

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

(21) PI 0622147-5 A2



(22) Data de Depósito: 17/11/2006
(43) Data da Publicação: 01/07/2014
(RPI 2269)

(51) Int.Cl.:
C12N 1/20
A61K 35/74
C12R 1/225

(54) Título: LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1,
DSM17851 E SEU USO PARA TRATAMENTO E/OU A
PREVENÇÃO DE CANDIDÍASE E INFECÇÕES DO
TRATO URINÁRIO

(57) Resumo:

(73) Titular(es): SCA HYGIENE PRODUCTS AB

(72) Inventor(es): Daniel Rönqvist, Eva Grahns Hakansson, Ulla
Forsgren Brusk, Ulrika Husmark

(74) Procurador(es): Magnus Aspeby e Claudio Szabas

(86) Pedido Internacional: PCT SE2006001311 de
17/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2008/060198 de
22/05/2008

**"*Lactobacillus fermentum* ESS-1, DSM17851 E SEU USO PARA O
TRATAMENTO E/OU A PREVENÇÃO DE CANDIDÍASE E INFECÇÕES DO
TRATO URINÁRIO"**

5 **Campo técnico**

A presente invenção se refere ao campo de bactérias
probióticas que têm um efeito benéfico em infecções pelo
fungo do gênero *Cândida*, isto é, candidíase, e infecções
bacterianas. A invenção também se refere a composições
10 farmacêuticas e produtos para o cuidado pessoal que
compreendem tais bactérias, e ao uso médico de tais
bactérias.

Técnica anterior

15 A flora usual na região urogenital é constituída por
um ecossistema complexo que compreende mais de 50 espécies
de bactérias diferentes (Hill et al., Scand. J. Urol.
Nephrol. 1984 (86 (supl.)):23-29). A flora normal é
dominada por bactérias que pertencem ao gênero
20 *Lactobacillus* (LB) que são bastonetes Gram positivos
adaptados ao ambiente na vagina de mulheres férteis. Estas
bactérias também contribuem à manutenção do ambiente
específico e do equilíbrio ecológico na vagina. O pH
circundante na vagina é inferior a 4,5. Leveduras e
25 enterobactérias são escassas ou ausentes (Redondo-Lopez et
al, Rev. Inf. Dis. 1987(12):856-872).

Algumas cepas de LB inibem o crescimento de bactérias
potencialmente patogênicas por meio de diversos mecanismos.
O metabolismo de LB resulta na formação de ácidos
30 orgânicos, em particular ácido lático e ácido acético, que
contribuem ao baixo pH do fluido vaginal, que é

desfavorável para muitas outras espécies microbianas. LB também pode produzir substâncias solúveis que inibem diretamente o crescimento de bactérias e leveduras potencialmente patogênicas. Também podem produzir peróxidos de hidrogênio, que é tóxico a bactérias e fungos. Estas

5 características inibidoras podem variar consideravelmente entre diferentes cepas de LB (Hooton et al., JAMA 1990(265):64-69).

De maneira similar à área urogenital, a pele é

10 colonizada por uma série de organismos, que forma sua flora normal. Os números e a identidade dos organismos variam entre os diferentes locais da pele, com áreas de pele lipídica e úmida abrigando mais microorganismos por área de pele. Isto, junto com a barreira estrutural da pele,

15 proporciona ao hospedeiro uma excelente defesa contra micróbios invasores. O número de bactérias na pele varia desde algumas centenas por cm^2 nas superfícies áridas do antebraço e costas, até dezenas de milhares por cm^2 nas áreas úmidas tais como a axila e virilha. Esta flora normal

20 possui um papel importante para prevenir que organismos 'estranhos' colonizem a pele, mas precisa permanecer sob vigilância de modo a evitar infecções de pele.

O trato gastrointestinal (GI), desde a boca até o ânus, abriga uma rica flora de mais de 500 espécies

25 bacterianas diferentes, algumas das quais têm importantes funções na saúde. A flora GI consiste em aproximadamente 10^{14} bactérias e um número menor de leveduras comensais. Devido a uma mudança geral no estado de saúde, espécies de *Candida* podem crescer demais e causar infecções

30 superficiais. Além disso, o crescimento em demasia de espécies de *Candida* em pacientes imunocomprometidos pode

levar a uma infecção sistêmica o que é uma condição muito grave.

O enfraquecimento de ou o desequilíbrio no sistema de defesas naturais pode permitir que microorganismos
5 potencialmente patogênicos causem infecção clínica, por exemplo, em conexão com medicação, cuidado pessoal escasso, ou mudanças na microflora ou membranas mucosas. Mudanças na microflora também podem ser encontradas em conexão com diferentes condições patogênicas.

10 Organismos de levedura estão sempre presentes em seres humanos, mas são usualmente impedidos de crescer demais pela flora microbiana local. A candidíase é uma infecção causada por organismos de levedura *Candida* que afeta uma ampla variedade de sistemas orgânicos. Mais comumente, a
15 infecção é causada por *Candida albicans*, e *C. glabrata*. Menos comumente, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* causam a infecção e raramente, outras espécies de *Candida* são o agente causal. A candidíase é freqüentemente desencadeada por câmbios hormonais, tais como durante a
20 gravidez, a menstruação e o uso de pílulas anticoncepcionais. Outra causa comum são desequilíbrios no pH da vagina, diabetes mellitus, e medicamentos antibióticos, que perturbam o delicado equilíbrio microbiológico do corpo. A defesa natural do hospedeiro
25 contra infecções de *Candida* incluem barreiras mecânicas, substâncias antimicrobianas não específicas (polipeptídeos, proteases básicas), fagocitose, e resposta imune específica (linfócitos T e B, hipersensibilidade do tipo tardia).

Em pessoas imunocompetentes qualquer parte quente e
30 úmida do corpo exposta ao ambiente é susceptível a infecção que causa vaginite; erupção vulvar; afta oral;

conjuntivite; endoftalmite; erupção das fraldas; e infecções da unha, reto, e outras dobras de pele. Em pacientes imunocomprometidos podem ocorrer doenças sistêmicas tais como miocardite, abscesso hepatoesplênico, 5 infecção pulmonar, infecção do CNS e doenças crônicas. A Candidíase pode se espalhar a partir de uma infecção local para causar uma infecção sistêmica com complicações graves, tais como miocardite, endoftalmite e abscesso hepatoesplênico. Portanto, é de grande importância 10 encontrar curas efetivas e tratamentos preventivos para a candidíase, para evitar esta condição grave em sujeitos.

A afta é o nome comum para uma infecção na boca causada pelo fungo *Candida albicans* que afeta superfícies úmidas ao redor dos lábios, na parte interior das 15 bochechas, e na língua e palato. Afta é comum em pessoas com diabetes ou irritação de dentaduras. Também pessoas com doenças tais como câncer e AIDS, em que ambas suprimem o sistema imune, são freqüentemente afetadas pela candidíase.

Uma infecção por *Candida* na boca pode se espalhar para 20 o esôfago, causando esofagite. Esta infecção é a mais comum em pessoas com AIDS e pessoas que recebem quimioterapia para tratar câncer.

As infecções por *Candida* também são comuns nas partes de pele úmidas, tais como áreas de pele cobertas por 25 fraldas, as mãos de pessoas que usam de maneira rotineira luvas de borracha, a cutícula, especialmente para mãos que estão expostas à umidade, áreas ao redor da virilha e na prega das nádegas, e uma dobra de pele sob seios grandes.

A vaginite é uma inflamação da mucosa vaginal causada 30 por bactérias ou fungos. A vaginite em si é inicialmente

inofensiva, mas pode levar a parto prematuro em mulheres grávidas ou a infertilidade.

5 A candidíase vaginal causa coceira e irritação na vagina com um corrimento esbranquiçado e com grumos que pode lembrar um queijo cottage. É freqüentemente bastante desconfortável para a mulher que experimenta os sintomas e além disso, causa restrições às atividades normais, tal como exercícios desportivos e atividade sexual.

10 A candidíase vaginal é normalmente tratada de maneira local por cremes, supositórios, cápsulas de gelatina, comprimidos vaginais e pomadas que compreendem agentes antifúngicos. Também estão disponíveis medicamentos para administração oral. Um problema com os agentes antifúngicos é uma resistência aumentada do fungo ao agente se usado
15 repetidamente. Além disso, tais medicamentos são freqüentemente ineficientes e requerem uma prescrição médica.

Remédios caseiros, tais como aplicação de iogurte, comprimidos acidófilos ou duchas de vinagre também são
20 usados para tratar a candidíase. Contudo, a eficiência destes tratamentos é baixa. Embora iogurte compreenda lactobacilos, estes não estão especialmente adaptados para matar ou reduzir o crescimento de fungos. Como é entendido por um técnico no assunto, um tratamento deste tipo pode
25 ser efetivo somente para atenuar os sintomas de infecções menores. Também tem sido sugerido que bactérias produtoras de ácido láctico podem ser administradas por meio de artigos absorventes, tais como fraldas, absorventes femininos, protetores diários de calcinha e absorventes internos, como
30 descrito, por exemplo, nos documentos W097/02846, W099117813, W099/45099 e W000/35502.

