



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

**(11) PI 0407176-0 B1**

**(22) Data do Depósito:** 27/01/2004

**(45) Data de Concessão:** 08/05/2018



---

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO UMA OU MAIS CEPAS DE BIFIDOBACTERIUM E SEUS USOS

**(51) Int.Cl.:** A61K 35/745; A23L 33/135; C12N 1/20; C12R 1/01

**(52) CPC:** A61K 35/745, A23L 33/135, C12N 1/20, C12R 1/01, A23Y 2300/45

**(30) Prioridade Unionista:** 14/02/2003 US 60/447,274, 31/01/2003 SE 03 00245-8

**(73) Titular(es):** PROBI AB

**(72) Inventor(es):** GÖRAN MOLIN; SIV AHRNÉ; BENGT JEPSSON

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO UMA OU MAIS CEPAS DE *BIFIDOBACTERIUM* E SEUS USOS**".

Campo da Invenção

5                   A presente invenção refere-se às novas cepas de *Bifidobacterium* possuindo a capacidade de produzir glutamina e opcionalmente arginina *in vivo*.

Antecedentes da Invenção

10                   Glutamina é o aminoácido mais abundante no corpo. Ela é um "transportadora bidirecional de nitrogênio" entre os tecidos e um combustível para os enterócitos, colonócitos, linfócitos e células proliferativas. A função do intestino é prejudicada nos pacientes com deficiência de glutamina, especificamente devido à perda da proteção contra translocação das bactérias e/ou endotoxina do lúmen do intestino para a circulação portal. O esgota-

15                   mento de glutamina ocorre em pacientes gravemente doentes e prejudicados, e pode contribuir para a alta taxa de infecção e esgotamento muscular.

                  A administração enteral de glutamina conferiu efeitos benéficos a saúde em pacientes com diferentes indicações. Nos pacientes de unidade de tratamento intensivo com disfunção múltipla dos órgãos, a administração

20                   de glutamina diminuiu as complicações infecciosas nos pacientes (Houdijk e outros, Lancet, 352: 772-776, 1998). Efeitos semelhantes foram observados em pacientes que sofrem transplante da medula óssea recebendo nutrição parenteral suplementada com glutamina (Ziegler e outros, *Annals Internal Medicine*, 116: 821-828, 1992). Outro exemplo é o de pacientes com sín-

25                   drome de intestino curto, que tinham um aperfeiçoamento substancial de sua capacidade de absorção após suplementação com glutamina (Byrne e outros, *Annals of Surgery*, 222: 243-255, 1995). A suplementação oral com glutamina durante e após a quimioterapia também mostrou reduzir significativamente a duração e a gravidade da estomatite associada à quimioterapia.

30                   Foi concluído que a glutamina oral pareceu ser uma medida simples e útil para aumentar o conforto de muitos pacientes com alto risco de desenvolver úlceras na boca como consequência da quimioterapia intensiva contra o



câncer (Anderson e outros, *Cancer* 1998; 83: 1433-9). A suplementação nutricional de glutamina após exercício intenso também diminuiu a incidência de infecções, especificamente de infecções do trato respiratório superior (Castell, *Amino acids* 2001; 20(1): 49-61). Contudo, o efeito preciso de glutamina na imunodepressão ainda não foi estabelecido.

Uma dificuldade técnica maior com a glutamina é que, durante o processamento e armazenamento da glutamina, ela é facilmente convertida em ácido glutâmico (glutamato), isto é, a glutamina é um composto relativamente instável que é difícil de ser incorporado às fórmulas destinadas à administração oral. Adicionalmente, a glutamina administrada oralmente será, a um alto grau, no ambiente ácido do estômago, convertida em ácido glutâmico e nunca alcançará o intestino e será absorvida como glutamina.

A arginina melhora a função imune e promove a cura de feridas. A administração de arginina tem sido usada em pacientes no pós-operatório e em pacientes com cuidado intensivo. Na maior parte dos estudos clínicos, a arginina foi administrada em conjunto com outras substâncias, tais como, RNA e óleo de peixe. Existem indicações de que a administração de arginina modula a resposta imune pós-operatória. Daly, John E. e outros, *Surgery* 112: 55-67, 1992 mostra que a nutrição enteral com arginina suplementar, RNA e ácidos graxos ômega-3 em pacientes após operação aperfeiçoa a defesa imune através de mecanismos diferentes. A arginina reduz complicações em pacientes sofrendo quimiorradiação e cirurgia (Tepaske e outros, 2001; *Lancet* 358: 696- 701), e reduz o tempo de estadia dos pacientes na unidade de tratamento intensivo (Bauer e outros, 1995, *Critical Case Medicine* 23:436-449).

Uma sobrevivência aumentada poderia ser observada em animais alimentados com uma dieta suplementada com arginina. Contagens de colônia quantitativas e a porcentagem calculada de bactérias viáveis remanescentes mostrou que a capacidade de exterminar os organismos translocados foi significativamente melhorada em animais que receberam arginina (Adawi, D. e outros, 1997, *Hepatology* 25: 642-647).

Cepas de *Bifidobacterium spp.*, isto é, as bifido-bactérias, estão

freqüentemente presentes em números altos no cólon dos seres humanos, especialmente nos bebês que são alimentados no peito. As bactérias da *Bifidobacterium spp.* estão relacionadas aos probióticos, isto é, bactérias vivas que, quando da ingestão, promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Números altos de *Bifidobacterium spp.* no cólon foram reivindicados como possuindo efeitos benéficos à saúde. Contudo, o curso de ação dos efeitos benéficos é amplamente desconhecido.

#### Técnica Anterior

Matteuzzi e outros [Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1978; 129 B,175-181] investigaram um grande número de bifido-bactérias de diferentes habitats quanto a sua capacidade de liberar aminoácidos livres nos caldos de cultura. Os dados obtidos indicaram que várias espécies de bifido-bactérias eram capazes de sintetizar todo o aminoácido necessário para o desenvolvimento e também para liberação dos compostos nos caldos de cultura. Foi verificado que *B. thermophilum*, *B. bifidum* e *B. adolescentis* são os melhores produtores e os aminoácidos mais geralmente encontrados nos caldos de cultura eram principalmente alanina, valina e ácido aspártico. Foi também especulado que *Bifidobacterium spp.* desempenha um papel no metabolismo do aminoácido do trato gastrointestinal.

O WO 01/83700 (Universidade de Maryland) descreve uma composição e processo para tratamento e prevenção de lesão gastrointestinal, enterocolite necrosante neonatal (NEC) e septicemia bacteriana. A composição inclui uma combinação de bactérias Gram (+), especificamente, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e glutamina e seria administrada oralmente ou naso-oralmente. Diz-se que a composição bloqueia a translocação dos agentes bacterianos, tais como, bactérias Gram (-).

