

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.07.05	(73) Titular(es): SHS INTERNATIONAL LTD.
(30) Prioridade(s):	100 WAVERTREE BOULEVARD LIVERPOOL L7 9PT GB
(43) Data de publicação do pedido: 2010.03.24	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2014.09.10 237/2014	JANE ELIZABETH LANGFORD GB IAN SULLIVAN GB CATHERINE TERESA DEERING GB SANDRA HELEN GIFFEN GB
	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **FÓRMULA SEM PROTEÍNA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PRODUTO ALIMENTAR NÃO ALÉRGICO, QUE COMPREENDE - UMA FRAÇÃO DE AMINOÁCIDO QUE COMPREENDE, PELO MENOS, UM COMPONENTE SELECIONADO A PARTIR DO GRUPO QUE CONSISTE EM AMINOÁCIDOS E PÉPTIDOS POSSUINDO UM GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DE 7 OU MENOS; E - UMA FRAÇÃO LIPÍDICA QUE COMPREENDE, PELO MENOS, UM ÁCIDO GORDO SELECIONADO A PARTIR DO GRUPO QUE CONSISTE EM ÁCIDO ARAQUIDÓNICO E ÁCIDO DOCOSAHEXANÓICO, TENDO A COMPOSIÇÃO UM TEOR DE PROTEÍNAS E DE OUTROS PÉPTIDOS POSSUINDO UM PESO MOLECULAR DE 1000 DALTONS OU MAIS OU MENOS DO QUE 0,01 % EM PESO, COM BASE NO PESO SECO, DE PREFERÊNCIA, MENOS DE 0,001 % EM PESO, MAIS PREFERENCIALMENTE MENOS DE 0,0001 % EM PESO.

RESUMO

FÓRMULA SEM PROTEÍNA

A presente invenção refere-se a um produto alimentar não alérgico, que compreende - uma fração de aminoácido que compreende, pelo menos, um componente selecionado a partir do grupo que consiste em aminoácidos e péptidos possuindo um grau de polimerização de 7 ou menos; e - uma fração lipídica que compreende, pelo menos, um ácido gordo selecionado a partir do grupo que consiste em ácido araquidónico e ácido docosahexanóico, tendo a composição um teor de proteínas e de outros péptidos possuindo um peso molecular de 1000 daltons ou mais ou menos do que 0,01 % em peso, com base no peso seco, de preferência, menos de 0,001 % em peso, mais preferencialmente menos de 0,0001 % em peso.

DESCRIÇÃO

FÓRMULA SEM PROTEÍNA

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à estimulação da saúde em crianças que recebem uma fórmula à base de aminoácidos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Numa situação preferida, os bebés são amamentados pela mãe. No entanto, muitas vezes, em crianças, após um período inicial de serem amamentadas, o aleitamento materno é interrompido e a dieta infantil compreende principalmente fórmula de leite infantil.

No entanto, num pequeno grupo de crianças o aleitamento materno ou a alimentação de fórmula infantil convencional resulta em reações adversas, tais como dor e reação alérgica. As pessoas que sofrem de uma alergia podem ter dificuldade em digerir ou metabolizar alguns componentes da alimentação, o que, em seguida, leva a reações alérgicas gastrointestinais e sistémicas. As reações alérgicas são dirigidas principalmente à fração de proteína na alimentação. É muitas vezes necessária uma alteração significativa na dieta para reduzir os eventos adversos.

Para evitar reações alérgicas às proteínas, o alimento infantil é constituído por proteínas do leite hidrolisadas, aminoácidos ou proteínas não lácteas, por exemplo, proteínas de soja e outros componentes nutricionais que não provocam reações alérgicas.

Uma nutrição infantil conhecida que compreende aminoácidos como a fonte de azoto é Neocate™ para o uso em pacientes que sofrem de alergia, de queixas

gastrointestinais, de eczema, de má absorção ou de má digestão.

Na tecnologia anterior, o número de diferentes fontes de nutrientes é muitas vezes mantido baixo para impedir a introdução de alérgenos na fórmula pela adição destes ingredientes. No entanto, isto tem a desvantagem de que as crianças também não beneficiam dos efeitos benéficos de tais ingredientes adicionais.

O documento WO2005039319 divulga a utilização de simbióticos na fórmula infantil, incluindo a proteína na forma hidrolisada, reduzindo assim o risco de alergia (página 11, linhas 35 - 37). O documento WO 2007/054989 descreve culturas de bactérias probióticas antialérgicas. O documento WO2006091103 divulga uma composição nutricional que compreende simbióticos para o tratamento e prevenção de distúrbios do sistema imunológico, incluindo a alergia. É divulgada a utilização de hidrolisado de proteína e/ou de aminoácidos livres para reduzir o risco de alergia.