Existe um interesse crescente em encontrar microorganismos probióticos que sejam capazes de restituir a flora microbiana saudável e/ou prevenir o crescimento descontrolado de microorganismos indesejados. A

5 administração de tais bactérias probióticas não tem os efeitos secundários negativos dos agentes antifúngicos e preferivelmente são mais eficientes no tratamento e/ou na prevenção de infecções fúngicas. Tentativas anteriores de encontrar tais microorganismos têm tido sucesso apesar de

10 problemas graças a baixa união e sobrevivência dos probióticos na vagina, eficiência limitada na prevenção de crescimento fúngico, baixa sobrevivência durante o armazenamento das preparações, etc. Outras características importantes de um probiótico selecionado são a habilidade

15 de crescer na presença de oxigênio e sobreviver a liofilização. De maneira mais importante, entretanto, a bactéria probiótica selecionada deve ser eficiente em matar e/ou prevenir o crescimento de fungos e/ou bactérias indesejáveis. Lactobacilos probióticos provaram

20 anteriormente ser eficientes no tratamento e na prevenção da vaginite bacteriana. Contudo, o sucesso na prevenção e/ou no tratamento de candidíase vaginal tem sido bastante limitado. Portanto, ainda existe uma necessidade de desenvolvimento de probióticos eficientes para o tratamento

25 da candidíase, incluindo candidíase vaginal, que também possa ser efetivo contra infecções bacterianas, tais como infecções do trato urinário.

Sumário da invenção

30 O objeto da invenção é proporcionar uma bactéria probiótica para o tratamento e/ou a prevenção de candidíase

e/ou infecções bacterianas, tais como infecções do trato urinário.

O objeto definida acima é em um primeiro aspecto da invenção alcançado proporcionando uma nova cepa de
5 *Lactobacillus fermentum*, referida como Ess-1, que foi depositada no Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851.

Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, para o uso como um
10 medicamento.

Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de candidíase.

15 Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de infecções bacterianas, tal como infecção do trato urinário.

20 Ainda em outros aspectos a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, opcionalmente junto com um carreador, um excipiente e/ou um diluente farmacêuticamente aceitável.

25 Ainda em um aspecto adicional, a invenção se refere a um artigo sanitário que compreende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1.

A invenção também se refere a um método de preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou a
30 prevenção de candidíase que compreende adicionar

Lactobacillus fermentum, cepa Ess-1, a dita composição farmacêutica.

Além disso, a invenção se refere a um método de preparação de um artigo sanitário para o tratamento e/ou a
5 prevenção de candidíase que compreende adicionar *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, a um artigo sanitário.

Uma vez que se demonstrou que a nova cepa de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, proporciona excelente inibição do crescimento de fungos *Candida*, esta nova cepa
10 bacteriana mostra propriedades valiosas para uso na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de *Candidiasis*. Além disso, a invenção resolve o problema de proporcionar produtos e artigos para a administração desta nova cepa bacteriana a áreas do corpo
15 de interesse para um tratamento e/ou uma prevenção deste tipo.

Definições

No presente contexto um agente antifúngico é um
20 fármaco usado para tratar infecções fúngicas, cujo fármaco não é um probiótico como definido abaixo.

Probiótico/probióticos no presente contexto se refere a microorganismos vivos que conferem um benefício de saúde quando administrados em quantidades adequadas a um
25 hospedeiro.

Candidíase no presente contexto se refere a uma infecção causada por fungos *Candida* presentes em ou sobre qualquer parte do corpo, tal como a pele, região urogenital, boca, esôfago ou intestinos.

Suplemento oral no presente contexto se refere a uma composição que é administrada oralmente, tal como uma pulverização, um comprimido, uma goma de mascar, etc.

Biologicamente puro no presente contexto se refere a
5 uma cultura de uma bactéria que contém somente uma cepa bacteriana específica.

O termo "artigo sanitário" se refere a produtos que são colocados contra a pele do usuário para absorver e conter exsudatos corporais, como urina, fezes e fluido menstrual, e também a produtos que são usados para limpar e
10 cuidar da pele e da área urogenital e que também podem ser usados para administrar bactérias probióticas a estas áreas. A invenção principalmente se refere a artigos sanitários descartáveis, o que significa artigos que não
15 pretendem que sejam lavados ou de outra forma restaurados ou reutilizados como um artigo sanitário após o uso. Exemplos de artigos sanitários descartáveis incluem lenços umedecidos, lenços secos, produtos de higiene feminina, tais como absorventes femininos, protetores diários de
20 calcinha, calcinhas descartáveis e absorventes internos; insertos femininos; fraldas e fraldas calças para crianças e adultos com incontinência; resguardos para incontinência; insertos de fraldas e similares.

O termo "artigo absorvente" se refere a produtos que
25 são colocados contra a pele do usuário para absorver e conter exsudatos corporais, como urina, fezes e fluido menstrual. Exemplos de artigos sanitários descartáveis incluem produtos de higiene feminina, tais como absorventes femininos, protetores diários de calcinha, calcinhas
30 descartáveis e absorventes internos; insertos femininos; fraldas e fraldas calças para crianças e adultos com

incontinência; resguardos para incontinência; insertos de fraldas e similares.

"Lenço higiênico" significa qualquer dispositivo para enxugar a pele, por exemplo um pano de lavar, um emplastro,
 5 um lenço descartável, um guardanapo, um lenço umedecido, um lenço seco e similares.

"Lipídio" no presente contexto significa substâncias que são insolúveis em água, mas solúveis em um solvente orgânico.

10

Breve descrição dos desenhos

A figura 1 mostra a média inibição de crescimento de cada uma das três cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. ■ = *C. albicans*, □ = *C. glabrata*. *dMRSs pH ajustado para o pH
 15 mais baixo registrado de todos os filtrados (pH 3,7). 0 indica sem crescimento visual, 5 indica crescimento muito bom.

A figura 2 mostra a inibição de crescimento de *C. albicans* em ácido ascórbico 50 mM (Fig. 2a) e ácido
 20 propiônico 50 mM (Fig. 2b), em filtrado de Ess-1 e em filtrado de Ess-1 com adição de ácido ascórbico 50 mM (Fig. 2a) e ácido propiônico 50 mM (Fig. 2b). 0 indica sem crescimento visual, 5 indica crescimento muito bom.

A figura 3 mostra produção de ácido succínico, ácido
 25 acético e ácido propiônico em cinco cepas diferentes de *Lactobacillus*, incluindo Ess-1. As cepas cresceram em caldo MRS e a produção de ácido foi registrada no caldo depois que o sobrenadante foi filtrado de maneira estéril.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção se refere a uma nova cepa de *Lactobacillus fermentum*, a seguir no presente documento denominada Ess-1, depositada de acordo com o Tratado de Budapeste no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) e número de registro designado DSM17851 (depositante Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umeå, Suécia, depositado em 6 de janeiro de 2006). A cepa mostrou propriedades únicas no tratamento/e ou na prevenção de infecções por *Candida*, isto é candidíase, devido a suas propriedades inibidoras no crescimento de levedura *Candida*. Também a cepa Ess-1 mostrou propriedades valiosas no tratamento e/ou na prevenção de infecções bacterianas, tais como infecções do trato urinário. Além disso, Ess-1 sobrevive longos períodos de armazenamento, o que é importante para a conveniência de quando se maneja produtos que compreendem a bactéria. Também, Ess-1 não é estritamente anaeróbica, mas pode crescer em presença de oxigênio e sobrevive bem à liofilização. A cepa de *Lactobacillus fermentum* Ess-1 da invenção é biologicamente pura.

Como demonstrado no Exemplo 1, Ess-1 exibe uma inibição única de crescimento de diferentes cepas de levedura *Candida*. Neste experimento um grande número de cepas de lactobacilos foi testado para suas propriedades de inibição de crescimento de *Candida*. As 23 melhores cepas foram escolhidas para estudos adicionais. A inibição de crescimento de Ess-1 é mais de duas vezes da que pode ser demonstrada para a melhor de estas 23 diferentes cepas de *Lactobacillus* usada para a comparação. Também, foi

demonstrado que Ess-1 inibe o crescimento de várias cepas bacterianas diferentes conhecidas por causar infecção do trato urinário. Além disso, foi demonstrado que Ess-1 é capaz de colonizar e sobreviver na vagina quando administrada à vagina. De maneira importante, Ess-1 sobrevive na vagina também durante a menstruação. A colonização e a sobrevivência *in vivo* após a administração a um sujeito é um fator importante para o sucesso de um probiótico para realizar suas tarefas pretendidas. Contudo, a falta de, ou a limitada colonização e sobrevivência *in vivo* freqüentemente limita a utilidade prática de bactérias probióticas produtoras de ácido lático. Além disso, a sobrevivência limitada durante o armazenamento e o manuseio de produtos que compreendem bactérias produtoras de ácido lático freqüentemente resultam no uso de produtos ineficazes. Em um primeiro aspecto a presente invenção se refere a uma nova cepa de *Lactobacillus fermentum*, denominada cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851.

Devido às propriedades inibidoras da cepa Ess-1 sobre o crescimento de *Candida* e bactérias que causam infecções do trato urinário, a presente invenção também se refere ao uso médico desta cepa. Em particular, a invenção se refere ao uso de cepa Ess-1 para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de candidíase preferivelmente de um sujeito mamífero, mais preferivelmente um sujeito humano. A invenção em outra modalidade preferida se refere ao uso da cepa Ess-1 para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de candidíase na região urogenital, tal

como candidíase vaginal. Em outra modalidade preferida, a presente invenção se refere ao uso de cepa Ess-1 para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de esofagite. Outra modalidade preferida da presente invenção se refere ao uso da cepa Ess-1 para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de afta.