A glutamina administrada intravenosamente é muito eficiente, porém cara e complicada. Um modo melhor de administrar a glutamina seria naturalmente, o uso de uma cepa bacteriana possuindo a capacidade de produzir quantidades substanciais de glutamina nos intestinos. Até agora, contudo, nenhuma de tais cepas foi descrita.

#### Sumário da Invenção

Foi verificado, surpreendentemente, que cepas específicas de *Bifidobacterium* são capazes de produzir glutamina em um meio de crescimento mimetizando o ambiente no cólon humano. As ditas cepas podem assim ser usadas para produzir glutamina *in vivo*, após administração oral ou enteral a um mamífero, especialmente um ser humano. Algumas cepas são também capazes de produzir arginina.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é uma representação esquemática do padrão eletroforético obtido com polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) para as cepas CURE 19, CURE 21, CURE 26, CURE 28, e CURE 29 obtidas por clivagem de DNA cromossômico com *EcoRI* e *Hind III*, respectivamente, seguido por hibridização com uma sonda de fragmento de 420 pb marcada com DIG (posição 506 a 926, numeração de *E.coli*) do gene de 16S rRNA de *L.casei* subesp. *pseudoplantarum* DSM 20008 usando hibridização Southern Blot. Marcador de DNA de Peso Molecular Marcado Dig VI (Roche) e marcador de DNA de peso molecular VI (Roche) foram usados como padrão.

A figura 2 mostra uma fotografia de fragmentos de DNA separados obtidos por clivagem de DNA cromossômico das cepas CURE 19 (raia 1), CURE 29 (raia 2) e CURE 28 (raia 3) com a enzima de restrição *EcoRI* (Análise de endonuclease de restrição, REA). Marcador de DNA de peso molecular alto (BRL) marcador de DNA de peso molecular VI (Roche) foram usados como padrão (raia 4).

A figura 3 mostra uma fotografia de fragmentos de DNA separados obtidos por clivagem de DNA cromossômico das cepas CURE 19 (raia 2), CURE 28 (raia 3) e CURE 29 (raia 4) com a enzima de restrição *Hind III*. Marcador de DNA de peso molecular alto (BRL) marcador de DNA de peso molecular VI (Roche) foram usados como padrão (raias 1 e 5).

A figura 4 mostra uma fotografia de fragmentos de DNA separados obtidos por clivagem de DNA cromossômico das cepas CURE 21 (raia 1) e CURE 26 (raia 2) com enzima de restrição *EcoRI*. Marcador de DNA de peso molecular alto (MD, USA) marcador de DNA de peso molecular VI (Ro-

che) foram usados como padrão (raia 3).

A figura 5 mostra uma fotografia de fragmentos de DNA separados obtidos por clivagem de DNA cromossômico das cepas CURE 21 (raia 2) e CURE 26 (raia 3) com a enzima de restrição *Hind III*. Marcador de DNA de peso molecular alto (MD, USA) marcador de DNA de peso molecular VI (Roche) foram usados como padrão (raias 1 e 4).

Figura 6. Índice de atividade de doença nos dias 4, 5, 6 e 7. \* indica  $p < 0,05$  em comparação ao controle de colite,  $\pi$  indica  $p < 0,05$  em comparação a *L. gasseri*, # indica  $p < 0,05$  em comparação a *L. paracasei*.

#### 10 Descrição da Invenção

A invenção refere-se a uma cepa de *Bifidobacterium* possuindo a capacidade de sobreviver no trato intestinal e produzir glutamina *in vivo*. De modo especial, a glutamina é produzida no cólon humano. A sobrevivência neste contexto significa que as cepas bacterianas foram isoladas em diferentes ocasiões de amostragem nas fezes de um indivíduo. Assim, as bactérias obviamente cresceram e sobreviveram em seu hospedeiro por um tempo. As cepas bifido-bacterianas da invenção não podem desenvolver-se em meio nutriente possuindo um pH abaixo de 7, especialmente 5,5-6,5. Ágar Rogosa é um exemplo de tal meio, o outro é MRS.

20 De acordo com um aspecto preferido, as novas cepas também possuem a capacidade de assimilar amônia.

A invenção refere-se especialmente as cepas pertencentes à espécie *Bifidobacterium infantis*.

De acordo com um aspecto específico, a invenção também refere-se a uma cepa de *Bifidobacterium* que possui os genes 16S rRNA localizados nos fragmentos simples de DNA com tamanhos moleculares de cerca de 2.840 kb, obtidos por clivagem de DNA cromossômico com *Hind III*, seguido por separação dos fragmentos por eletroforese de gel agarose, e por hibridização com uma sonda de fragmento de 420 pb marcada DIG (posições 506 a 926, numeração *E.coli*) do gene 16S rRNA de *L.casei* subesp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 usando hibridização Southern blot. Tais cepas são, por exemplo, as cepas depositadas no Deutsche Sammlung von Mikro-

organismen und Zellkulturen GmbH em 23 de agosto de 2002, *Bifidobacterium infantis* CURE 19 (DSM 15158); *Bifidobacterium infantis* CURE 21 (DSM 15159); *Bifidobacterium infantis* CURE 26 (DSM 15160); *Bifidobacterium infantis* CURE 28 (DSM 15161); *Bifidobacterium infantis* CURE 29 (DSM 15162).

De acordo com outro aspecto, a invenção também refere-se a uma cepa de *Bifidobacterium* que possui os genes 16S rRNA localizados nos fragmentos de DNA simples com pesos moleculares de cerca de 895 kb, obtidos por clivagem de DNA cromossômico com *EcoRI*, seguido por separação dos fragmentos por eletroforese de gel agarose e por hibridização com uma sonda de fragmento de 420 pb marcada DIG (posições 506 a 926, numeração *E.coli*) do gene 16S rRNA de *L.casei* subesp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 usando hibridização Southern blot. De acordo com um aspecto preferido, a cepa é capaz de produzir glutamina sem reduzir o ácido glutâmico.

A invenção refere-se, especialmente, as cepas de *Bifidobacterium infantis* CURE 21 e *Bifidobacterium infantis* CURE 26, que foram depositadas no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH em 23 de agosto de 2002 e receberão números de cessão DSM 15159 e DSM 15160, respectivamente ou variações dos mesmos. As ditas cepas são capazes de produzir glutamina sem reduzir o ácido glutâmico.