É o objetivo da presente invenção melhorar as fórmulas alimentares para este grupo de pacientes vulneráveis, ao proporcionar benefícios nutricionais adicionais sem a introdução de alérgenos na composição.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores reconheceram que numa fórmula elementar contendo uma variedade de aminoácidos livres sem proteína intacta, é altamente imprevisível como é que a flora intestinal se desenvolve. Em vez da flora dominante de bifidobactérias e lactobacilos em crianças normais que recebem leite materno, muitas outras espécies bacterianas, incluindo espécies potencialmente patogénicas, podem prevalecer no intestino dos bebés que recebem alimentos à base de aminoácidos.

A presente invenção é definida pelas reivindicações e será descrita na parte "descrição detalhada da invenção".

O desenvolvimento de uma flora intestinal saudável é particularmente importante em todas as crianças, uma vez que estas crianças muitas vezes já sofrem de uma função imunológica diminuída, resultando em cólicas, congestão, nariz a pingar, pieira, vômitos, diarreia, fezes com sangue, muco nas fezes, prurido, ou eczema.

Os presentes inventores reconheceram que o desenvolvimento de uma flora saudável é de importância muito elevada em crianças que recebem uma dieta que contém principalmente aminoácidos livres como uma fonte de proteína. Sem estar limitado pela teoria, os inventores reconheceram que uma boa flora, ou seja, uma flora rica em Bifidobacteria e Lactobacilli, é especialmente benéfica para a maturação (mucosa) do sistema imunitário. Uma boa flora impede o desenvolvimento de alergias, ou pelo menos reduz a gravidade de alergias em tais crianças. Assim, os presentes inventores reconheceram a importância de um desenvolvimento de flora benéfica nestas crianças.

Apesar das limitações na formulação da fórmula dietética para tais crianças vulneráveis, os presentes inventores descobriram que uma seleção específica de oligossacáridos dietéticos, de preferência frutanos e/ou produtos de degradação da pectina, pode ser adicionada benéficamente à fórmula elementar para estimular o desenvolvimento da flora sem causar quaisquer efeitos secundários alérgicos.

Não podem ser usados produtos derivados do leite na presente fórmula elementar, uma vez que isto pode levar à adição de alérgenos do leite ao produto. Por conseguinte, as fibras prebióticas de acordo com esta invenção são cuidadosamente selecionadas de entre as fibras prebióticas conhecidas, a fim de evitar a adição de proteínas de leite ou de outras proteínas intactas e potenciais alérgicas

que estão presentes nas fibras da composição não alérgica.

Os inventores verificaram surpreendentemente num modelo de alergia reconhecido internacionalmente, que quando as fibras prebióticas são combinadas com bacterianas probióticas, nomeadamente *Bifidobacteria*, estava presente um efeito sinérgico na prevenção de reações alérgicas. Este efeito sinérgico é potencialmente muito benéfico para as crianças, mas também pode ser benéfico para adultos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a resposta alérgica de várias composições testadas em conformidade com um modelo de vacina em ratinho internacionalmente reconhecido.

A figura 2 demonstra o efeito sinérgico de TD1 (*Bifidobacterium breve*) e fibras dietéticas (OS) num modelo de alergia a caseína em ratinho.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma realização preferida de acordo com a invenção compreende a utilização de uma composição que compreende aminoácidos livres como uma fonte única de proteína, uma fonte de ácidos gordos que compreende ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa, uma fonte de hidratos de carbono que compreende hidratos de carbono digeríveis e não digeríveis, e *Bifidobacteria* livre de proteína do leite, para o fabrico de uma composição para o tratamento de uma pessoa que sofre de

a. cólica, congestão, nariz a pingar, pieira, vómitos, diarreia, fezes com sangue, muco nas fezes, prurido, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite

eosinofílica ou asma;

b. alergia ao leite de vaca e/ou intolerância alimentar a proteína; e/ou

c. infeções,

em que o hidrato de carbono não digerível é selecionado a partir de uma fonte livre de proteína de leite, e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

O termo "fonte única de proteína", tal como aqui usado, significa que a composição da presente invenção (de preferência) contém pelo menos 99 % em peso de aminoácidos com base na proteína total, de preferência pelo menos 99,5, mais preferencialmente pelo menos 99,9 % em peso.