Como a nova cepa Ess-1 da presente invenção mostrou experimentalmente (veja a "seção experimental") que inibe o crescimento varias bactérias diferentes que causam infecção, tal como infecção do trato urinário, outro aspecto da invenção se refere ao uso da cepa Ess-1 para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de infecções bacterianas, tal como infecção do trato urinário.

Em um aspecto, a presente invenção se refere ao uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, para a preparação de uma composição farmacêutica para administração oral.

Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica que compreende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, também compreende um ou mais carreadores farmacêuticamente aceitáveis, excipientes e/ou diluentes. Geralmente, tais agentes devem ser não tóxicos aos receptores nas concentrações e dosagens usadas. Exemplos de tais agentes são tampões, agentes espessantes de agentes de formação de gel tais como glicerina, polietilenoglicol, antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico), polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos),

proteínas, carboidratos incluindo glicose, sacarose e dextrinas. Exemplos de carreadores incluem açúcares, tais como lactose, glucose e sacarose; amidos, tais como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetatos de celulose; trehalose; tragacanto em pó, malte; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnésio; sulfato de cálcio; polióis tais como propilenoglicol, glicerina, sorbitol, manitol, e polietilenoglicol; ágar; ácidos algínicos; água livre de pirogênios; solução salina isotônica; e solução de tampão fosfato. Em uma modalidade preferida da invenção, um carreador que proporciona um ambiente anidro é usado como um carreador para as bactérias probióticas. Um ambiente anidro deste tipo prolonga a sobrevivência das bactérias durante a fabricação, transporte e armazenamento. Um exemplo de tais carreadores são carreadores lipídicos incluindo lipídios derivados de petróleo, tais como parafina líquida (óleos minerais, óleos de parafina, e outros óleos), petrolato (vaselina e geléia de petróleo), cera microcristalina, ozokerite, ceresina e parafinas. Alternativamente, lipídeos sintéticos, tais como dimeticona, ciclometicona e ésteres de silicone, tais como cetearil meticona pode ser usado. Uma terceira alternativa é usar lipídeos derivados de animal ou de planta, que usualmente são triglicerídeos. Os lipídeos derivados de animal e de planta são freqüentemente misturas de mono-, di- e triglicerídeos e ácidos graxos livres. Os lipídeos podem ser purificados, hidrogenados, refinados, modificados e usados sozinhos ou em diferentes misturas. Exemplos de lipídeos derivados de animal originais adequados incluem cera de abelhas, óleo de emú, lapida lática, lanolina, óleo

de fígado de tubarão e sebo. Exemplos de lipídeos derivados de planta originais adequados incluem óleo de semente de damasco, óleo de *Arachis*, óleo/cera de abacate, cera de árvore da cera, óleo de semente de groselha preta, óleo de
5 semente de borragem, óleo de castanha-do-pará, óleo de *Camelia sinensis*, cera de candelilha, óleo de canola, cera de carnaúba, óleo de rícino, manteiga de cacau, óleo de coco, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de semente de roseira brava, óleo de semente de primula, óleo
10 de semente de uva, manteiga de ilipé, cera de jasmim, cera de jojoba, cera de lavanda, óleo de semente de linho, óleo de semente de manga, azeite de oliva, cera de laranja, óleo de dendê, óleo de semente de dendê, óleo de amendoim, cera de arroz, óleo açafrão, óleo de semente de gergelim,
15 manteiga de carité, óleo de soja, cera de semente de girassol, óleo de amêndoas doces, óleo de *Theobroma* e óleo de gérmen de trigo. O uso de carreadores lipídicos tem a vantagem adicional de aumentar a transferência de bactérias ao usuário, por exemplo, quando a composição farmacêutica é
20 administrada por meio de um produto sanitário, tal como um produto absorvente ou um tecido higiênico (veja, por exemplo, o documento WO 04/060416). Exemplos de lipídeos preferidos incluem petrolato e cera de silício. Agentes umectantes e lubrificantes tais como lauril sulfato de
25 sódio, e agentes corantes, lubrificantes, agentes de formação de comprimidos, estabilizantes e conservantes também podem estar presentes. Carreadores farmacêuticamente aceitáveis preferidos são trehalose ou um fator de crescimento de lactobacilo, por exemplo, inulina e/ou
30 oligofructose, polidextrose, lactitol ou amido resistente, em pó ou em outra forma. Uma composição farmacêutica de

acordo com a presente invenção em uma modalidade preferida também pode compreender, além de células *Lactobacillus fermentum* Ess-1, um ácido orgânico e/ou um sal do mesmo, tal como ácido acético, ácido propiônico, ácido lático, 5 ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos, preferivelmente ácido acético, ácido propiônico, ácido lático, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico ou ácido succínico e/ou um sal 10 dos mesmos, mais preferivelmente ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos. Um efeito sinérgico pode ser obtido combinando o probiótico Ess-1 com ácidos orgânicos e/ou sais dos mesmos, cujo ácido orgânico tem um valor de pKa que não supera 5,5.

15 Os ácidos orgânicos ou os correspondentes sais devem ser de tal natureza que quando os mesmos são aplicados em um artigo sanitário não devem causar nenhuma irritação na pele do usuário do artigo sanitário, portanto o pKa do ácido orgânico, quando as medições são realizadas em água a 25°C, 20 preferivelmente não devem ser inferior a 2. Se os valores de pKa ao contrário são altos demais, os ácidos orgânicos ou os sais dos mesmos estarão principalmente em suas formas de ácido. Isto significa que o aditivo não estará suficientemente dissociado em um íon de hidrogênio e sua 25 forma aniônica desprotonada, o que se acredita que é um pré-requisito para dito efeito com as bactérias probióticas ou o produto extracelular das mesmas. Portanto, pelo menos um de dos valores de pKa para o ácido orgânico adequado para a presente invenção deve ser inferior a 5,5, 30 preferivelmente inferior a 5. Além disso, nutrientes para a propagação bacteriana, tais como aminoácidos, peptídeos,

derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais, ácidos graxos, glicose, frutose, ribose, maltose e lactose podem ser adicionados à composição farmacêutica, sozinhos ou em combinações diferentes.

5 Uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é preferivelmente administrada na forma de uma pulverização, um creme, um pó, um supositório, um líquido para administração oral, uma cápsula, um comprimido, um dispositivo intravaginal ou um suplemento oral. Composições
10 para tratamento dérmico, por exemplo, podem ser preparadas de acordo com o documento US 2006/0171936.

Outros exemplos de produtos que compreendem a cepa Ess-1 são um pó em uma luva, pílula, goma de mascar, enxaguatório bucal ou pulverização bucal.

15 ***Além disso, uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção também pode compreender uma substância que reduz odores, tal como zeólitas, sílica, ciclodextrina e carvão ativado. Também, substâncias que têm a capacidade de aumentar a união de lactobacilos e/ou
20 substâncias que diminuem a união de microorganismos patogênicos podem estar compreendidas em uma composição farmacêutica de acordo com a invenção.

A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode ser administrada como uma dose única, mas é
25 preferivelmente administrada em doses múltiplas. A composição farmacêutica preferivelmente também pode ser administrada em conexão com a administração de agente(s) antifúngico(s).

Em uma modalidade preferida a composição farmacêutica
30 de acordo com a invenção compreende células bacterianas secas, tais como células liofilizadas, células secas por

pulverização ou células secas ao ar. Tais células têm boas habilidades de sobrevivência durante o armazenamento (veja a seção experimental de um estudo de sobrevivência de células liofilizadas).

5 A composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende preferivelmente de 10^4 a 10^{11} unidades formadoras de colônias (ufc), mais preferivelmente de 10^6 a 10^{10} ufc, inclusive mais preferivelmente de 10^8 a 10^{10} UFC, de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por dose.

10 A composição farmacêutica ou produto de acordo com a invenção, além de Ess-1, pode compreender outras bactérias com propriedades probióticas a fim de obter um efeito clínico mais amplo. Tais bactérias preferidas para o objeto da presente invenção incluem bactérias produtoras de ácido

15 láctico, por exemplo, dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, membros não patogênicos do gênero *Bacillus* genus, todos os membros do gênero *Bifidobacterium*, e *Pseudomonas limbergii*. Membros preferidos do gênero *Lactobacillus* inclui *Lactobacillus acidophilus*,

20 *Lactobacillus bulga[eta]cus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*, *Lactobacillus delbrukeii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gaserii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*,

25 *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus papacasai* sp. *paracasai*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis* e similares. Mais preferivelmente a bactéria selecionada usada é das espécies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*,

30 *Lactobacillus curvatus* ou *Lactobacillus plantarum*. Outros exemplos preferidos incluem espécies não patogênicas de

espécies de *Coccus*, tais como *S. naltivarius*, *S. oralis* e *S. mitis*. Um exemplo inclusive mais preferido de uma bactéria produtora de ácido láctico deste tipo inclui, mas não é limitada a, *Lactobacillus plantarum*, cepa LB931 (documento
5 EP 1060240, número de registro DSM 11918 no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen).

A composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser incorporada em uma variedade de diferentes produtos. Por exemplo, um pó que compreende Ess-1 pode ser
10 proporcionado em diferentes tipos de luvas de proteção. Tais luvas freqüentemente proporcionam um ambiente úmido para as mãos o que pode facilitar o crescimento de fungos que resultam em infecções fúngicas da pele e unhas das mãos.

15 A presente invenção em outro aspecto se refere a um artigo sanitário que compreende *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851. Um artigo
20 sanitário deste tipo pode ser um artigo absorvente, tal como um produto de higiene feminina tal como um absorvente feminino, um protetor diário de calcinha, uma calcinha higiênica ou um absorvente interno; um inserto feminino; uma fralda e uma fralda calça para crianças ou adultos com
25 incontinência; um resguardo para incontinência; ou um inserto de fralda. Também, um artigo sanitário pode ser um tecido higiênico tal como um pano de lavar, um emplastro, um lenço descartável, um guardanapo, um lenço umedecido ou um lenço seco. Um tecido higiênico adequado para a presente
30 invenção foi descrito previamente no documento WO 04/060416. As bactérias produtoras de ácido láctico foram

ali "encapsuladas" em um lipídeo em um ambiente anidro a fim de proteger a bactérias da umidade durante o armazenamento e para facilitar a transferência ao usuário do lenço higiênico. Um tecido higiênico deste tipo também
5 pode compreender opcionalmente um ou mais aditivos de limpeza tais como emolientes, emulsificantes, hidratantes, agentes reguladores de pH, agentes quelantes, modificadores de viscosidade, agentes antimicrobianos, conservantes e fragrâncias, tal como relevado no documento WO 04/060416.

10 Detalhes adicionais de agentes adequados comumente adicionados a produtos de limpeza da pele são dados em *Woodruff's Ingredients e Formulary Handbook*, John Woodruff, Primeira ed., 1997, Miller Freeman fJK Ltd. Um produto absorvente ou um lenço higiênico de acordo com a invenção
15 também pode compreender adicionalmente ácidos, sais, inibidores de odores, substâncias que afetam a adesão dos probióticos e microorganismos indesejados como discutido acima. Um produto absorvente deste tipo pode incluir uma folha exterior permeável que se pretende que esteja em
20 contato próximo com a pele do usuário, uma folha inferior impermeável a líquido preferivelmente que se pretende que esteja situado distante do usuário em uso, e uma estrutura absorvente disposta entre a folha exterior e a folha inferior. Em alguns casos, uma folha adicional na forma de,
25 por exemplo, enchimento ou material similar, pode ser colocada entre a folha exterior e a estrutura absorvente. A folha inferior é preferivelmente respirável. As bactérias probióticas podem ser dispostas em diferentes partes do artigo absorvente, por exemplo, na folha exterior, na
30 estrutura absorvente, entre duas das camadas do artigo absorvente, em um produto de inserto frouxo no produto

absorvente, ou de alguma outra forma. Um produto absorvente de acordo com a presente invenção também pode compreender preferivelmente um polímero super-absorvente (SAP).

Um artigo sanitário de acordo com a invenção, além de
5 células de *Lactobacillus fermentum* Ess-1 pode compreender adicionalmente um ácido orgânico e/ou um sal do mesmo, tal como ácido acético, ácido propiônico, ácido lático, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprônico, ácido succínico e/ou um
10 sal dos mesmos, preferivelmente ácido acético, ácido propiônico, ácido lático, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico ou ácido succínico e/ou um sal dos mesmos, mais preferivelmente ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos, cujo
15 ácido tem um valor de pKa que não supera 5,5. Um efeito sinérgico pode ser obtido combinando as células probióticas Ess-1 com ácidos orgânicos e/ou sais dos mesmos.

Um artigo sanitário de acordo com a invenção preferivelmente compreende de 10^4 a 10^{11} unidades formadoras
20 de colônias (ufc), mais preferivelmente de 10^6 a 10^{10} ufc, inclusive mais preferivelmente de 10^8 a 10^{10} UFC, de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por artigo sanitário.

As bactérias probióticas da presente invenção podem ser diretamente aplicadas a um artigo sanitário de acordo
25 com a invenção ou proporcionadas em uma composição farmacêutica como revelado no presente documento aplicada ao produto. Em uma modalidade preferida, as bactérias são bactérias secas, como revelado anteriormente, são aplicadas diretamente ao artigo sanitário, sozinhas ou em uma
30 composição farmacêutica de acordo com o acima. Em outra modalidade preferida, as bactérias podem ser aplicadas ao

artigo sanitário primeiro, por exemplo, em uma suspensão que compreende as bactérias, depois disso o produto sanitário é seco, deste modo proporcionando um produto com bactérias secas no mesmo, opcionalmente em combinação com
5 agentes farmacêuticos adicionais como revelado anteriormente. Em outra modalidade preferida, o pó de bactérias secas é proporcionado em um lipídeo adicionado ao artigo sanitário. A fim de reduzir a exposição das
10 armazenamento de artigos que compreendem o probiótico Ess-1, em uma modalidade preferida o artigo sanitário é embalado em uma embalagem impermeável água.

Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no
15 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, para produzir um artigo sanitário tal como um lenço umedecido, lenço seco, um produto de higiene feminina tal como um absorvente feminino, um protetor diário de calcinha, uma
20 calcinha higiênica e um absorvente interno; um inserto feminino; uma fralda ou uma fralda calça para crianças ou adultos com incontinência; um resguardo para incontinência; ou um inserto de fralda. O artigo sanitário é preferivelmente um artigo absorvente tal como um produto de
25 higiene feminina tal como um absorvente feminino, um protetor diário de calcinha, uma calcinha higiênica ou um absorvente interno; um inserto feminino; uma fralda e uma fralda calça para crianças ou adultos com incontinência; um resguardo para incontinência; ou um inserto de fralda. O
30 artigo sanitário também pode ser preferivelmente um tecido higiênico tal como um pano de lavar, um emplastro, um lenço

descartável, um guardanapo, um lenço umedecido ou um lenço seco.

A invenção também se refere ao uso de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, para produzir uma composição farmacêutica tal como uma suspensão, uma pulverização, um creme, um pó, um supositório, uma cápsula, um comprimido, um suplemento oral ou um dispositivo intravaginal etc., de acordo com o acima. Composições farmacêuticas e produtos que compreendem *L. fermentum* cepa Ess-1 compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de esta cepa bacteriana.

A presente invenção também se refere a um método para tratar e/ou prevenir a candidíase que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a um sujeito em necessidade do mesmo. A invenção também se refere a um método para tratar e/ou prevenir infecções bacterianas, tal como infecção do trato urinário, que compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a um sujeito em necessidade do mesmo. Em tais métodos, a cepa Ess-1 é administrada ao sujeito por meio de quaisquer das composições farmacêuticas ou produtos que foram revelados acima. Para a administração por meio de um artigo

sanitário, tal como um produto absorvente, é importante que o produto absorvente seja colocado em contato próximo com a pele de dito sujeito.

Um objetivo importante da presente invenção é a administração oral de Ess-1. Um aspecto da invenção, portanto, se refere a uma composição farmacêutica para administração oral. Esta administração oral em um primeiro aspecto leva a uma supressão de crescimento de fungos e/ou bactérias no trato gastrointestinal e uma melhora do equilíbrio na flora microbiana. Contudo, fungos e bactérias presentes no trato gastrointestinal também podem ser transferidos à área urogenital por meio do ânus. A supressão de crescimento de fungos e/ou bactérias no trato gastrointestinal, portanto pode ter um efeito benéfico tanto no próprio trato gastrointestinal, mas também na área urogenital devido à propagação reduzida de fungos e/ou bactérias patogênicas a esta região. Um efeito sistêmico também pode ser alcançado, tal como provocar substâncias imunes de resposta. A administração oral, por exemplo, pode ser proporcionada por meio de Ess-1 estando compreendidas em cápsulas, comprimidos, pílulas, losangos, pastilhas, suspensões líquidas, suspensões orais secas, suspensões orais líquidas, gomas de mascar, enxaguatórios bucais, pastilhas, pulverizações bucais, frascos etc. A administração oral também pode ser alcançada por meio de produtos alimentícios, tais como iogurte, leite, queijo fresco, sorvete, produtos feitos de leite fermentado, produtos feitos de cereais fermentados, leite em pó etc, e produtos infantis, tal como mingau.

Em outro aspecto, a presente invenção se refere a produtos para a administração tópica e/ou oral da cepa Ess-

1 a um animal para melhorar a saúde animal, por exemplo em
uma composição farmacêutica de acordo com o acima ou em
alimentos para animais ou um complemento alimentar para um
animal. Também, Ess-1 pode ser usado para melhorar a
5 qualidade de alimentos para animais, tal como ensilagem, em
si inibindo o crescimento de fungos e bactérias nos mesmos.

A presente invenção também se refere a um método de
preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento
e/ou a prevenção de candidíase que compreende adicionar
10 *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a
dita composição farmacêutica. A presente invenção também se
refere a um método de preparação de uma composição
15 farmacêutica para o tratamento e/ou a prevenção de
infecções bacterianas, tais como infecções do trato
urinário, que compreendem adding *Lactobacillus fermentum*
cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido
20 designado o número de registro DSM17851, a dita composição
farmacêutica.