De acordo com outro aspecto a invenção também refere-se a uma cepa de *Bifidobacterium* que possui os genes 16S rRNA localizados em fragmentos de DNA simples com tamanhos moleculares de cerca de 3.420 kb, obtidos por clivagem de DNA cromossômico com *EcoRI*, seguido por separação dos fragmentos por eletroforese de gel agarose e por hibridização com uma sonda de fragmento de 420 pb marcada DIG (posição 506 a 926, numeração *E.coli*) do gene 16S rRNA de *L.casei* subesp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 usando hibridização Southern Blot. De acordo com um aspecto preferido, a dita cepa possui a capacidade de produzir arginina.

A invenção também refere-se, especialmente, as cepas que se seguem, que também foram depositadas no Deutsche Sammlung von Mi-

JP

kroorganismen und Zellkulturen GmbH em 23 de agosto de 2002 e receberam um número de depósito, isto é *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161 e *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, e as variantes dos mesmos. As ditas cepas  
5 são capazes de produzir além de glutamina, também arginina.

As novas cepas também foram isoladas das fezes de uma criança e selecionadas por cultura em ágar a um pH abaixo de 7. As cepas foram subsequentemente caracterizadas por ribotipagem e REA.

Outro objetivo da invenção é uma composição compreendendo  
10 uma ou mais cepas de *Bifidobacterium* da invenção, em combinação com um veículo. Exemplos de veículos são mingau de farinha de aveia, alimentos fermentados com ácido láctico, inulina, lactulose, frutooligossacarídeos, amido resistente,  $\beta$ -glucanos e goma guar. A fim de aperfeiçoar a proliferação das bifidobactérias e aumentar a produção de glutamina e arginina, respecti-  
15 vamente, além de melhorar a assimilação de amônia no cólon, as fibras de dieta seriam adicionadas à composição. As fibras de dieta são por exemplo, inulina, frutooligossacarídeos, maltodextrinas,  $\beta$ -glucanos e goma guar. A invenção também refere-se a uma composição, conforme descrita, compreendendo além disso fibras de dieta.

20 As composições da invenção, tais como, suspensões, comprimidos, cápsulas, pós, podem ser administradas oralmente. Elas também podem ser administradas como um enema.

A composição da invenção pode ser uma composição alimentícia onde o veículo é um produto alimentício. As cepas de *Bifidobacterium*  
25 que produzem glutamina podem ser administradas a uma criança jovem, pessoas idosas, atletas e consumidores comuns que desejam manter a forma para aperfeiçoar a função muscular e evitar imunodepressão seguido aos exercícios. As cepas de *Bifidobacterium* que produzem arginina podem ser administradas aos consumidores comuns que desejam manter a forma e  
30 evitar influência negativa na função imune.

A composição da invenção pode ser uma composição farmacêutica, onde o veículo é um veículo terapeuticamente aceitável. As cepas que

H

produzem glutamina, bem como as cepas que produzem arginina podem, além disso, ser usadas nas fórmulas para alimentação enteral.

5 As cepas de *Bifidobacterium* assimilando amônia da invenção podem ser administradas aos pacientes com falência renal temporária, tal com visto em pacientes com cuidado intensivo após cirurgia e complicações ou após outras doenças, tais como, infecções graves, intoxicações. Em tais casos, a função renal pode retornar e um tratamento direcionado para reduzir a carga de nitrogênio do intestino pode evitar a necessidade de diálise. As cepas de assimilação de amônia podem ser administradas aos pacientes 10 com falência hepática e encefalopatia, por exemplo, na hepatite ou intoxicação ou após abuso de álcool. Uma absorção reduzida de substâncias nitrogenosas do intestino nessas situações, melhorará a encefalopatia e função hepática. As cepas de *Bifidobacterium* assimilando amônia podem ser administradas a uma criança jovem, pessoas idosas ou consumidores com doenças 15 subjacentes que dificultam sua capacidade hepática para a conversão de amônia em uréia ou possuindo absorção aumentada de nitrogênio do intestino, por exemplo, pacientes com falência renal crônica ou hepática de grau pequeno a moderado, que ainda não precisam de transplante ou diálise.

20 De acordo com um aspecto especial, a composição da invenção também compreende uma ou mais cepas *Lactobacillus*.

Além dos efeitos benéficos à saúde opcionais dos lactobacilos propriamente, as ditas bactérias podem proteger as bifidobactérias da influência prejudicial do oxigênio.

25 De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a uma ou mais cepas pertencendo à espécie *Bifidobacterium infantis* para uso em terapia.

A invenção refere-se ao uso de uma ou mais das cepas de *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159; *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160; *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161; *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162; ou uma variante das mesmas, para preparação de um medicamento 30

para tratamento em pacientes em cuidado intensivo com disfunção múltipla dos órgãos e falência intestinal, para profilaxia em pacientes de quimioterapia e pacientes com doenças inflamatórias e administração pós-operatória após uma cirurgia maior.

## 5 Experimentação

Todas as cepas foram isoladas das fezes de crianças jovens, envelhecidas por uma semana a um ano. As amostras de fezes foram diluídas em série em uma solução de diluição (0,9% [peso/volume] NaCl, 0,1% [peso/volume] peptona, 0,1% [peso/volume] Tween 80, 0,02% [peso/volume] cisteína-HCl) e dispersas em placas com ágar Rogosa. Os isolados foram selecionados com relação a sua capacidade de crescimento em ágar Rogosa, pH 5,4, e isolamento repetido de um indivíduo. Os isolados foram coletados de placas ágar Rogosa após incubação a 37°C por 72 horas. Eles foram identificados ao nível do gênero por PCR específica para gênero (Roy e outros, 2000; FEMS Microbiological Letters 191: 17-24) e ao nível de espécies por sequenciamento de 16S rDNA (Pettersson e outros, 2002; Systematic and Applied Microbiology 23: 332-336). As cepas seriam isoladas pelo menos duas vezes do mesmo indivíduo com uma a quatro semanas entre as amostragens, o que indica fortemente que as cepas tinham uma determinada capacidade de colonizar o trato gastrointestinal. As cepas foram identificadas por ribotipagem, isto é, polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição, (RFLP) do gene 16S rRNA e por REA, que é a Análise de Endonuclease de Restrição.

As cepas que se seguem foram isoladas:

25 1) *Bifidobacterium infantis* CURE 19; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia ao mesmo grau, cheiro "ácido" após fermentação.

2) *Bifidobacterium* CURE 20; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia ao mesmo grau, cheiro "ácido" após fermentação.

30 3) *Bifidobacterium infantis* CURE 21; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia ao mesmo grau,

cheiro "ácido" após fermentação.

