CINC-1 no fígado em aproximadamente 50%, quando comparado com o grupo de LPS. Entretanto, o probiótico inativado reduziu os níveis de CINC-1 no fígado em cerca de 75%, quando comparado com o grupo com LPS. Assim, um probiótico inativado teve um efeito redutor significativamente maior sobre os níveis de CINC-1 no fígado do que os probióticos viáveis, indicando um acentuado efeito anti-inflamatório. Similarmente, a figura 2 ilustra que os níveis de CINC-1 no plasma eram menores no grupo com probiótico inativado do que no grupo com probiótico viável. No pulmão, ambos os probióticos viável e inativado reduziram os níveis de CINC-1 em um grau similar (figura 3).

25 GRO/KC

Como mostrado nas figuras 4 e 5, o ensaio multiplex de citocina mostrou reduções similares nos níveis de GRO/KC no fígado e nos pulmões. O probiótico inativado diminuiu os níveis de GRO/KC em uma extensão maior do que os probióticos viáveis no fígado, indicando um acentuado efeito anti-inflamatório (figura 4). Ambos os probióticos viável e inativado reduziram os níveis de GRO/KC em um nível similar nos pulmões (figura 5).

Os níveis reduzidos de CINC-1 e GRO/KC que foram observa-

dos no pulmão no presente experimento, indicam que o efeito anti-inflamatório de probióticos inativados se estende para órgãos distais. Assim, o efeito anti-inflamatório de probióticos inativados é realmente de natureza sistêmica.

- 5 No fígado, a suplementação com probiótico inativado reduziu os níveis de CINC-1 para um nível que era realmente menor do que aquele de filhotes de rato alimentados com leite materno. No pulmão e no plasma, os probióticos inativados reduziram os níveis de CINC-1 para um nível que era muito similar àquele de filhotes de rato alimentados com leite materno. Es-
- 10 ses resultados mostram que probióticos inativados têm a habilidade de reduzir a inflamação sistêmica em um lactente alimentado com fórmula para um nível que é similar, e em alguns casos menor, àquele de um lactente amamentado ao seio.

Citocinas e Quimiocinas

- 15 Probióticos viáveis e inativados também reduzem os níveis de citocina e quimiocina. Kits de conta multiplex foram adquiridos de LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO, USA). As citocinas/quimiocinas foram analisadas por um kit que incluía: fator que estimula colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), interferon- λ (IFN- λ), interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2,
- 20 IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18, Proteína-1 Quimioatraente de Monócito (MCP-1), GRO/KC (CINC-1 de rato) e TNF- α . O ensaio multiplex foi realizado de acordo com as especificações do fabricante. As curvas padronizadas para cada citocina/quimiocina foram geradas pelo uso de concentrações de referência fornecidas pelos fabricantes. Os dados brutos (in-
- 25 tensidade fluorescente média) foram analisados pelo MasterPlex Quantitation Software (MiraiBio, Inc., Alameda, CA, USA) para obter os valores de concentrações.

- 30 Como mostrado na figura 6, os níveis de IL-1 β no fígado estavam significativamente elevados em filhotes dos grupos alimentados por gastrostomia, tratados com LPS do que nos filhotes de controle. Ambos os probióticos viável e inativado enfraqueceram a elevação de IL-1 β induzida por LPS. De fato, os probióticos inativados reduziram os níveis de IL-1 β em

uma extensão maior do que a suplementação com probiótico viável. Os probióticos inativados reduziram a expressão de IL-1 β a um nível que era similar àquele dos filhotes de controle. Assim, essa parte do experimento ilustra ainda a atividade anti-inflamatória sistêmica de probióticos inativados.

5 Em conclusão, esses resultados mostram que a suplementação com probiótico inativado reduz a inflamação sistêmica. Além disso, os resultados também mostram que probióticos inativados reduzem a inflamação sistêmica em lactentes amamentados com fórmula para um nível que é similar àquele observado em lactentes amamentados ao seio. Isso está ilustrado
10 nos resultados aqui descritos, através da comparação do grupo tratado com probiótico inativado e o grupo exclusivamente amamentado com leite materno. Em várias ocasiões, a administração de probióticos inativados resulta em uma resposta anti-inflamatória que é muito similar àquela do grupo alimentado com leite materno.