Também, a presente invenção se refere a um método de
preparação de um artigo sanitário, tal como um produto
absorvente ou um tecido higiênico, para o tratamento e/ou a
25 prevenção de candidíase que compreende adicionar
Lactobacillus fermentum cepa Ess-1, que foi depositada no
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a
dito artigo sanitário. Também, a presente invenção se
30 refere a um método de preparação de um artigo sanitário,
tal como um produto absorvente ou um tecido higiênico, para

o tratamento e/ou a prevenção de infecções bacterianas, tal como infecções do trato urinário, que compreendem adicionar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a
5 dito artigo sanitário.

A invenção agora será descrita em mais detalhes na seguinte seção experimental. Os exemplos são, contudo, somente ilustrativos e não pretendem limitar o escopo da
10 presente invenção.

Seção experimental

Exemplo 1: Isolamento e tipificação de Ess-1

Objetivo

O propósito inicial deste estudo é isolar e tipificar
15 uma cepa de *Lactobacillus* que inibe o crescimento de *Candida albicans* e *Candida glabrata* a uma grande extensão em comparação com outras cepas de *Lactobacillus*.

Método

Cepas de levedura

20 Isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida glabrata* foram usados como cepas de teste. Estas foram isoladas da vagina de mulheres com candidíase vaginal e de mulheres saudáveis.

Seleção I.

25 Aproximadamente 140 cepas de *Lactobacillus*, originadas de pele humana, garganta, dentes, fezes infantis, vegetais e sementes foram cultivadas em caldo MRS e carimbado sobre placas de ágar MRS. As placas de ágar foram incubadas sob condições anaeróbias a 37°C. Adicionalmente, ágar SAB
30 (Sabouraud) (LAB M, Bury, RU) foi derramado sobre o ágar MRS e se deixou congelar. A cultura de *C. albicans* foi

semeada sobre ágar e as placas foram incubadas aerobicamente a 37°C. Foi feita uma avaliação visual da inibição. As cepas que inibiam *C. albicans* igualmente a uma extensão maior que a cepa de referência *Lactobacillus plantarum* LB931 foram selecionados para seleção adicional (seleção II).

Seleção II.

Suspensões de lactobacilos crescidas em caldo dMRSs (caldo MRS sem adição de acetato de sódio) foram centrifugadas e filtradas de maneira estéril. O filtrado é de agora em diante denominado filtrado livre de células de *Lactobacillus*, LCF (do inglês *Lactobacillus* Cell free Filtrate). Um volume específico foi transferido a poços de uma placa de microtitulação e foi deixado secar ao ar e depois ressuspendido em água destilada estéril até uma concentração três vezes mais alta e transferida a placa de microtitulação de 96 poços. *Candida* foi adicionada a todos os frascos (três isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, respectivamente, foram usados). A inibição foi avaliada por meio de observação visual de turbidez e graduada por duas pessoas usando um gabarito em uma escala de cinco a zero. Os poços que continham forte crescimento de *Candida* sp. em caldo dMRSs puro foram graduados como cinco, enquanto que os poços sem crescimento visual foram graduados como zero.

25 Tipificação API e tipificação genética

A identificação a nível específico foi feita usando o sistema API 50 CHL (bioMérieux, França), seguindo as instruções do fabricante. Dados dos testes de fermentação foram analisados usando o software API Lab Plus. A tipificação genética foi feita pelo DSMZ (Deutsche Sammlung

von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) por meio de análise de seqüenciamento parcial do rRNA 16S.

Resultados

5 Todas as cepas foram avaliadas de acordo com a capacidade de inibição de crescimento contra *C. albicans* em seleção I. 23 cepas de *Lactobacillus* com resultados comparáveis ou que superam aquele para LB931 foram selecionadas para a seleção II. De aquelas 23 cepas de
10 *Lactobacillus*, três foram cepas de referência e a maioria das cepas foram isoladas do trato oral. A figura 1 ilustra a inibição de crescimento para cada cepa *Lactobacillus*, onde cada barra representa o crescimento médio de três cepas de *C. albicans* e três cepas de *C. glabrata*
15 respectivamente.

 "Outro 1" provou ter uma capacidade compreensiva de inibir o crescimento de *Candida*. Nenhuma das cepas de *Lactobacillus* foi similar à atividade de Outro 1 com respeito tanto sobre *C. albicans* como *C. glabrata*. Outro 1
20 foi designado Ess-1 e seu padrão de fermentação de carboidratos e a tipificação genética mostrou que pertence à espécie *Lactobacillus fermentum*.

Caracterização de Ess-1

 rDNA 16S da cepa Ess-1 (DSM 17851) foi analisado pelo
25 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) por meio de seqüenciamento direto de aproximadamente 450 nucleotídeos de rDNA 16S amplificado por PCR. A extração de DNA genômico, amplificação mediada por PCR do rDNA 16S e purificação do produto PCR foi levada
30 a cabo como previamente descrito (Rainey, F.A. et al. Int. J. Sys. Bacteriol. 1996(46):1088-1092). Os produtos de PCR

purificados foram seqüenciados usando o Kit CEQ(TM)DTCS-Quickstart (Beckam Coulter) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de reação do seqüenciamento foram submetidos a eletroforese usando o sistema de análise genética CEQ(TM)8000.

Os dados da seqüência resultante foram colocados no editor de alinhamento ae2 (Maidak, B. L et al. Nucl. Acids Res. 1999(27) : 171-173), alinhados manualmente e comparados com seqüência de genes de rRNA 16S representativas de organismos que pertencem a *Firmicutes* (Maidak, B. L. et al.). Para comparação seqüências de rRNA 16S foram obtidas da base de dados EMBL ou RDP (Maidak, B. L et al.).

Como resultado desta análise a seguinte tabela 1 lista aqueles organismos, cujas seqüências gênicas de rRNA 16S mostraram os valores de similaridade mais altos em comparação com a seqüência de rDNA 16S de Ess-1.

Tabela 1

Cepa	% de similaridade de sequência gênica de rRNA 16S em relação a ESS-1
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	99,3
<i>Lactobacillus fermentum</i> KRM	99,0
<i>Lactobacillus malefermentans</i> DSM 5705	85,5
<i>Lactobacillus rossiae</i> ATCC BAA-822	88,9
<i>Lactobacillus suebicus</i> SM 5007	86,9
<i>Lactobacillus vaccinostrercus</i> DSM 20634	87,2

A sequência gênica de rRNA parcial da cepa Ess-1 mostra a similaridade mais alta em relação a *Lactobacillus fermentum*. Conseqüentemente a cepa Ess-1 pode representar uma cepa de *Lactobacillus fermentum*, mas também pode representar uma nova espécie dentro do gênero *Lactobacillus*.

10 Exemplo 2: Tratamento térmico

Objetivo

O objetivo deste experimento é estudar a resistência ao calor para as substâncias que inibem o crescimento de *Candida* produzidas pela cepa Ess-1.

15 Método

LCF foi tratado termicamente durante 20 minutos a 90°C. *C. albicans* e *C. glabrata* foram adicionados até uma

concentração final de aproximadamente 5×10^4 UFC ml^{-1} . As placas foram incubadas durante 20 horas a 37°C e o crescimento de *Candida* nos frascos foi avaliado visualmente e graduado de cinco a zero.

5

Resultados

O filtrado tratado termicamente da cepa Ess-1 foi tão bem sucedido em inibir o crescimento de levedura quanto o filtrado não tratado usado como comparação. Portanto, o
10 tratamento térmico do filtrado não destrói a substância ativa desta bactéria.

Exemplo 3: Inibição de *C. albicans* com LCF com adição de sais e ácidos

Objetivo

15 O propósito deste estudo é determinar se sais e ácidos afetam o crescimento de *Candida* e se uma inibição do crescimento melhorada pode ser alcançada quando são adicionados ao LCF da cepa Ess-1.

Método - sais

20 Aliquotas de LCF tiveram o pH ajustado para o valor de pKa para cada sal e secas ao ar até que estavam completamente secas e depois ressuspendidas em 0,3% de acetato de sódio e propionato de sódio. *C. albicans* foi adicionada até uma concentração final de aproximadamente
25 5×10^4 UFC ml^{-1} . As frações foram incubadas durante 20 horas a 37°C . A inibição foi avaliada por observação visual de turbidez e graduada por duas pessoas usando um gabarito em uma escala de cinco a zero. Os poços que continham forte crescimento de *Candida sp.* em caldo dMRSS puro foram
30 graduados como cinco, enquanto que os poços sem crescimento visual foram graduados como zero.

Métodos - ácidos

Ácido succínico, ácido acético, ácido propiônico e ácido ascórbico foram adicionados até uma concentração final de 50 mM a tubos que continham LCF. O filtrado tinha o pH ajustado para o valor de pKa para o respectivo ácido. *C. albicans* e *C. glabrata* foram adicionados até uma concentração final de aproximadamente 5×10^4 UFC ml^{-1} . As placas foram incubadas durante 20 horas a 37°C e o crescimento de *Candida* nos poços foi avaliado visualmente e graduado de cinco a zero.