4) *Bifidobacterium* CURE 22; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia ao mesmo grau, cheiro "agradável" após fermentação.

5) *Bifidobacterium* CURE 23; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia ao mesmo grau, cheiro "agradável" após fermentação.

6) *Bifidobacterium infantis* CURE 24; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia ao mesmo grau, cheiro "agradável" após fermentação.

7) *Bifidobacterium* CURE 25; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia.

8) *Bifidobacterium infantis* CURE 26; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia.

9) *Bifidobacterium dentium* CURE 27; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia.

10) *Bifidobacterium infantis* CURE 28; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia.

11) *Bifidobacterium infantis* CURE 29; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia.

12) *Bifidobacterium infantis* CURE 30; capaz de desenvolver-se em ágar Rogosa e de fermentar mingau de farinha de aveia.

#### Produção de Glutamina

As cepas isoladas 1-12 foram testadas quanto à produção de glutamina em caldo pelo procedimento que se segue.

As cepas de teste foram cultivadas a 37°C por 4 dias em meio de desenvolvimento (caldo) modificado do meio descrito por Matteuzzi e outros (Ann. Microbil. (Inst. Pasteur, 1978,129B : 175-181). O caldo era composto de: acetato de sódio, 10 g/L; ácido ascórbico, 10 g/L; sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 5 g/L; hidrogeno fosfato de dipotássio hidrogênio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 3 g/L; dihidrogeno fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 3 g/L; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,32 g/L; FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,01 g/L; MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0,007 g/L; NaCl, 0,01 g/L ; extrato

de levedura, 0,5 g/L; glicose, 20 g/L; Tween 80, 1 mL/L. O pH foi ajustado com 1 M NaOH para 6,18-6,24 antes da etapa na autoclave.

A concentração de glutamina no caldo foi medida antes da inoculação com bactérias e após o desenvolvimento da cepa de teste. Após o desenvolvimento, a cultura foi centrifugada e filtrada em esterilização e o sobrenadante isento de célula subsequente congelou a -80°C. Os aminoácidos foram analisados em um analisador automático (Biochrom 20, Pharmacia Biotech) após adição do ácido sulfossalicílico e ajuste de pH com hidróxido de lítio.

O aumento na concentração de glutamina e ácido glutâmico no caldo, após o desenvolvimento de cepas de teste diferentes é mostrado na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Concentração aumentada de glutamina e redução/produção de ácido glutâmico no caldo de cultura, após desenvolvimento das cepas de *Bifidobacterium* testadas.

| Cepa de teste                  | Glutamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) | Ácido glutâmico [redução (R), produção (P) em $\mu\text{mol/L}$ ] |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>B. infantis</i> CURE 19     | 53 (29-67) <sup>#</sup>         | R                                                                 |
| <i>Bifidobacterium</i> CURE 20 | 4,2 (3,5-4,8) <sup>§</sup>      | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 21     | 37 (36 – 38) <sup>#</sup>       | P 37 (31-41)                                                      |
| <i>Bifidobacterium</i> CURE 22 | 16 (14-18) <sup>§</sup>         | R                                                                 |
| <i>Bifidobacterium</i> CURE 23 | 8,9 (8,1-9,6) <sup>§</sup>      | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 24     | 3,0 (0 – 5,9) <sup>§</sup>      | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 25     | 35                              | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 26     | 36                              | P60                                                               |
| <i>B. dentium</i> CURE 27      | 7,4                             | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 28     | 35                              | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 29     | 28                              | R                                                                 |
| <i>B. infantis</i> CURE 30     | 37                              | R                                                                 |

<sup>#</sup> O valor médio de três amostras derivadas de três culturas separadas.

§ O valor médio de duas amostras derivadas de duas culturas separadas.

Todas as cepas de teste produziram alguma glutamina, porém apenas sete das 12 cepas testadas tinham uma produção relativamente alta de glutamina ( $>20 \mu\text{mol/L}$ ). Para todas, exceto duas cepas (CURE 21 e CURE 26) o aumento na glutamina ocorreu juntamente com uma redução forte do ácido glutâmico no meio. O meio ao qual nenhuma bactéria foi adicionada tinha uma concentração de partida média de ácido glutâmico de  $223 \mu\text{mol/L}$ , enquanto o teor de glutamina era zero. As três cepas CURE 20, CURE 23 e CURE 24 consumiram todo o ácido glutâmico disponível no meio, enquanto CURE 28 diminuiu a concentração de ácido glutâmico com  $247 \mu\text{mol/L}$ , CURE 29 com  $220 \mu\text{mol/L}$ , CURE 22 com  $187 \mu\text{mol/L}$ , CURE 19 com  $128 \mu\text{mol/L}$ , CURE 30 com  $160 \mu\text{mol/L}$ , CURE 27 com  $151 \mu\text{mol/L}$  e CURE 25 com  $47 \mu\text{mol/L}$ . Pode ser especulado que essas bactérias convertem ácido glutâmico em glutamina. Duas cepas, CURE 21 e CURE 26, produziram glutamina sem qualquer redução da concentração de ácido glutâmico no meio. Em contraste com outras cepas, elas aumentaram o nível de ácido glutâmico no caldo.

#### Produção de Arginina

A produção de aminoácido de cada cepa foi medida após desenvolvimento da cepa de teste a  $37^\circ\text{C}$  por 4 dias em meio de desenvolvimento (caldo) modificado do meio descrito por Matteuzzi e outros (1978). O caldo era composto de: acetato de sódio,  $10 \text{ g/L}$ ; ácido ascórbico,  $10 \text{ g/L}$ ; sulfato de amônio  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ,  $5 \text{ g/L}$ ; hidrogeno fosfato de dipotássio  $(\text{K}_2\text{HPO}_4)$ ,  $3 \text{ g/L}$ ; dihidrogênio fosfato de potássio  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ ,  $3 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,32 \text{ g/L}$ ;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,01 \text{ g/L}$ ;  $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,007 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl}$ ,  $0,01 \text{ g/L}$ ; extrato de levedura,  $0,5 \text{ g/L}$ ; glicose,  $20 \text{ g/L}$ ; Tween 80,  $1 \text{ mL/L}$ . O pH foi ajustado com  $1 \text{ M NaOH}$  para  $6,18-6,24$  antes da etapa na autoclave.

A concentração de aminoácido no caldo foi medida antes da inoculação com bactérias e após o desenvolvimento da cepa de teste. Após o desenvolvimento, a cultura foi centrifugada e filtrada em esterilização e o sobrenadante isento de célula subsequente congelou a  $-80^\circ\text{C}$ . Os a-

minoácidos foram analisados em um analisador automático (Biochrom 20, Pharmacia Biotech) após adição do ácido sulfossalicílico e ajuste de pH com hidróxido de lítio.