A invenção proporciona ainda uma composição que compreende um componente proteico, um componente de gordura, um componente de hidrato de carbono digerível, um hidrato de carbono não digerível e bifidobactérias livres de proteína de leite em que:

a) o componente de proteína compreende mais do que 99 % em peso de aminoácidos livres com base na proteína total, 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;

b) o componente de hidratos de carbono digeríveis contém menos do que 2 % em peso de lactose com base nos hidratos de carbono digeríveis totais;

c) o hidrato de carbono não digerível compreende frutano solúvel com um DP médio entre 2 e 200, e um ácido galacturónico 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 total de ácido

gordo.

Tal como é mostrado na figura 1, a combinação de frutanos de cadeia longa solúveis (LFOS) com um oligossacárido de ácido (AOS), que era neste caso hidrolisado de pectina, funciona tão bem como as bifidobactérias, quando testado no modelo de ratinho. Contudo, é evidente que se os oligossacáridos são combinados com a Bifidobacteria os efeitos são fortemente melhorados.

A composição nutricional compreende ambas as fibras não digeríveis e a Bifidobacteria, uma vez que esta composição dá os melhores resultados no modelo de alergia em ratinho. (Veja-se a figura 1.) De preferência é usada *Bifidobacteria breve*.

Hidrato de carbono não digerível

Os frutanos são oligossacáridos neutros com base em frutose (> 50 % das unidades de monose são frutose), preferencialmente inulina, frutano e/ou frutooligossacáridos, mais preferencialmente uma mistura de frutooligossacáridos de cadeia longa (IcFOS) com um DP médio entre 10 - 60 e frutooligossacáridos de cadeia curta (scFOS) com um DP médio entre 3 e 10. A realização preferida compreende uma mistura de IcFOS e scFOS numa razão de 1:9, uma vez que esta razão se aproxima da composição de oligossacáridos do leite materno, e tem sido provada estimular eficazmente o crescimento de bifidobactérias em crianças.

O presente método compreende preferencialmente a administração de uma dose que compreende entre 0,05 e 25 gramas de sacárido não digerível, de preferência entre 0,1 e 5 gramas. O presente método compreende preferencialmente a administração de uma dose que compreende entre 0,05 e 25

gramas de scFOS, preferencialmente entre 0,1 e 5 gramas de scFOS. O presente método compreende preferencialmente a administração de 0,05 a 25 gramas de sacárido não digerível por dia, de preferência entre 0,1 e 5 gramas por dia.

Produto de degradação da pectina

A pectina está dividida em duas categorias principais: pectina altamente metoxilada, que se caracteriza por um grau de metoxilação acima de 50 %, e pectina pouco metoxilada que tem um grau de metoxilação abaixo de 50 %. Tal como é aqui utilizado, "grau de metoxilação" (também referido como DE ou "grau de esterificação") destina-se a significar a extensão na qual os grupos de ácido carboxílico livres contidos na cadeia de ácido poligalacturónico foram esterificados (por exemplo, por metilação). A presente pectina é preferivelmente preparada a partir de pectina altamente metoxilada.

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

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

A pectina é administrada de preferência numa

quantidade entre 0,1 e 100 gramas por dia, de preferência entre 0,4 e 50 gramas por dia, ainda mais preferencialmente entre 1 e 20 gramas por dia.

Uma realização preferida compreende frutanos e produtos de degradação da pectina numa razão de 50:50 - 95:5. De preferência, a razão é de 85:15, uma vez que esta é a razão entre oligossacáridos neutros e oligossacáridos ácidos tal como presentes no leite da mãe.

Bactérias probióticas

As bactérias probióticas que são adequadas para a utilização na invenção devem ter preferencialmente, pelo menos, um efeito positivo no modelo de alergia em ratinho, tal como descrito nos exemplos que se seguem. Os probióticos devem ainda ser recolhido na ausência substancial de alérgenos alimentares. Isto requer procedimentos especiais ou meios de cultura sem proteínas intactas para a preparação das bactérias probióticas.

A presente invenção requer bactérias probióticas na ausência substancial de proteínas do leite.

As bactérias probióticas são bifidobactérias. Ainda mais preferida a bactéria probiótica é a *Bifidobacterium breve*. As Bifidobacterias tem o efeito de indução de tolerância mais forte nos modelos de ratinho utilizados e, por conseguinte, são as preferidas. Em particular a *Bifidobacterium breve* é altamente eficaz.

Numa outra realização preferida, as Bifidobacterias são não viáveis. Isto tem a vantagem de que a vida de prateleira do produto se torna mais longa, e que a atividade imunomoduladora das bactérias torna-se independente do número de bifidobactérias vivas. As experiências têm mostrado que os efeitos estimuladores imunitários de bactérias não viáveis é semelhante e, por vezes, ainda melhor do que a atividade de bifidobactérias

vivas.