Resultados

Diferentes ácidos e sais de ácido provaram ter um efeito no crescimento de *C. albicans*. Os resultados iniciais mostraram que a concentração de 50 mM nos filtrados foi a concentração mais baixa requerida para ver o efeito de alguns ácidos e 0,1-0,3% para ver o efeito de aditivos de sal. Propionato de sódio e ácido propiônico tiveram o efeito mais estendido sobre *C. albicans*. Como ilustrado nas figuras 2a e b, uma adição do efeito de inibição de crescimento foi alcançado quando foi adicionado ácido ascórbico (50 mM, pKa e pH: 4,2) ou ácido propiônico (50 mM, pKa e pH: 4,87) ao LCF de Ess-1. Isto demonstra que um efeito sinérgico pode ser obtido combinando o LCF de Ess-1 com ácidos orgânicos e/ou sais dos mesmos. Portanto, uma combinação de células de Ess-1 com ácidos orgânicos e/ou sais dos mesmos é predito que resulta em um efeito sinérgico similar.

Exemplo 4: Análise de ácido
Objetivo

O objetivo deste estudo é investigar se a cepa Ess-1 produz ácidos, que não são produzidos ou produzidos em um nível inferior, por outras cepas de *Lactobacillus*, e que poderiam explicar a forte capacidade de inibição de crescimento desta cepa bacteriana sobre levedura.

Método

Ess-1 e outras cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em 45 ml de caldo dMRSS (caldo MRS sem adição de acetato de sódio) durante 18 h, centrifugadas a 10°C , 3000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi filtrado de maneira estéril (0,22 µm, Millex, Billerica, MA, E.U.A.) e congelado a -55°C até ser mandado ao *Steins Laboratorium* A7S (Loddekoping, Suécia) para análise usando cromatografia líquida.

Resultados

Como pode ser visto na figura 3, a cepa Ess-1 produz mais ácido succínico e mais ácido acético que as outras cepas bacterianas testadas, o que poderia ser uma razão para a excelente capacidade inibitória desta cepa sobre o crescimento de levedura.

Exemplo 5: Sobrevivência de Ess-1 em liofilização e durante o armazenamento

Objetivo

O propósito deste experimento é determinar se Ess-1 sobrevive a liofilização e permanece viável após o posterior.

Método

Ess-1 cresceu em MRS, foi concentrada dez vezes em uma suspensão de trehalose a 20%. A suspensão foi congelada a -

55°C em um pote plástico. Após 24 h o pote foi colocado em uma máquina de liofilização (Hetosicc, Heto Birkerød, Dinamarca) e processada durante 48 h. O produto final foi pulverizado e colocado em um recipiente hermético para
5 armazenamento. Para aumentar o stress o recipiente foi colocado a 37°C. Foram tomadas amostras nas semanas 0, 2, 5 e 11. As bactérias viáveis foram contadas suspendendo o pó em solução de cloreto de sódio e vistas em placas de ágar.

10 Resultados

A cepa Ess-1 sobreviveu bem à liofilização e foi estável durante 11 semanas com somente um log de decréscimo em sobrevivência durante este período de tempo. Após 17 semanas de armazenamento a sobrevivência cai em 4,5 log.
15 Isto indica uma sobrevivência muito boa da bactéria, como normalmente o armazenamento tem lugar a temperatura ambiente ou em uma geladeira, em cujas temperaturas o decréscimo em sobrevivência é inclusive mais lento.

Exemplo 6: Sobrevivência de cepa Ess-1 após
20 administração à vagina de cápsulas que compreendem bactérias liofilizadas

Objetivo:

Estudar a sobrevivência e colonização de Ess-1 após administração à vagina.

25 Método

Ess-1 cresceu em MRS, foi concentrada dez vezes em uma suspensão de trehalose a 20% e liofilizada como descrito acima. Após pulverização do material, o pó foi carregado em cápsulas de gelatina (tamanho 2, Apoteket AB, Gothenburg,
30 Suécia) até uma concentração de aproximadamente 1×10^9 UFC por cápsula. Quatro sujeitos voluntários participaram no

estudo usando uma cápsula por semana para um período menstrual, começando a administração nos dias antes da menstruação. Os próprios sujeitos tomaram amostras vaginais uma vez na semana anterior a administração da cápsula girando uma haste de algodão estéril 5 vezes 3 cm dentro da vagina. As amostras foram cultivadas em placas de ágar e lactobacilos resistentes a vancomicina morfolologicamente similares a Ess-1, e portanto que se consideraram que eram Ess-1, foram contados.

Resultados

Nenhuma mulher teve forte crescimento de lactobacilos resistentes a vancomicina no início do estudo. Todas as mulheres estavam colonizadas com Ess-1 na segunda amostra tomadas tomada nos dias seguintes à menstruação. Ess-1 foi encontrada Tb durante todo o estudo em algumas mulheres e em amostras específicas em outras. Portanto, as cápsulas vaginais podem ser usadas para colonizar a vagina durante todo o ciclo menstrual. Os dados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de Ess-1 encontrada em amostras vaginais em mulheres que participaram no estudo. Quatro mulheres foram incluídas no estudo e nenhuma estava colonizada com cepas de *Lactobacillus* resistentes a vancomicina no início do estudo (Antes). O dado é apresentado como $\text{Log}_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$. Amostras marcadas "-" estão faltando.

	Antes do início do estudo	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
Mulher 1	0	6,22	6,52	4,95	5,43	2,00
Mulher 2	0	4,70	0,00	-	4,54	4,28
Mulher 3	0	1,30	-	4,22	3,85	-
Mulher 4	0	2,41	0,00	-	-	-

Exemplo 7: Inibição de bactérias que causam infecções tais como infecções do trato urinário

5 Objetivo

O propósito do estudo foi explorar se Ess-1 produz substâncias que inibem o crescimento de bactérias que causam infecções, tais como infecções do trato urinário.

Método

10 Um método revestimento de ágar modificado foi usado. Ess-1 cresceu em caldo MRS durante 20 h. 1 ml de cultura bacteriana foi misturada com 2 ml de solução de acetato de sódio 7,5M e 22 ml de ágar MRS a 50°C e foi derramado em uma placa de Petri e deixado congelar. A placa foi incubada

15 anaerobicamente a 37°C durante 20 h. Uma camada adicional de 24 ml de ágar M17 misturada com 0,75 ml de solução de fosfato de dihidrogênio de potássio a 6,5 M foi derramada na parte superior da camada de MRS e deixada congelar. Um replicador de haste de aço de Steer foi mergulhado nos

poços de uma bandeja de Bertram que continham culturas da noite para o dia dos patógenos e estampado na parte superior da camada de ágar. As placas foram deixadas secar durante 30 minutos e incubadas a 37°C durante 24 h antes da
5 leitura. Caldo MRS estéril foi usado como controle. O pH foi registrado na parte superior da camada de ágar após a incubação e o crescimento foi categorizado em "crescimento" ou "sem crescimento". As cepas patogênicas (um total de 23 cepas) foram isoladas de mulheres com infecções do trato
10 urinário; incluíram *E. coli* (4), *Klebsiella sp.* (4), *E. faecalis* (3), *Enterobacter* (4), *Streptococcus* do grupo B (3), *S. aureus* (2), *S. saprophyticus* (1) e *P. mirabilis* (2).

15 Resultados

Ess-1 inibiu o crescimento de todos os patógenos e todos os patógenos cresceram bem na placa de controle. O pH foi 6,0 na parte superior da camada de ágar e portanto não poderia impactar o crescimento de forma nenhuma.

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, **caracterizada pelo** fato de que foi
5 depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851.

2. Cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, **caracterizada pelo** fato de que foi
10 depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, para uso médico.

3. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no
15 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de candidíase.

20 4. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma
25 composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de candidíase vaginal.

5. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
30 e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma

composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de afta.

6. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no
5 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de esofagite.

10 7. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma
15 composição farmacêutica para a prevenção e/ou o tratamento de infecção bacteriana, tal como infecção do trato urinário.

8. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no
20 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para administração oral.

9. Composição farmacêutica que compreende uma cepa
25 biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizada pelo** fato de que está opcionalmente junto com um carreador, um excipiente e/ou um
30 diluente farmaceuticamente aceitável.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada pelo** fato de que dito carreador farmaceuticamente aceitável é trehalose ou um fator de crescimento de lactobacilo em pó ou outra forma.

5 11. Composição farmacêutica, de acordo com quaisquer das reivindicações 9-10, **caracterizada pelo** fato de que as células da cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 são secas, tal como por liofilização, secas por pulverização ou secas ao ar.

10 12. Composição farmacêutica, de acordo com quaisquer das reivindicações 9-11, **caracterizada pelo** fato de que compreende de 10^4 a 10^{11} unidades formadoras de colônias (ufc), mais preferivelmente de 10^6 a 10^{10} ufc, inclusive mais preferivelmente de 10^8 a 10^{10} UFC, de uma cepa
15 biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por dose.

13. Composição farmacêutica, de acordo com quaisquer das reivindicações 9-12, **caracterizada pelo** fato de que compreende também outras bactérias probióticas.

20 14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada pelo** fato de que as outras bactérias probióticas são bactérias produtoras de ácido láctico, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.

25 15. Composição farmacêutica, de acordo com quaisquer das reivindicações 9-14, **caracterizada pelo** fato de que é uma suspensão, uma pulverização, um creme, um pó, um supositório, uma cápsula, um suplemento oral ou um dispositivo intravaginal.