O aumento na concentração de arginina e citrulina no caldo, após o desenvolvimento de cepas de teste diferentes é mostrado na Tabela 2. Tabela 2. Concentração aumentada de arginina e citrulina no caldo após desenvolvimento das cepas de teste.

| Cepa de teste                  | Arginina ( $\mu\text{mol/L}$ ) | Citrulina ( $\mu\text{mol/L}$ ) |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>B. infantis</i> CURE 19     | 11 (8,8-14) <sup>#</sup>       | 52 (9,2-136) <sup>#</sup>       |
| <i>Bifidobacterium</i> CURE 20 | 0 <sup>§</sup>                 | 4,1 (4,4-3,7) <sup>§</sup>      |
| <i>B. infantis</i> CURE 21     | 0 <sup>#</sup>                 | 0 <sup>#</sup>                  |
| <i>Bifidobacterium</i> CURE 22 | 0 <sup>§</sup>                 | 6,3 (5,8-6,7) <sup>§</sup>      |
| <i>Bifidobacterium</i> CURE 23 | 2,0 (0-3,9) <sup>§</sup>       | 6,1 (5,4-6,8)                   |
| <i>B. infantis</i> CURE 24     | 0 <sup>§</sup>                 | 0 <sup>§</sup>                  |
| <i>B. infantis</i> CURE 25     | 0                              | 4,2                             |
| <i>B. infantis</i> CURE 26     | 2,6                            | 0                               |
| <i>B. dentium</i> CURE 27      | 4,9                            | 0,0                             |
| <i>B. infantis</i> CURE 28     | 37                             | 202                             |
| <i>B. infantis</i> CURE 29     | 26                             | 13                              |
| <i>B. infantis</i> CURE 30     | 2,0                            | 5,7                             |

<sup>#</sup> O valor médio de três amostras derivadas de três culturas separadas.

<sup>§</sup> O valor médio de duas amostras derivadas de duas culturas separadas.

Três das doze cepas de teste aumentaram a concentração de arginina em mais de 10  $\mu\text{mol/L}$ , isto é, CURE 19, CURE 28 e CURE 29. Duas das cepas também tinham uma produção admiravelmente forte de citrulina (> 100  $\mu\text{mol/L}$ ) isto é, CURE 19 e CURE 28. A citrulina é produzida tanto por dessaminação de arginina ou através de NO sintase e geração de NO. A produção de citrulina também reflete a produção de arginina em uma etapa anterior.

Também outros aminoácidos penetraram no caldo durante o desenvolvimento das cepas de teste, vide Tabela 3. CURE 21 não produziu qualquer citrulina ou arginina, porém quantidades significativas de asparagina ácida e tirosina. CURE 26 não produziu nenhuma citrulina porém quantidades muito pequenas de arginina e um amplo espectro de aminoácidos diferentes. Adicionalmente, CURE 26 foi a única cepa de teste que aumentou a concentração de prolina no caldo. Todas as cepas de teste produziram treonina.

10 Tabela 3. Aumento nas concentrações de aminoácido ( $\mu\text{mol/L}$ ), além da glutamina, ácido glutâmico, arginina e citrulina no caldo após desenvolvimento das cepas de teste.

| Cepa    | Thr | Tyr | Cys | Asp | Ala | Gly | Ile |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CURE 19 | 39  | 15  | 0   | 23  | 15  | 0   | 0   |
| CURE 21 | 51  | 21  | 0   | 96  | 0   | 0   | 0   |
| CURE 26 | 46  | 46  | 12  | 151 | 61  | 0   | 6   |
| CURE 28 | 44  | 12  | 14  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| CURE 29 | 35  | 28  | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   |

Thr-treonina; Tyr-tirosina; Cys-cisteína; Asp-ácido asparagina; Ala-alanina; Gly-glicina; Ile-isoleucina.

Os valores representam valores médios de três ou duas amostras derivadas de três ou duas culturas separadas.

#### *Identificação do Genótipo*

#### REA

As cepas foram examinadas em relação ao padrão de clivagem do DNA cromossômico, através do processo de análise de endonuclease de restrição - REA de acordo com Ståhl M, Molin G, Persson A, Ahné S & Ståhl S, International Journal of Systematic Bacteriology, 40: 189-193, 1990 e adicionalmente desenvolvido por Johansson, M-L e outros, International Journal of Systematic Bacteriology 45: 670-675, 1995. REA esquematicamente pode ser descrito como se segue: DNA cromossômico das cepas envolvidas no estudo foi preparado e clivado por endonucleases de restrição. 0,75  $\mu\text{g}$  de cada DNA foi separadamente digerido a 37°C por 4 horas com 10 unidades

AS

de *EcoRI* e *Hind III*; cada endonuclease foi usada separadamente. Os fragmentos de DNA clivados são separados de acordo com o tamanho por eletroforese do gel usando géis de lâmina de agarose horizontal submergidos. Os géis consistiram em 150 mL de agarose a 0,9% (classificação de DNA ultrapura; osmose eletro-endo baixa; BioRad Laboratories, Richmond, USA) e foram fundidos como géis de lâmina (150 por 235 mm). 0,2 µg do marcador de DNA de Peso Molecular Alto (Bethesda Research Laboratories, MD, USA) em conjunto com 0,5 µg do marcador de peso molecular de DNA VI (Roche, Alemanha) foram usados como padrão. Distorção de faixa mínima e intensidade máxima foram obtidas por aplicação do DNA da amostra no tampão de carga Ficoll (2 g de Ficoll, 8 mL de água, 0,25% de bromofenol).

Os géis foram operados a uma tensão constante de 40V por 18 horas a cerca de 6-8°C. O tampão (89 mM Tris, 23 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA sódico, pH 8,3) foi recirculado durante o período de operação. Após isso, os géis foram manchados por 20 minutos em brometo de etídio (2 µg/mL) e retirada a mancha em água destilada, visualizados a 302 nm com transiluminador de UV (UVP Inc., San Gabriel, USA) e fotografados. Esse modo de operação da eletroforese de gel forneceu faixa bem-distribuída e relativamente bem separada para um peso molecular de  $1,2 \times 10^6$ .

#### 20 RFLP do gene 16S rRNA (ribotipagem)

Preparação de Análise de Endonuclease de Restrição e cromossômica do DNA cromossômico foi realizada conforme descrito anteriormente (Ståhl e outros, 1990, Ståhl e outros, 1994).