15 Exemplo 2

Esse exemplo ilustra adicionalmente o efeito de suplementação com probiótico inativado sobre a inflamação em filhotes de rato recém-nascidos alimentados com fórmula. Nesse exemplo, LGG foi utilizado como o probiótico.

20 As células epiteliais intestinais foram pré-tratadas com 1×10^8 cfu/L de LGG viável ou inativado por UV e então estimuladas com Flagellin 500 ng/ml. A produção de IL-8 foi medida por ELISA. A expressão de I κ B e de I κ B ubiquitinado (UbQ-I κ B) foi medida por Western Blotting e imunoprecipitação. A localização de NF κ B foi avaliada pela coloração imunofluorescente.
25 te.

Durante o experimento, Flagellin induziu um aumento significativo na produção celular de IL-8 ($p < 0,05$). As células pré-tratadas tanto com LGG viável quanto com LGG inativado por UV, e então estimuladas com Flagellin, mostraram uma alteração significativa em IL-8 ($p < 0,05$), translocação nuclear de NF κ B, I κ B e UbQ-I κ B. Os resultados são mostrados na Tabela 1. As setas que apontam para cima indicam um aumento no parâmetro,
30 enquanto que as setas que apontam para baixo indicam uma diminuição no

parâmetro.

Tabela 1: Alterações de Expressão Devidas a Suplementação com Probiótico Viável ou Inativado.

	IL-8	Translocação de NFκB	IκB	UbQ-IκB
Flagellin apenas	↑	↑	↓	↑
LGG Viável	↓	↓	↑	↑
LGG Inativado	↓	↓	↑	↓

Como mostrado na Tabela 1, Flagellin induziu um aumento significativo na produção celular epitelial intestinal de IL-8 ($p < 0,05$). A produção de IL-8 foi significativamente regulada negativamente na presença de ambos LGG viável e inativado. Além disso, as células estimuladas por Flagellin mostraram translocação nuclear de NFκB, que foi prevenida por ambos LGG viável e inativado. Flagellin diminuiu a produção de IκB, mas esse efeito foi revertido por ambos os pré-tratamentos com LGG viável e inativado ($p < 0,05$). Flagellin e LGG viável aumentaram UbQ-IκB ($p < 0,05$), enquanto que LGG inativado diminuiu UbQ-IκB.

Esse exemplo ilustra que ambos os probióticos viável e inativado são eficazes na diminuição da produção de IL-8, uma citocina pró-inflamatória e, por isso, têm efeito anti-inflamatório. Como Flagellin e o probiótico viável aumentaram UbQ-IκB, mas o probiótico inativado diminuiu UbQ-IκB, probióticos inativados provavelmente operam através de um mecanismo que previne a ubiquitinação de IκB, enquanto que probióticos viáveis provavelmente não previnem. Assim, esse exemplo ilustra ainda que probióticos viáveis e inativados provavelmente operem através de mecanismos diferentes e podem ter efeitos sinérgicos quando administrados juntos.

A presente invenção mostrou reduzir a inflamação no fígado, plasma e pulmões. Como a presente invenção pode ser usada para melhorar a condição inflamatória, ela também pode prevenir o aparecimento de infecções ou doenças deletérias.

Todas as referências citadas nesse pedido, incluindo sem limitação, todos os documentos, publicações, patentes, pedidos de patente, apresentações, textos, relatos, manuscritos, brochuras, livros, mensagens de

internet, artigos de jornais, periódicos e similares, estão incorporados pela referência nesse pedido em suas totalidades. A discussão das referências é pretendida meramente resumir as afirmações feitas por seus autores e não é feita nenhuma admissão de que qualquer referência constitua a técnica anterior. As requerentes se reservam o direito de desafiar a acurácia e pertinência das referências citadas.