30 16. Composição farmacêutica, de acordo com quaisquer das reivindicações 9-15, **caracterizada pelo** fato de que é para administração oral.

17. Artigo sanitário **caracterizado pelo** fato de que compreende uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo
5 sido designado o número de registro DSM17851.

18. Artigo sanitário, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato de que compreende também um ácido orgânico e/ou um sal do mesmo, tal como ácido acético, ácido propiônico, ácido lático, ácido ascórbico,
10 fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos.

19. Artigo sanitário, de acordo com quaisquer das reivindicações 19-20, **caracterizado pelo** fato de que
15 compreende também outras bactérias produtoras de ácido lático, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.

20. Artigo sanitário, de acordo com a reivindicação 17-19, **caracterizado pelo** fato de que compreende de 10^4 a 10^{11} unidades formadoras de colônias (ufc), mais
20 preferivelmente de 10^6 a 10^{10} ufc, inclusive mais preferivelmente de 10^8 a 10^{10} UFC, de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por produto.

21. Artigo sanitário, de acordo com quaisquer das
25 reivindicações 17-20, **caracterizado pelo** fato de que o artigo sanitário é um artigo absorvente tal como um produto de higiene feminina tal como um absorvente feminino, um protetor diário de calcinha, uma calcinha higiênica ou um absorvente interno; um inserto feminino; uma fralda e uma
30 fralda calça para crianças ou adultos com incontinência; um resguardo para incontinência; ou um inserto de fralda.

22. Artigo sanitário, de acordo com quaisquer das reivindicações 17-20, **caracterizado pelo** fato de que o artigo sanitário é um tecido higiênico tal como um pano de lavar, um emplastro, um lenço descartável, um guardanapo, um lenço umedecido ou um lenço seco.

23. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, **caracterizado pelo** fato de que é para produzir um artigo sanitário tal como um lenço umedecido, um lenço seco, um produto de higiene feminina tal como um absorvente feminino, um protetor diário de calcinha, uma calcinha higiênica e um absorvente interno; um inserto feminino; a fralda ou fralda calça para crianças ou adultos com incontinência; um resguardo para incontinência; ou a inserto de fralda.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado pelo** fato de que o artigo sanitário é um artigo absorvente tal como um produto de higiene feminina tal como um absorvente feminino, um protetor diário de calcinha, uma calcinha higiênica ou absorvente interno; um inserto feminino; uma fralda e uma fralda calça para crianças ou adultos com incontinência; um resguardo para incontinência; ou um inserto de fralda.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado pelo** fato de que o artigo sanitário é um tecido higiênico tal como um pano de lavar, um emplastro, um lenço descartável, um guardanapo, um lenço umedecido, ou um lenço seco.

26. Uso de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851,
5 **caracterizado pelo** fato de que é para produzir uma composição farmacêutica tal como uma suspensão, uma pulverização, um creme, um pó, um supositório, uma cápsula, um comprimido, um suplemento oral ou um dispositivo intravaginal.

10 27. Método para tratar e/ou prevenir candidíase **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
15 und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a um sujeito em necessidade do mesmo.

28. Método para tratar e/ou prevenir a infecção bacteriana, tal como infecção do trato urinário, **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração
20 de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM 17851, a um sujeito em necessidade do mesmo.

25 29. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 27-28, **caracterizado pelo** fato de que dita cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 é administrada a dito sujeito por meio de uma composição farmacêutica de acordo com quaisquer das
30 reivindicações 9-16.

30. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 27-29, **caracterizado pelo** fato de que dita cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 é administrada a dito sujeito colocando um artigo sanitário de acordo com quaisquer das reivindicações 17-22 em contato próximo com a pele de dito sujeito.

31. Método de preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou a prevenção de candidíase e/ou infecções bacterianas **caracterizado pelo** fato de que compreende adicionar uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a dita composição farmacêutica.

32. Método de preparação de um artigo sanitário para o tratamento e/ou a prevenção de candidíase e/ou infecções bacterianas **caracterizado pelo** fato de que compreende adicionar uma cepa biologicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851, a dito artigo sanitário.