A sonda era um fragmento de 420 pb (posição 506 a 926, numeração *E.coli*) do gene 16S rRNA de *L.casei ssp. pseudopantarum* DSM 20008, obtido por PCR e marcado por técnica de marcação de DNA DIG de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Boehringer Mannheim, Bromma, Suécia). A quantidade de sonda usada nas reações era de 50 ng.

Hibridização Southern blot. Um µg do DNA cromossômico foi digerido com 10U de *EcoRI* e *HindIII* (Boehringer Mannheim) por 4 horas a 37°C. Separação dos fragmentos de restrição por eletroforese de gel agarose foi realizada de acordo com Ståhl e outros, 1994. Marcador de DNA de

peso molecular marcado com DIG III e marcador de DNA de peso molecular VI foram usados como padrão (Roche, Alemanha). O DNA foi imobilizado sobre uma membrana de náilon positivamente carregada (Roche) por cozedura por 30 minutos a 120°C. Pré-hibridização, hibridização e detecção de quimioluminescência com o substrato CSPD® (Roche) foram realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A temperatura de hibridização era de 68°C. O teste resultou em uma faixa simples com um peso molecular de cerca de 2.840 kb em todas as cepas (CURE 19, 21, 26, 28 e 29) quando DNA cromossômico foi clivado por Hind III. Quando DNA cromossômico foi clivado por *EcoRI*, os genes para 16S rRNA terminaram em um fragmento simples com o peso molecular de cerca de 895 kb nas cepas CURE 21 e 26, enquanto outra faixa simples com um peso molecular de cerca de 3.420 kb foi obtida para cepas CURE 19, 28 e 29.

#### Teste *in vivo*

#### 15 Teste 1. Efeitos das cepas *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na colite induzida por DDS em ratos

O objetivo desse estudo foi o de comparar os efeitos das cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em colite induzida por DDS (Sulfato sódico de dextrana) nos ratos.

20 Ratos Sprague Dawley foram divididos em seis grupos, um grupo de controle (colite sem administração de bactérias) e cinco grupos aos quais cepas bacterianas diferentes (*Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus gasseri* LG1, *Bifidobacterium* 3B1 e *Bifidobacterium infantis* CURE 19, respectivamente) foram administradas. As cepas bacterianas foram administradas oralmente por 7 dias antes da indução da colite (dia 0) e foram continuamente administradas por 7 dias em combinação com DDS (5% peso/volume dissolvido em água). O grau de colite foi determinado diariamente com DAI (Disease Activity Index). A amostragem foi realizada no dia 14 e translocação bacteriana e quantidade no intestino foram determinadas.

30 Nos grupos que receberam *Lactobacillus plantarum* 299v, *Bifidobacterium* 3B1 e *Bifidobacterium* CURE 19, DAI diminuiu significativamen-

20

te nos dias 4, 5, 6 e 7 em comparação ao grupo de controle. Além disso, DAI  
abaixou significativamente no grupo que recebeu *B. infantis* CURE 19 em  
comparação aos grupos que receberam *Lactobacillus paracasei* 8700:2 e  
*Lactobacillus gasseri* LG1 após 6 e 7 dias. Em comparação a colite de con-  
5 trole, a translocação bacteriana para nodos linfáticos mesentéricos diminuiu  
significativamente em todos os grupos, bem como a translocação das Ente-  
robactérias para o fígado.

Concluindo, as cepas bacterianas administradas ao *Lactobacil-  
lus plantarum* 229v, *Lactobacillus paracasei* 8700: 2, *Lactobacillus gasseri*  
10 LG1, *Bifidobacterium* 3B1 e *Bifidobacterium infantis* CURE 19 são capazes  
de exercer efeitos positivos diminuindo a translocação em colite experimen-  
tal em ratos. *Lactobacillus plantarum* 229v, *Bifidobacterium* 3B1 e *Bifidobac-  
terium infantis* CURE 19 mostraram os efeitos mais evidentes no DAI aper-  
feiçoado na colite de ratos induzida por DDS. *Bifidobacterium infantis* CURE  
15 19 foi algo mais eficaz em neutralizar a colite que os outros após 6 dias e 7  
dias de tratamento. Vide figura 6.

#### Teste 2 - Sobrevivência do *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium* no trato gas- trointestinal após administração oral

A administração do *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium* provê e-  
20 feitos positivos diferentes, por exemplo, prevenindo a diarreia associada ao  
antibiótico (D'Souza e outros, 2002, BMJ 324: 1361)

Os efeitos positivos podem ser obtidos, contanto que as bacté-  
rias sobrevivam à administração oral e tenham a capacidade de sobreviver e  
desenvolver nos intestinos. Para obter cepas apropriadas que possam ser  
25 usadas como probióticos, várias cepas candidatas possíveis são administra-  
das oralmente aos indivíduos saudáveis. A determinação da frequência das  
cepas administradas nas fezes identifica cepas com capacidade de sobrevi-  
vência maior. O objetivo desse estudo é encontrar cepas bacterianas que  
possam ser administradas oralmente com uma capacidade superior de so-  
30 brevivência e desenvolver no trato gastrointestinal humano.

#### Projeto do Estudo

Durante quatro semanas, quatorze voluntários recebem uma

mistura para beber de aproximadamente 20 cepas diferentes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Todas as cepas são representativas das cepas que ocorrem nos seres humanos ou no alimento que produz ácido láctico. As amostras fecais foram obtidas antes da administração, após 3 semanas de administração e uma semana após a administração. A flora bacteriana é determinada por contagem viável e RAPD (DNA Polimórfico Ampliado Aleatoriamente; Johanson e outros, 1995).

#### Conclusão

Os resultados mostraram que as cepas selecionadas, isto é, *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium* CURE 21, DSM 15159; *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160; *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161; e *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, podem sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal após administração oral. Estudos em ratos também mostram um potencial de exercício dos efeitos positivos na colite experimental.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais cepas de *Bifidobacterium* selecionadas a partir de *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159, *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161, e *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, apresentando a capacidade de sobreviver no trato intestinal e produzir glutamina *in vivo*, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável ou um alimento.
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a uma ou mais cepas de *Bifidobacterium* apresentam a capacidade de produzir arginina e são selecionadas a partir de *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161; e *Bifidobacterium infantis* CURE 29.
3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a uma ou mais cepas de *Bifidobacterium* apresentam a capacidade de assimilar amônia.
4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o veículo é mingau de farinha de aveia.
5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que também compreende fibras dietéticas.
6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que é uma composição alimentícia.
7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que é uma composição farmacêutica, em que o veículo é um veículo farmaceuticamente aceitável.
8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que também compreende uma ou mais cepas de *Lactobacillus*.
9. Uso de uma ou mais das cepas de *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159, *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, *Bifidobacterium infantis* CURE

28, DSM 15161, *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, apresentando a capacidade de sobreviver no trato intestinal e produzir glutamina *in vivo*, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de um medicamento ou alimento.