Essas e outras modificações e variações da presente invenção podem ser praticadas por aqueles versados na técnica, sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção, que está mais particularmente descrita nas reivindicações anexas. Além disso, deve ficar compreendido que as características das várias modalidades podem ser permutadas no todo ou em parte. Além disso, aqueles versados na técnica apreciarão que a descrição precedente é apenas como meio de exemplo e não pretende limitar a invenção descrita mais adiante em tais reivindicações anexas. Entretanto, o espírito e o escopo das reivindicações anexas não devem ser limitados à descrição das versões preferidas nela contidas.

REIVINDICAÇÕES

1. Produto para crianças ou lactentes compreendendo pelo menos um probiótico inativado, em que o produto é formulado para liberar entre cerca de 1×10^4 a cerca de 1×10^{10} equivalentes celulares de probiótico inativado por kg de peso corporal por dia para uma criança ou lactente, e em que com exceção das propriedades reprodutivas, o pelo menos um probiótico inativado retém as propriedades biológicas reativas celular e molecular do probiótico viável.
5
2. Produto de acordo com a reivindicação 1, em que o pelo menos um probiótico inativado é selecionado do grupo que consiste em todos os probióticos conhecidos e combinações dos mesmos.
10
3. Produto de acordo com a reivindicação 1, em que o pelo menos um probiótico inativado é selecionado do grupo que consiste em um membro do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e combinações dos mesmos.
15
4. Produto de acordo com a reivindicação 1, em que o probiótico inativado compreende uma combinação de um ou mais membros do gênero *Lactobacillus* e um ou mais membros do gênero *Bifidobacterium*.
5. Produto de acordo com a reivindicação 1, em que o produto é formulado para liberar cerca de 1×10^6 a cerca de 1×10^9 equivalentes celulares por kg de peso corporal por dia.
20
6. Produto de acordo com a reivindicação 1, em que o produto é formulado para liberar cerca de 1×10^9 equivalentes celulares por kg de peso corporal por dia.
7. Produto de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda pelo menos um probiótico inativado viável.
25
8. Produto de acordo com a reivindicação 7, em que o probiótico viável é selecionado do grupo que consiste em *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *B. animalis* ssp. *lactis* (BB-12[®]) e combinações dos mesmos.
9. Produto de acordo com a reivindicação 1, em que o produto compreende ainda, pelo menos, um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LCPUFA).
30

10. Produto de acordo com a reivindicação 9, em que o LCPUFA é selecionado do grupo que consiste em ácido docosa-hexaenoico (DHA), ácido araquidônico (ARA) e combinações dos mesmos.