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

Aminoácidos

Os aminoácidos podem ser utilizados na fórmula nutricional para bebés e crianças. No entanto, a composição dos aminoácidos na fórmula compreende, preferencialmente, todos os aminoácidos essenciais, exceto para os pacientes com fenilcetonúria (PKU) e erros do metabolismo não PKU inatos, e é preferivelmente otimizada para comida para bebé ou nutrição infantil. Os inventores descobriram depois que a composição de aminoácidos mais ideal deve ser tão próxima quanto possível da composição de aminoácidos da fração de proteína do leite de mães. Isto resulta numa composição de aminoácidos preferida, tal como representado na tabela 1 (veja-se *infra*).

Numa realização preferida, a composição compreende menos do que 1 % em peso de péptidos com base na proteína total, e mais do que 99 % em peso de aminoácidos livres com base na proteína total, compreendendo, 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

A fórmula de acordo com a invenção compreende aminoácidos livres como fonte de azoto, gordura, incluindo uma mistura de gorduras que compreende LCPUFA e hidratos de carbono. São adicionados vitaminas e minerais de acordo

com os requisitos da legislação.

A presente composição fornece preferencialmente nutrição à criança, e compreende um componente lipídico, um componente proteico e um componente de hidratos de carbono. O componente lipídico fornece de preferência de 5 a 50 % das calorias totais, o componente proteico proporciona de preferência de 5 a 50 % das calorias totais, e o componente de hidrato de carbono fornece preferencialmente de 15 a 90 % das calorias totais. A presente composição é utilizada preferencialmente como uma fórmula para crianças, em que o componente lipídico fornece de 35 a 50 % das calorias totais, o componente proteico proporciona de 7,5 a 12,5 % das calorias totais, e o componente de hidratos de carbono proporciona de 40 a 55 % das calorias totais. Para o cálculo da % de calorias totais para o componente proteico, deve ser tomado o total de energia fornecida pelos aminoácidos.

LCPUFA

O teor de LC-PUFA com 20 e 22 átomos de carbono na presente composição não excede de preferência 15 % em peso do teor de gordura total, de preferência não excede 10 % em peso, ainda mais preferivelmente não excede 5 % em peso do teor de gordura total. Preferencialmente, a presente composição compreende pelo menos 0,1 % em peso, preferencialmente pelo menos 0,25 em peso, mais preferencialmente pelo menos 0,5 % em peso, ainda mais preferencialmente pelo menos 0,75 % em peso de LC-PUFA com 20 e 22 átomos de carbono do teor total de gorduras. O teor de ácido docosahexanóico (DHA) não excede preferencialmente 5 % em peso, mais preferencialmente não excede 1 % em peso, mas é pelo menos 0,1 % em peso da gordura total. Uma vez que o ácido araquidónico (AA) foi encontrado ser particularmente eficaz na redução da

permeabilidade das estruturas celulares apertadas, a presente composição compreende quantidades relativamente altas, preferencialmente pelo menos 0,1 % em peso, ainda mais preferencialmente pelo menos 0,25 % em peso, mais preferencialmente pelo menos 0,5 % em peso da gordura total. O teor de AA não excede preferencialmente 5 % em peso, mais preferencialmente não excede 1 % em peso da gordura total. O excesso de metabolitos de AA pode causar inflamação. Assim, a presente composição compreende de preferência AA e DHA, em que a razão de peso AA / DHA é preferencialmente acima de 0,25, de preferência acima de 0,5, ainda mais preferencialmente acima de 1. A razão é de preferência abaixo de 25.

Os LC-PUFA são preferencialmente óleos de célula única derivados de não peixes, por exemplo, disponíveis a partir de Martek.

As características preferidas para as composições de acordo com a invenção estão definidas nas tabelas 1 - 3.

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

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

Tabela 2. Fórmula nutricional infantil para crianças alérgicas

Perfil nutricional da fórmula para crianças de acordo com a invenção (pó)			
	Unidades	Nível / 100 g	Nível / 100 kcal
Equivalente proteico	gm	13	2,9
Energia	kcal	455	100
Nitrogénio	gm	2,1	
Hidrato de carbono	gm	49	10,8
Gordura (total)	gm	23	5,1
(MCT)	%	33	
(LCT)	%	67	

Tabela 3. Intervalos na composição de ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa (LCP)

	% de ácidos gordos		
	Preferida	Intervalo de +/- 25 %	
Ácido araquidónico	0,35	0,26	0,44
Ácido docosahexanóico	0,20	0,15	0,25
LCP total	0,55	0,41	0,69

Os intervalos preferidos na composição de oligossacáridos são 0,4 - 1,2 g / 100 ml, em que 85 % em peso é scFOS e IcFOS, e 15 % em peso é hidrolisado de pectina. De preferência, a razão scFOS para IcFOS é entre 2 e 20, ainda mais preferivelmente a razão é de 9.