- 5                    10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o medicamento é selecionado a partir de um ou mais de: um medicamento para tratamento de pacientes em cuidado intensivo com disfunção múltipla dos órgãos; um medicamento para tratamento de pacientes em cuidado intensivo com falência intestinal; um medicamento para profilaxia em pacientes em quimioterapia; um medicamento para profilaxia de doenças inflamatórias; um medicamento para administração pós-operatória
- 10                    após uma grande cirurgia.

5/2

1/6

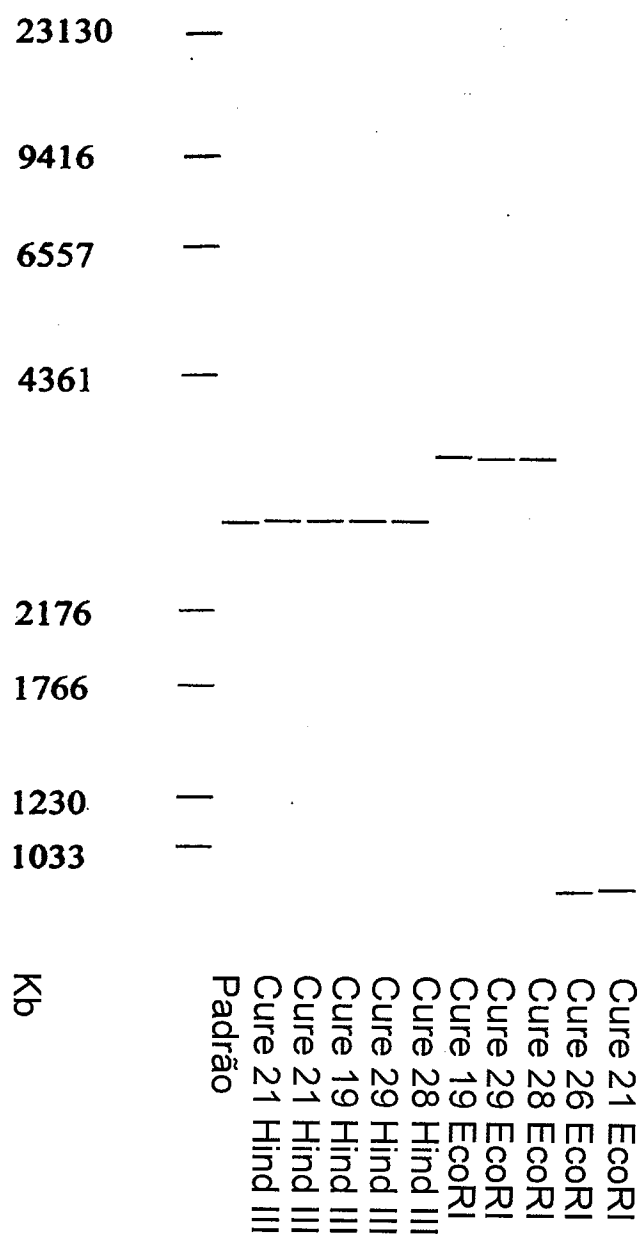


FIG 1

53

2/6

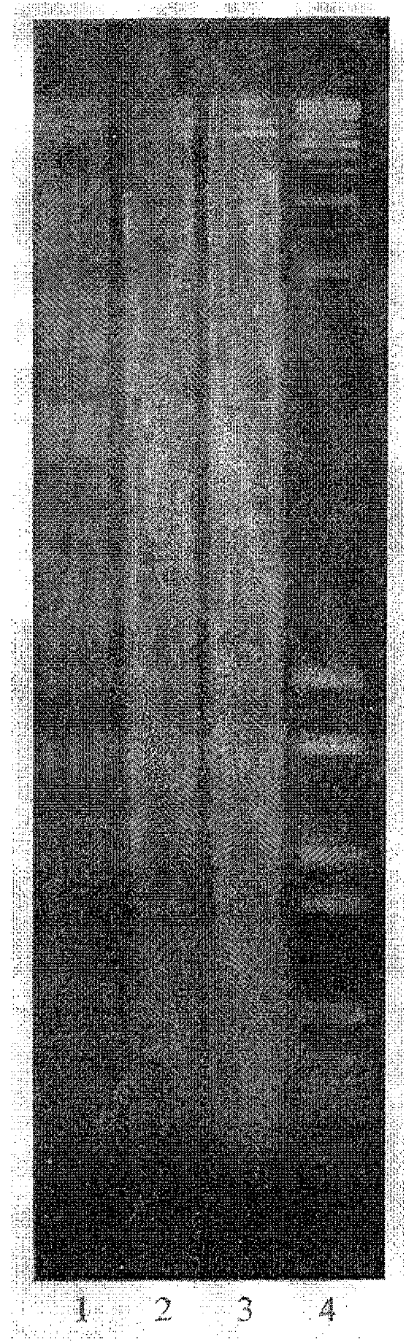
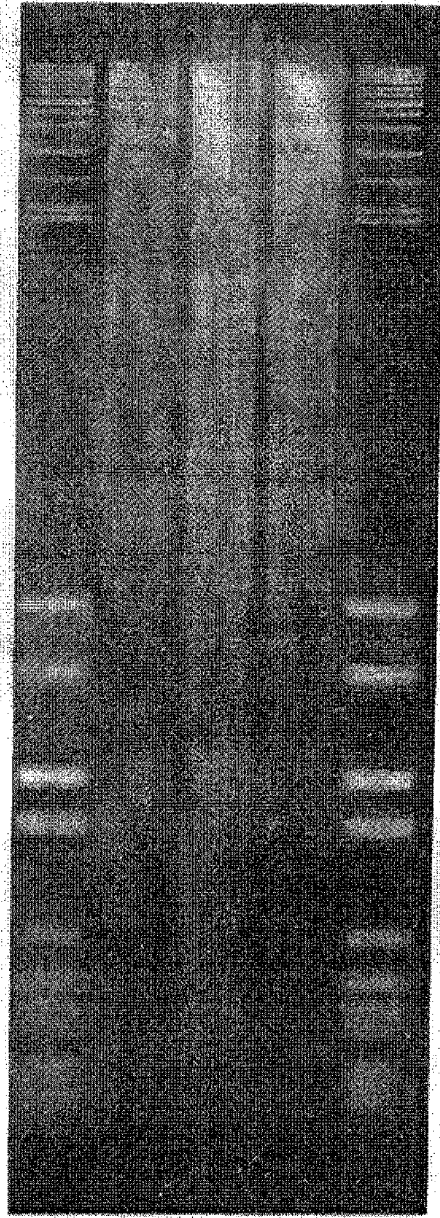