11. Produto de acordo com a reivindicação 10, em que a proporção de ARA:DHA está entre cerca de 2:3 e cerca de 2:1.

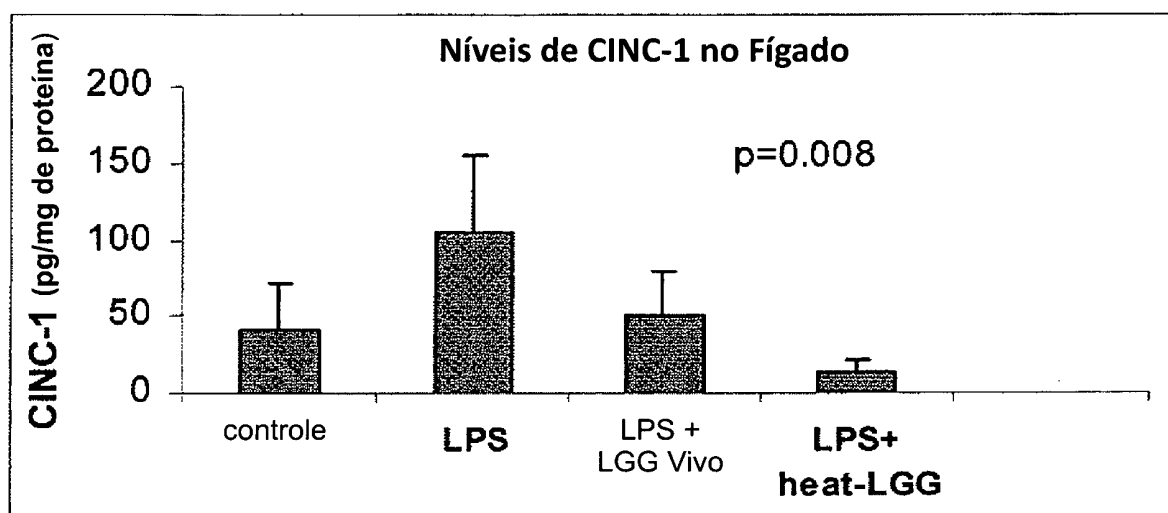


FIG. 1

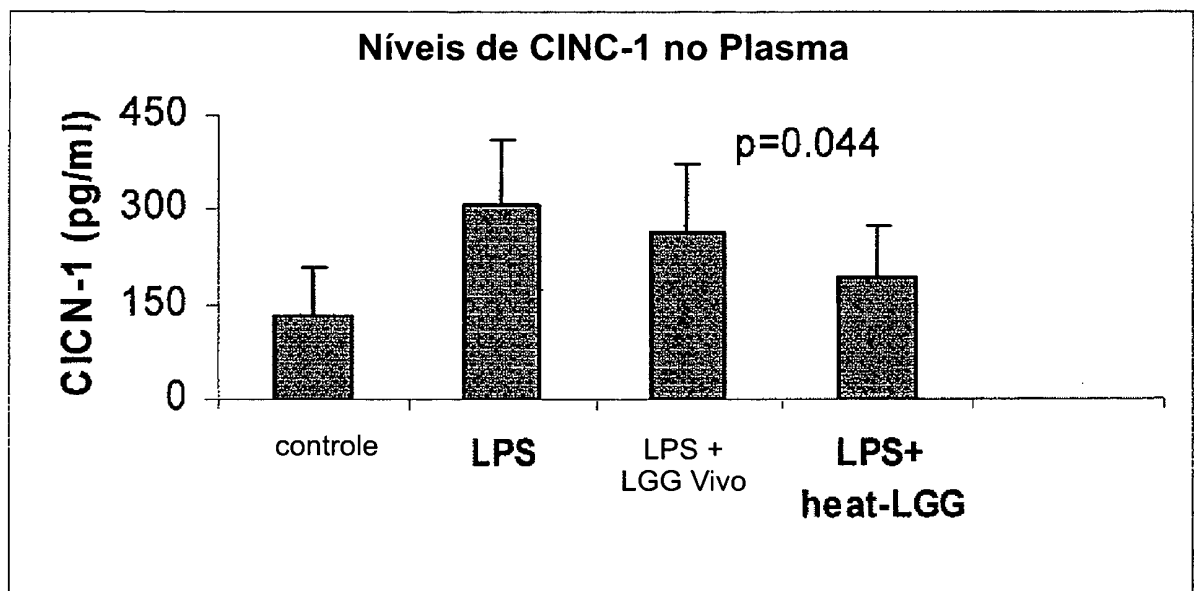


FIG. 2

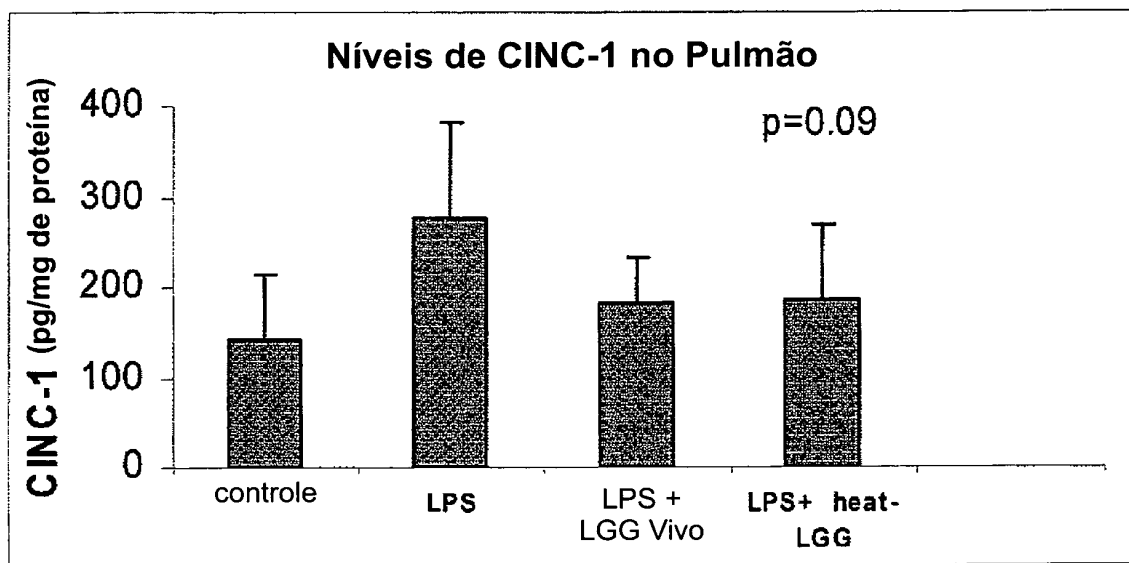


FIG. 3

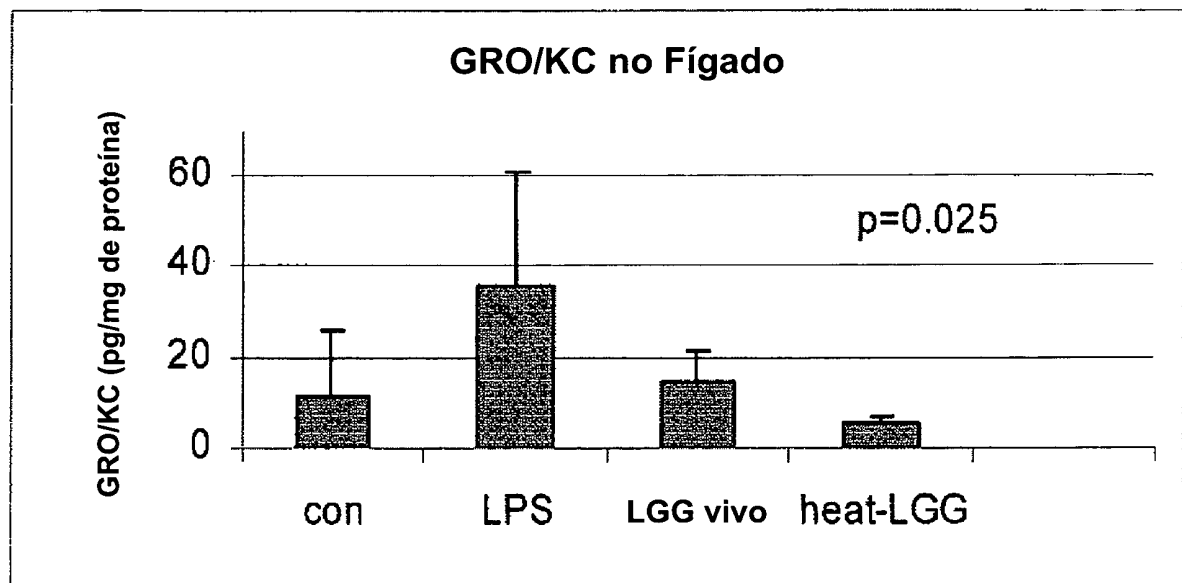


FIG. 4