Uma realização preferida de formulação em pó nutricionalmente completa, livre de proteína do leite e alérgeno de acordo com a invenção, que é adequada para diluição com água para formar uma alimentação entérica compreende:

Componente	Por 100 g de pó
Equivalente proteico (g)	13
<i>Aminoácidos totais (g)</i>	15,5
Gordura total (g)	23
Óleo de girassol (g)	4
Óleo de coco fracionado (g)	7
Óleo de canola (g)	4
Óleo de girassol de oleico elevado (g)	6,6
Óleo de ARASCO™ (g)	0,21
Óleo de DHASCO™ (g)	0,11
Hidrato de carbono: maltodextrina (g)	49
Prebiótico (g)	5,33
<i>ScFOS (g)</i>	4,1
<i>IcFOS (g)</i>	0,43
<i>AOS (g)</i>	0,8
Probiótico: B breve (unidades formadoras de colónias; UFC)	1 x 10 ¹⁰
Outras vitaminas / minerais / oligoelementos	Equilíbrio

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

A formulação pode ser diluída com água fervida, arrefecida, para proporcionar uma concentração recomendada

de 15 % p/v.

Usos

De preferência a composição é utilizada para o tratamento de uma criança (em particular com uma constituição atópica) que sofre de

- a. cólica, congestão, nariz a pingar, pieira, vômitos, diarreia, fezes com sangue, muco nas fezes, prurido, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;
- b. alergia ao leite de vaca e/ou intolerância alimentar a proteína; e/ou
- c. infeções.

A composição também pode ser utilizada de preferência para melhorar as características das fezes das crianças que sofrem dos sintomas mencionados anteriormente. A composição é concebida especificamente para crianças entre 0 e 3 anos. Com algumas adaptações no perfil de aminoácidos (veja-se a tabela 1) a composição também é adequada para crianças entre 3 e 10 anos de idade. As crianças alérgicas muitas vezes sofrem de diarreia, mas a obstipação também ocorre. Pode ser utilizada uma composição preferida para prevenir e tratar estes sintomas que compreende fibras de acordo com a composição do leite materno, em que a razão scFOS / lcFOS é de 9:1 e, adicionalmente, está presente hidrolisado de pectina.

EXEMPLOS

A fim de determinar os efeitos imunoestimulantes de oligossacáridos e de probiótico *Bifidobacterium breve* foram realizados testes (TD1) num modelo de vacina em

ratinho internacionalmente reconhecido (figura 1) e num modelo de alergia (figura 2).

Materiais e método do modelo de vacina

Ratinhos

Foram obtidos ratinhos fêmeas C57BI/6JOIaHsd com 6 e 8 semanas de idade a partir de Harlan (Horst, Holanda), e foram mantidos em condições normais com um ciclo de 12 h de luz e escuro, e livre acesso a comida e água. Todas as experiências foram aprovadas por uma comissão independente de experiências com animais (DEC Consult, Bilthoven, Holanda).

Dietas e preparações de oligossacáridos

Todos os animais receberam dietas à base de AIN-93G semipurificada (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Holanda). Todos os produtos de oligossacáridos suplementados foram trocados pela mesma quantidade de hidratos de carbono totais, para manter este parâmetro igual. Para além disso, esta abordagem resultou numa composição de hidratos de carbono global comparável em dietas diferentes, para assegurar que a flora intestinal foi influenciada minimamente por diferenças entre dietas de controlo e de teste nos parâmetros tais como o tempo de passagem pelo intestino e retenção de líquidos. Os oligossacáridos foram misturados na dieta AIN-93G e prensado em grânulos.