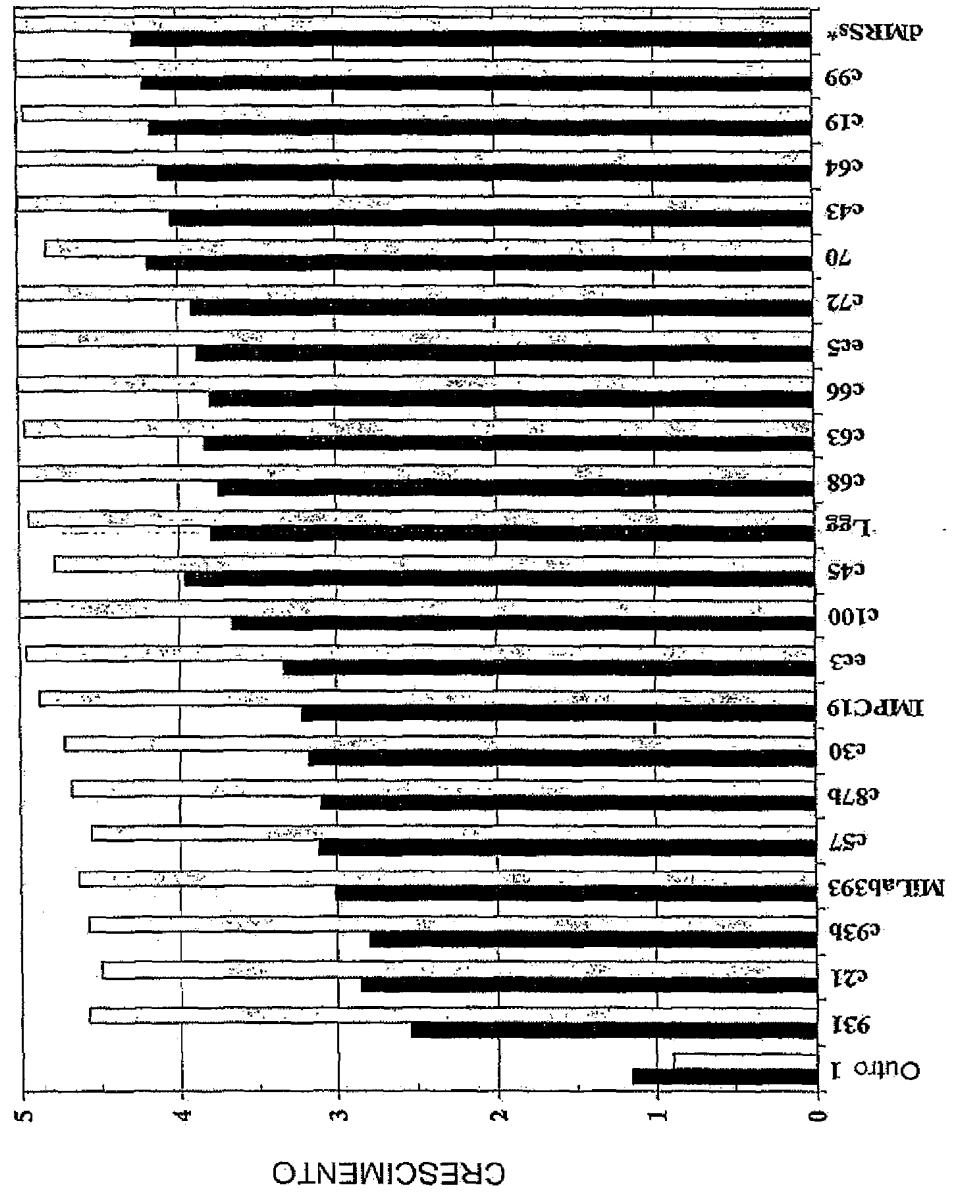


Fig. 1

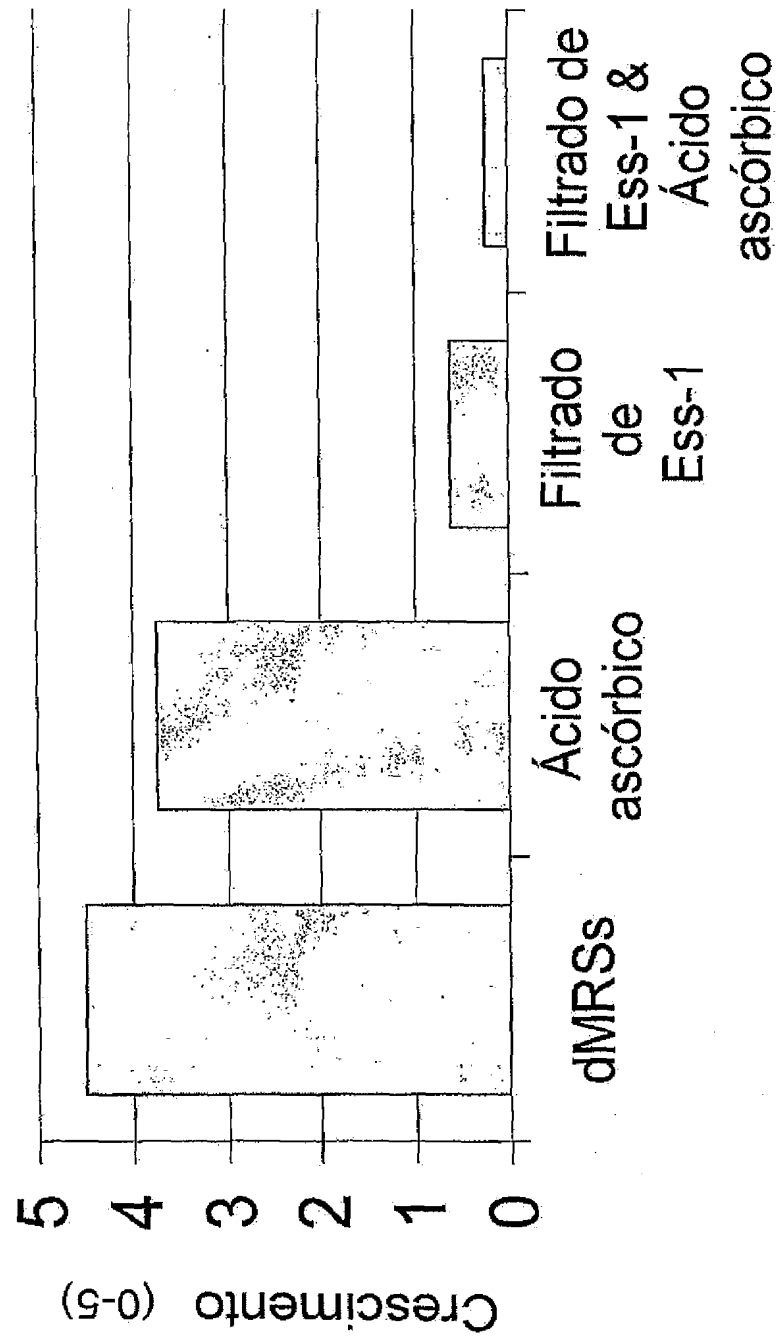


Fig. 2A

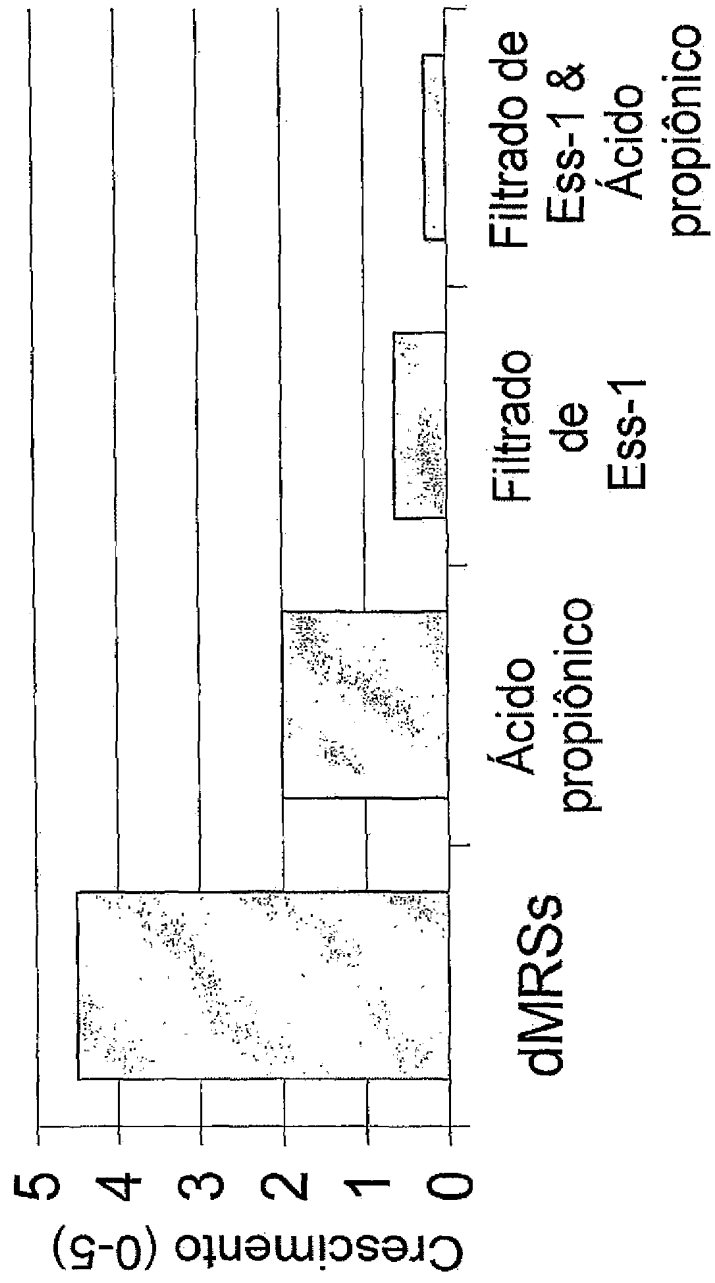


Fig. 2B

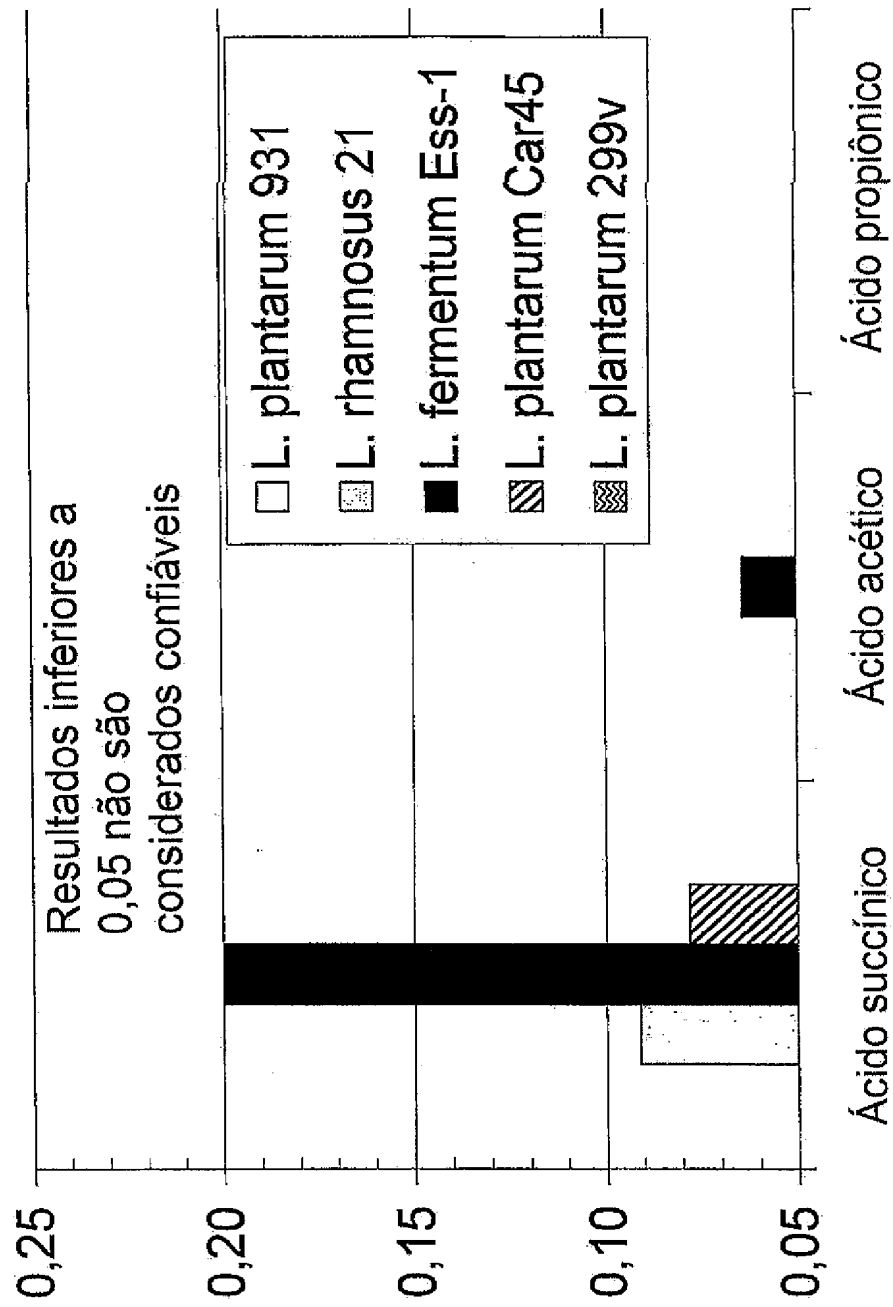


Fig. 3

RESUMO

**"*Lactobacillus fermentum* ESS-1, DSM17851 E SEU USO PARA O
TRATAMENTO E/OU A PREVENÇÃO DE CANDIDÍASE E INFECÇÕES DO
TRATO URINÁRIO"**

5

A presente invenção se refere a uma nova cepa de *Lactobacillus fermentum*, denominada cepa Ess-1, que foi depositada no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e tendo sido designado o número de registro DSM17851. *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, mostrou propriedades valoráveis na inibição de *Candida*. A invenção portanto também se refere ao uso médico de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, em particular para o tratamento e/ou a prevenção de candidíase e infecções do trato urinário. A invenção também se refere a produtos farmacêuticos e artigos que compreendem esta nova cepa bacteriana.

10

15