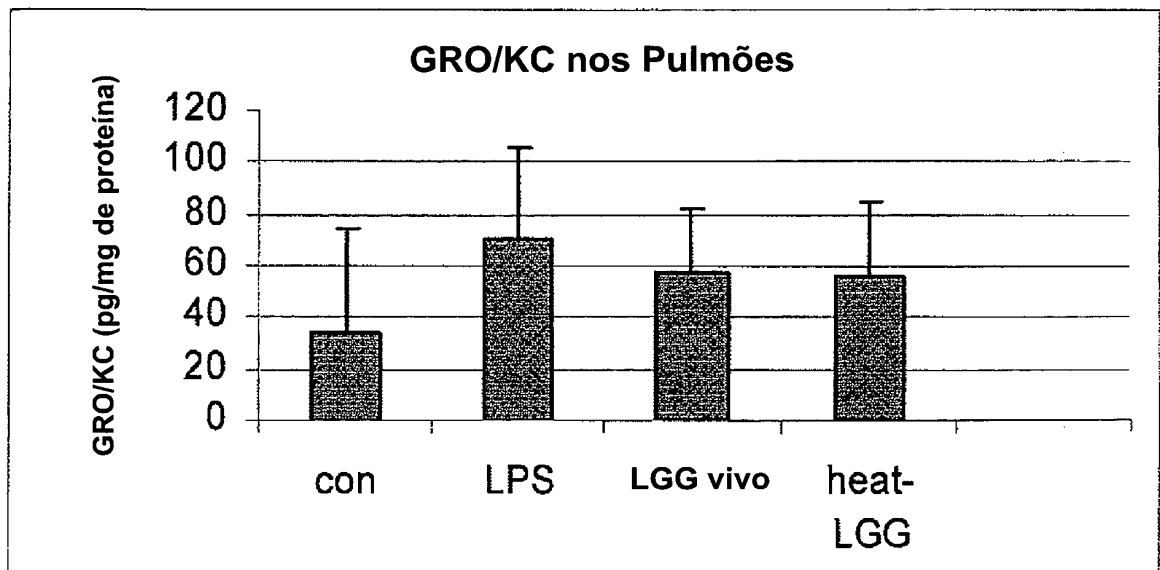


FIG. 5

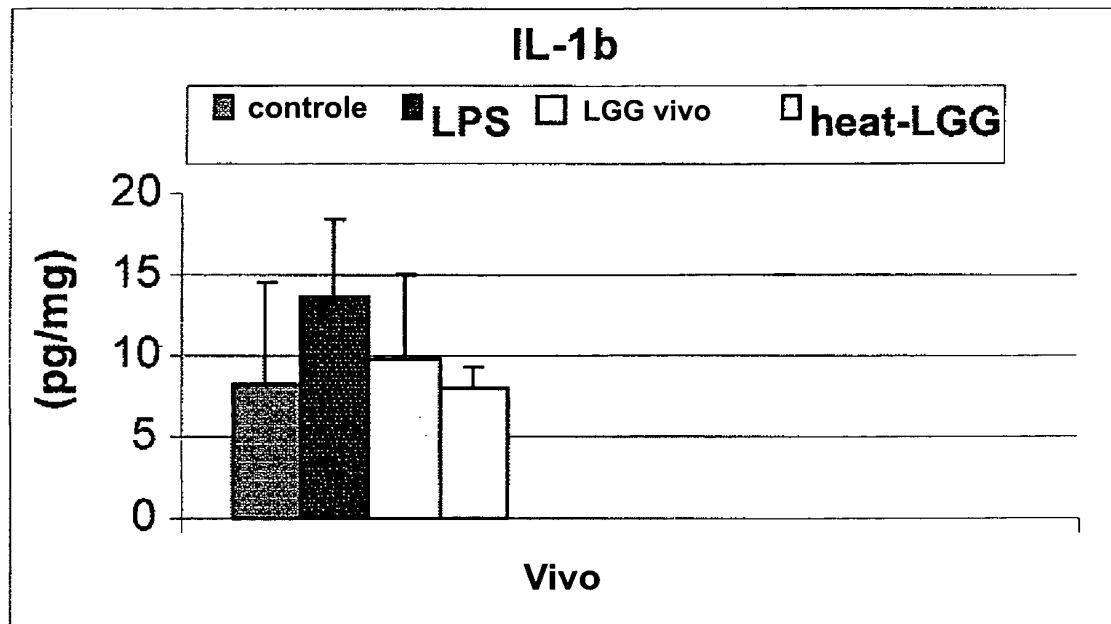


FIG. 6

RESUMO

Patente de Invenção: **"PRODUTO CONTENDO PROBIÓTICO INATIVADO PARA CRIANÇAS OU LACTENTES"**.

5 A presente invenção refere-se a um produto para crianças ou lactentes que compreende pelo menos um probiótico inativado, em que o produto é formulado para liberar entre cerca de 1×10^4 a cerca de 1×10^{10} e-
quivalentes celulares de probiótico inativado por kg de peso corporal por dia para uma criança ou lactente e em que, com exceção das propriedades re-
produtivas, o pelo menos um probiótico inativado retém as propriedades rea-
10 tivas biológicas celular e molecular do probiótico viável.