Protocolo de vacinação e resposta de DTH

As experiências de vacinação foram realizadas utilizando Influvac (Solvay Pharmaceuticals, Weesp, Holanda) da temporada 2002 / 2003. É uma vacina do vírus

da gripe inativado com base em hemaglutinina (HA) e antigénios de neuraminidase isolados de três estirpes de influenza mixovírus, numa dose equivalente a 30 µg/ml de HA por estirpe (90 µg/ml de HA no total). Foi utilizado um adjuvante de óleo em todas as vacinações (Stimune, conhecido anteriormente como Specol; Cedi-diagnostics, Lelystad, Holanda). Os ratinhos receberam uma vacinação primária e uma vacinação de reforço, que consiste de uma injeção via subcutânea (sc) de uma mistura 1:1 de vacina e adjuvante num volume total de 100 µl. A vacinação de reforço foi dada 21 dias após a vacinação primária. As experiências terminaram 10 dias após a vacinação de reforço. Foram recolhidas amostras de sangue (por punção retro-orbital) antes da vacinação primária e secundária e, no fim da experiência. Os grupos de controlo negativos que foram incluídos em todas as experiências (indicados por grupo "sham") receberam injeções com uma mistura 1:1 de PBS e adjuvante num volume total de 100 µl. Os grupos "sham" nunca foram usados para comparações estatísticas para grupos suplementados, mas serviram apenas para demonstrar a especificidade das respostas induzidas pela vacina. As reações DTH foram induzidas 9 dias após a vacinação de reforço, por injeção subcutânea de 25 µl de Influvac no pavilhão auricular de ambas as orelhas. A espessura da orelha foi medida em duplicado antes do desafio da vacina, e depois de 24 h, usando um micrómetro digital (Mitutoyo Digimatic 293561, Veenendaal, Holanda). A resposta DTH foi calculada subtraindo a espessura basal da orelha a partir do valor às 24 h após o desafio.

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

Produtos químicos

A caseína e o soro de leite são obtidos a partir de DMV internacional, Veghel, Holanda. A toxina da cólera é adquirida de Quadrantech Diagnostics, Epsom, Reino Unido. O PBS é comprado de Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica. O tampão de revestimento de Elisa é obtido a partir de Sigma, Alphen aan den Rijn, Holanda. A IgE de rato antirratinho marcada com biotina é comprada de BD Biosciences, Alphen aan den Rijn, Holanda. Todos os outros produtos químicos são obtidos a partir de Sigma-Aldrich-Chemie, Zwijndrecht, Holanda.

Sensibilização oral e desafio de ratinhos

Foram adquiridos ratinhos fêmea C3H/HeOuj livres de patógenos específicos de três a 5 semanas de idade (n = 4 - 6 por grupo) de Charles River Laboratories (Maastricht, Holanda), mantidos com ração de ratinho livre de proteína do leite de vaca (Special Diets Services, Witham, Essex, Reino Unido), e alojados no biotério da Universidade de Utrecht. Os cuidados com os animais e o seu uso foram realizados de acordo com as diretrizes do Comité Holandês de Experimentação Animal. Os ratinhos foram sensibilizados por via intra gástrica (ig) com 0,5 ml de caseína homogeneizada (40 mg/ml de PBS) com toxina da cólera (CT, 20 µl/ml de PBS) na forma de um adjuvante, utilizando uma agulha romba. Os ratinhos de controlo receberam CT sozinha ou PBS. Os ratinhos foram reforçados por semana durante um período de 6 semanas, uma semana após a última sensibilização os ratinhos foram desafiados com 100 mg ig de caseína.

Foram recolhidas amostras de sangue e foram depois centrifugadas (15 minutos a 13.500 rpm). Os soros foram armazenados a - 70 °C. Os ratinhos foram sacrificados por deslocamento cervical, meia hora depois do desafio ig.

Resposta específica da pele a alérgeno

A resposta aguda específica da pele a alérgeno foi medida após a injeção da proteína específica no pavilhão auricular. Antes do desafio ig ($t = 0$), o controlo, os ratinhos sensibilizados com caseína foram injetados por via intra dérmica (id) na orelha esquerda com 20 μ l de caseína homogeneizada (0,5 mg/ml em PBS), respetivamente. Na orelha direita foram injetados 20 μ l de PBS como um controlo do veículo. Para além disso, os ratinhos de CT e PBS receberam um desafio de ouvido de caseína usando injeções de PBS como controlo. A espessura da orelha foi medida em duplicado utilizando um micrómetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Holanda), a 0, 1, 4 e 24 horas após o desafio. O inchaço da orelha específico do alérgeno foi calculado subtraindo-se a espessura basal (0 h) e a de controlo (orelha direita) a partir do valor medido nos três pontos de tempo diferentes (1, 4 e 24 h).