FIG 2

58

3/6



1 2 3 4 5

FIG 3

55/

4/6

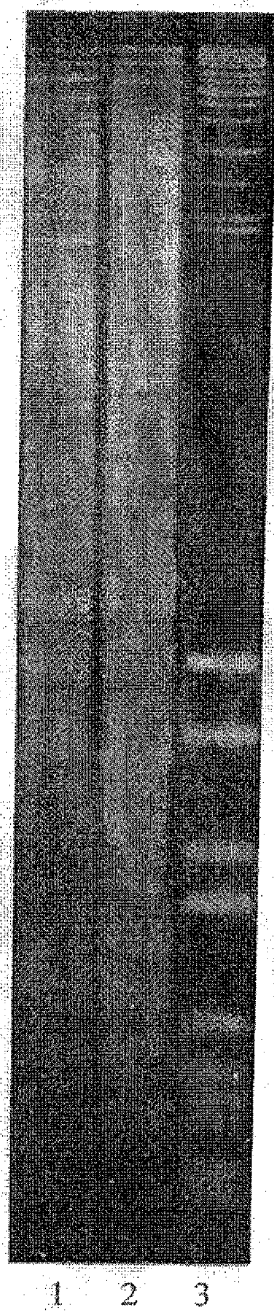


FIG 4

46

5/6

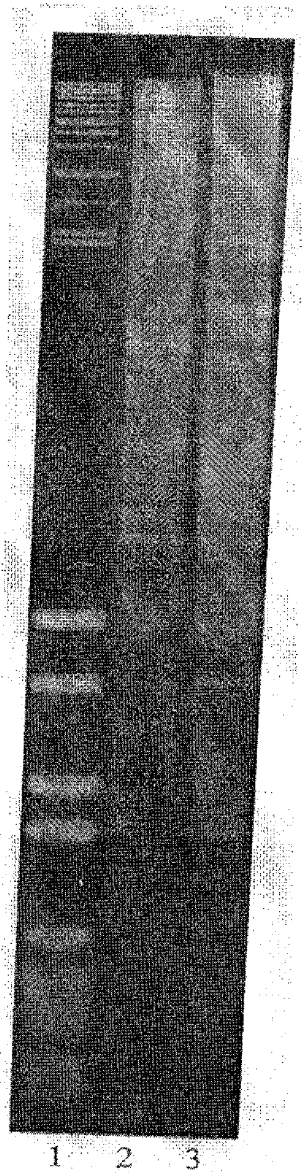


FIG 5

52

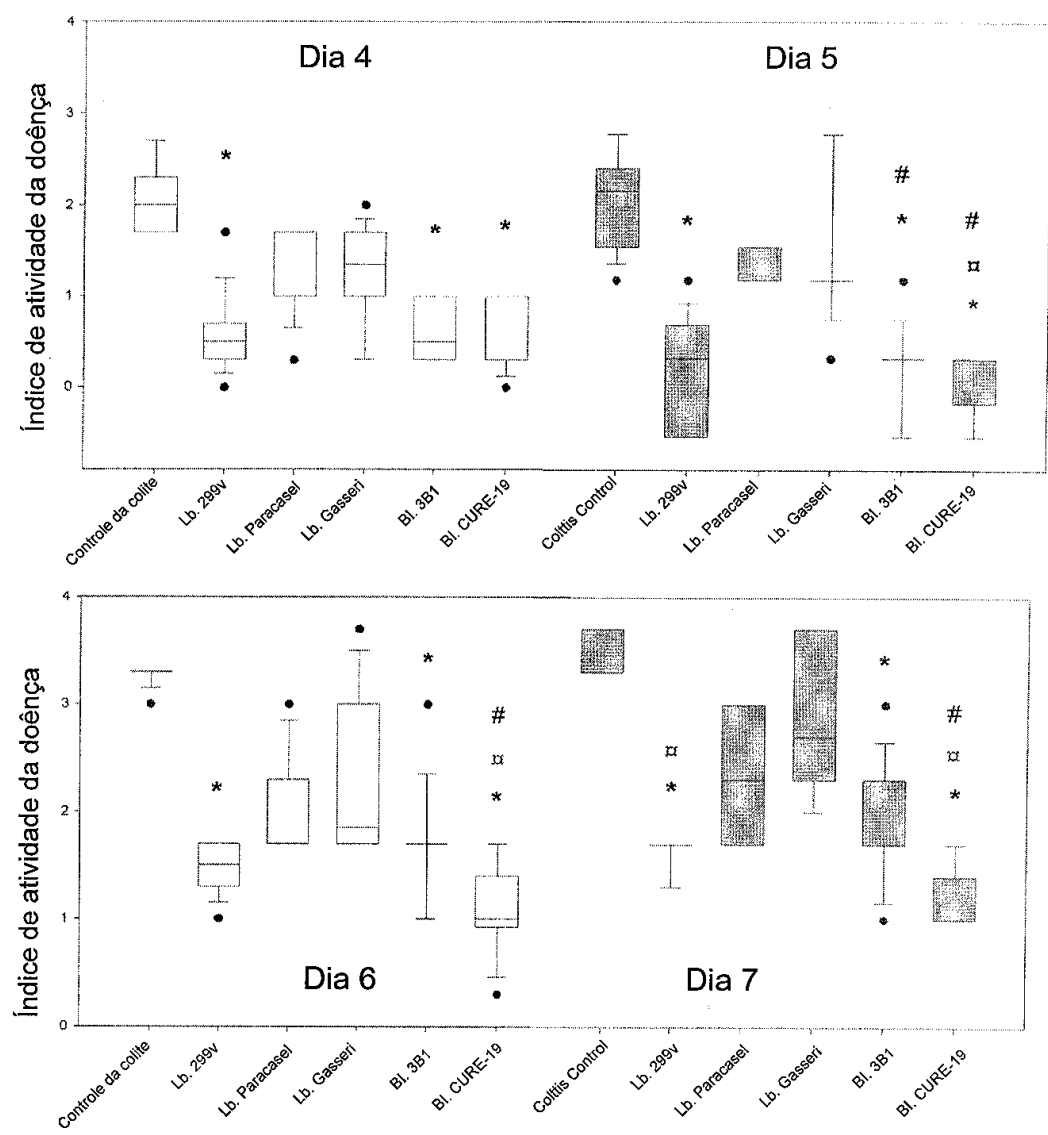


FIG 6