Medição dos níveis de imunoglobulina no soro e de protease-1 de mastócitos de ratinho

Foram determinadas por meio de ELISA as concentrações dos níveis de IgE total e de caseína ou de IgE, IgG1 e IgG2a específicas de soro de leite no soro de ratinhos sacrificados. As placas Microlon (Greiner, Alphen aan den Rijn, Holanda) foram revestidas com caseína em tampão de revestimento ou com IgE de rato antirratinho (1 μ g/ml) em PBS durante 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas e foram bloqueadas durante 1 hora com 5 % de BSA. As

amostras de soro foram aplicadas em várias diluições e foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes e foram incubadas com 1 µg de IgE de rato antirratinho marcada com biotina durante uma hora e meia hora à temperatura ambiente. Depois de lavadas, as placas foram incubadas com peroxidase de rábano (HRP) durante uma hora, foram lavadas e foram reveladas com o-fenilenodiamina (OPD). A reação foi parada com 4 M de H₂SO₄ e a absorvância foi medida a 490 nm num leitor de microplacas Benchmark (Biorad, Califórnia, EUA). As concentrações no soro da protease-1 de mastócitos de ratinho (mMCP-1) foram determinadas tal como descrito anteriormente, utilizando um kit de ELISA disponível comercialmente (Moredun Scientific Ltd., Midlothian, Reino Unido).

Os resultados do modelo de vacina em ratinho são mostrados na figura 1, a partir da qual é evidente que a combinação de TD1 (= *Bifidobacterium breve*) proporciona o efeito mais forte sobre a resposta de DTH, e é significativamente melhor do que TD1 sozinho ou qualquer outra combinação testada.

Os resultados do modelo de alergia a caseína em ratinho são mostrados na figura 2, e demonstram que a combinação de fibra dietética e TD1 inibe sinergicamente a resposta "alergénica" DTH a caseína.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 2005039319 A [0007]
- WO 2007054989 A [0007]
- WO 2006091103 A [0007]

Lisboa, 1 de Dezembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma composição que compreende mais do que 99 % em peso de aminoácidos livres com base na proteína total, uma fonte de ácidos gordos que compreende ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa, uma fonte de hidratos de carbono que compreende hidratos de carbono digeríveis e não digeríveis, e Bifidobacteria livre de proteína do leite, para o fabrico de uma composição para o tratamento de uma pessoa que sofre de

a. cólica, congestão, nariz a pingar, pieira, vômitos, diarreia, fezes com sangue, muco nas fezes, prurido, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;

b. alergia ao leite de vaca e/ou intolerância alimentar a proteína; e/ou

c. infeções,

em que o hidrato de carbono não digerível é selecionado a partir de uma fonte livre de proteína de leite, e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a pessoa é uma criança na idade entre 0 e 36 meses.

3. Utilização de uma composição que compreende aminoácidos livres como fonte única de aminoácidos, uma fonte de ácidos gordos que compreende ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa, uma fonte de hidratos de carbono que compreende hidratos de carbono digeríveis e não digeríveis, e Bifidobacteria livre de proteína de leite, para o fabrico de uma composição para estimular a maturação do sistema imune numa criança com uma constituição atópica, em que o hidrato de carbono não

digerível é selecionado a partir de uma fonte livre de proteína de leite e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas.

4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que os aminoácidos livres com base na proteína total, compreendem 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. Utilização de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que os aminoácidos compreendem entre 5 - 16 % de energia da composição total, entre 30 - 60 % de energia de gordura, da qual entre 0,1 - 5 % de energia de LCPUFA e entre 25 - 75 % de energia de hidratos de carbono digeríveis.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que LCPUFA compreende entre 0,2 - 1 % de energia da composição total.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que os hidratos de carbono não digeríveis compreendem (i) frutano solúvel com um grau médio de polimerização entre 3 e 200 e (ii) um ácido galacturónico solúvel com um grau médio de polimerização entre 3 e 200.

8. Composição que compreende um componente proteico, um componente de gordura, um componente de hidrato de carbono digerível, um hidrato de carbono não digerível e bifidobactérias livres de proteína de leite em que:

(a) o componente de proteína compreende mais do que 99 % em peso de aminoácidos livres com base na proteína total, 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;

(b) o componente de hidratos de carbono digeríveis contém menos do que 2 % em peso de lactose com base nos hidratos de carbono digeríveis totais;

(c) o hidrato de carbono não digerível compreende frutano solúvel com um DP médio entre 2 e 200, e um ácido galacturónico 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 total de ácido gordo.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que:

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

10. Composição de acordo com a reivindicação 8 ou 9, que compreende frutano não digerível, solúvel, com um DP médio entre 2 e 200, e um ácido galacturónico não digerível, solúvel com um DP médio entre 2 e 200.

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

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 11, que compreende ácido

araquidónico e/ou ácido docosahexanóico.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 12, em que o hidrato de carbono não digerível consiste de FOS de cadeia longa e de FOS de cadeia curta.

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

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 14 em que o produto é um pó ou um líquido.

16. Uma composição que compreende aminoácidos livres como uma fonte única de proteína, uma fonte de ácidos gordos que compreende ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa, uma fonte de hidratos de carbono que compreende hidratos de carbono digeríveis e não digeríveis, e Bifidobacteria livre de proteína do leite, em que o hidrato de carbono não digerível é selecionado a partir de uma fonte livre de proteína de leite, e a composição total é essencialmente livre de proteínas intactas para a utilização no tratamento de uma pessoa que sofre de

(a) cólica, congestão, nariz a pingar, pieira, vómitos, diarreia, fezes com sangue, muco nas fezes, prurido, eczema, refluxo gastroesofágico, esofagite eosinofílica ou asma;

(b) alergia ao leite de vaca e/ou intolerância alimentar a proteína;

(c) e/ou infeções.

Lisboa, 1 de Dezembro de 2014

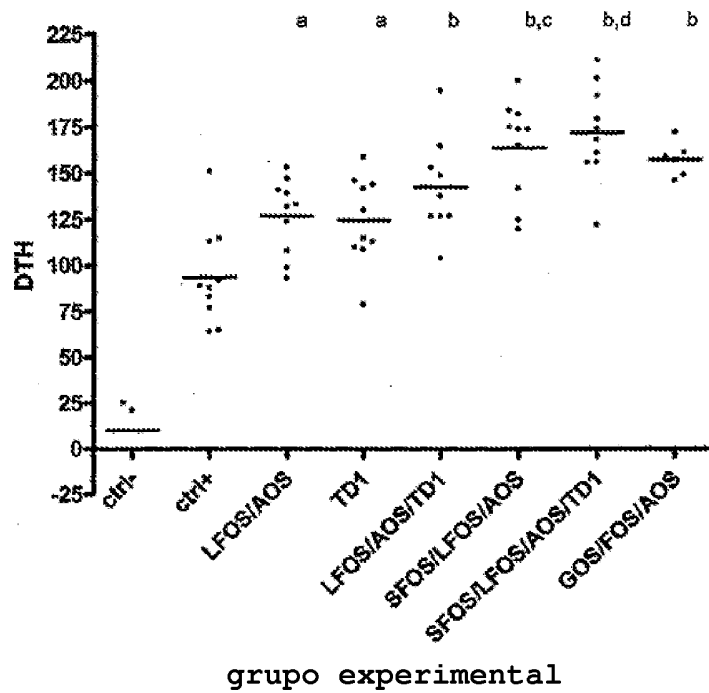


Figura 1 - Modelo de vacina em ratinho

a = $p < 0,05$ em comparação com o ctrl+, b = $p < 0,01$ em comparação com o ctrl+, c = $p < 0,05$ em comparação com LFOS/AOS, d = $p < 0,001$ em comparação com TD1 (= *Bifidobacterium breve*).

Percentagens de inchaço da orelha

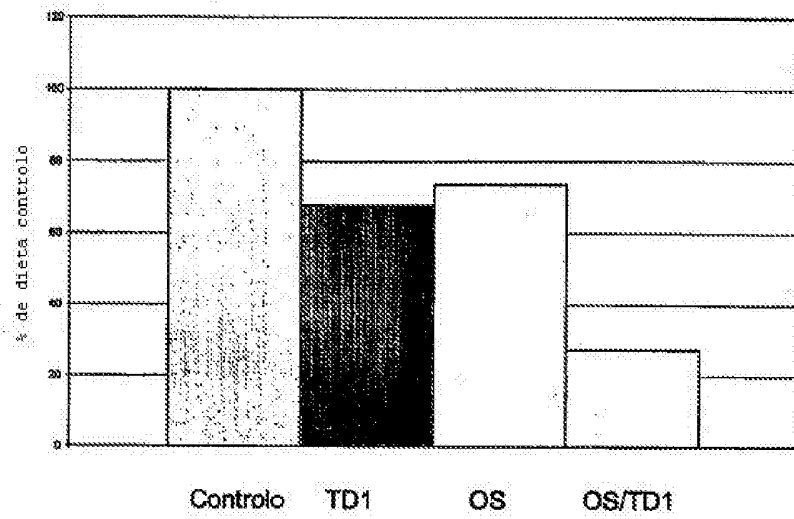


Fig. 2 - Modelo de alergia a caseína em ratinho